



UNIVERSIDAD NACIONAL DE RIO CUARTO  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, FÍSICO-QUÍMICA Y NATURALES

**Tesis Doctoral en Ciencias Biológicas**

Aplicación de aditivos alimentarios innovadores  
para el mejoramiento de la calidad de alimentos y la producción animal

**Mic. Analía Silvia Fochesato**

**Director: Dra. Lilia R. Cavaglieri**

**Co-Director: Dra. Cecilia A. Dogi**

**Río Cuarto, Marzo 2019**

**Aplicación de aditivos alimentarios innovadores para el mejoramiento de la  
calidad de alimentos y la producción animal**

**por**

**Mic. Analía Silvia Fochesato**

---

Dra. Lilia Reneé Cavaglieri

Director

---

Dra. Cecilia Ana Dogi

Co-Director

Aprobada por:

---

Dra. Cecilia Merkis

---

Dra. Alejandra de Moreno de LeBlanc

---

Dr. Miguel Galvagno

Rio Cuarto, Marzo 2019

Este trabajo se lo dedico con mucho amor  
a mi familia por siempre apoyarme  
y creer en mi...

A la Universidad Nacional de Río Cuarto por permitirme llevar a cabo esta investigación en sus instalaciones, a mis directoras Dra. Lilia Cavaglieri y Dra. Cecilia Dogi por darme la oportunidad de trabajar en su grupo de investigación y a todos los que me ayudaron y acompañaron de una u otra forma para poder llevar a cabo esta tesis, a mi familia, a mis amigos...

MUCHAS GRACIAS

**RESUMEN**

El desarrollo de la actividad agrícola-ganadera es uno de los pilares más importantes sobre el que se asienta la economía argentina. El aumento en las producciones y el consumo de carnes traerá aparejado un mayor consumo de alimentos balanceados y por consiguiente, insumos destinados a la sanidad animal entre ellos los aditivos para alimentación animal. Durante varias décadas los antibióticos se utilizaron como aditivos promotores del crecimiento animal para mejorar la salud y el bienestar de los animales, como así también para aumentar el crecimiento y la eficiencia de la conversión. Una alternativa a su uso es la suplementación con probióticos para mantener o mejorar la salud y aumentar la disponibilidad de nutrientes y el rendimiento de los animales y también demostrar que son seguros en cuanto a los riesgos para la salud humana, la salud animal y el medio ambiente. La contaminación de la alimentación animal con micotoxinas afecta 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. El uso efectivo de aditivos alimentarios que contengan cepas de levaduras y/o BAL como adsorbentes y/o degradadores de micotoxinas con propiedades probióticas constituye una alternativa promisorias. En este trabajo se aplicó una estrategia tecnológica que permitió la producción de altas densidades de biomasa seca de *S. cerevisiae* RC016 y *L. rhamnosus* RC007 en medios de cultivo optimizados con un sustrato de bajo costo utilizando diseños estadísticos experimentales. Se lograron dos formulados de aditivos utilizados al 0,1% en la dieta para alimentación animal; uno simple a base de *S. cerevisiae* RC016 ( $1 \times 10^7$  cél/g) y uno mixto (mezcla de liofilizados 1:1 *L. rhamnosus* RC007 ( $1 \times 10^8$  células/g) y *S. cerevisiae* RC016 ( $1 \times 10^7$  células/g)). Estudios por microscopía electrónica y el perfil de macromoléculas por espectroscopia infrarroja revelaron que el medio de cultivo y el tracto gastrointestinal afectaron la composición de pared celular de las levaduras y por consiguiente la captación de micotoxinas. *S. cerevisiae* RC016 presentó mayor adsorción de AFB<sub>1</sub> en el jugo gástrico (95,3%) mientras que *L. rhamnosus* RC007 en solución intestinal, pero con altos niveles de desorción; sin embargo logró hasta un 80,4% de degradación de AFB<sub>1</sub>. Ambas cepas demostraron ausencia de citotoxicidad en la línea celular Vero y ausencia de genotoxicidad en médula ósea de pollos. La administración del formulado líquido mixto (*S. cerevisiae* RC016 y *L. rhamnosus* RC007) a ratones sanos BALB/c no indujo modificaciones en las citoquinas proinflamatorias de fluido intestinal. La aplicación del formulado simple a base de *S. cerevisiae* RC016 liofilizada en alimento de pollos parrilleros permitió contrarrestar el efecto de la micotoxina ( $p < 0,01$ ). Los pollos que recibieron el formulado mixto demostraron en general una mejora en los

parámetros productivos analizados logrando prevenir el efecto tóxico de la micotoxina. Este hallazgo se relacionó con menores daños histológicos en el intestino delgado. El uso de aditivos a base de *S. cerevisiae* RC016 y *L. rhamnosus* RC007 en la alimentación animal proporciona mayor protección frente a la contaminación con micotoxinas, aportan características benéficas como probióticos y son seguros para su uso como suplemento en alimentos para animales, ejerciendo efectos benéficos que mejoran la sanidad y la productividad animal. Además estas cepas demostraron ser escalables industrialmente.

**ABSTRACT**

The development of the agricultural-livestock activity is one of the most important Argentine pillars. The livestock production and the meat consumption increase will bring a greater consumption of feedstuff and consequently, inputs destined to animal health, among them the additives for animal feed. For several decades antibiotics were used as animal growth promoter (AGP) additives to improve the health and welfare of animals, as well as to increase growth and conversion efficiency. The supplementation with probiotics constitute an alternative of AGP to maintain or improve health and increase the availability of nutrients and performance of animals and also to show that they are safe in terms of risks to human health, animal health and the environment. The contamination of animal feed with mycotoxins affects the performance in animal production, the decrease in the nutritional value of the food and the negative impact on the health of the animals. The effective use of feed additives containing yeast and/or lactic acid bacteria (LAB) strains as adsorbents and/or mycotoxin-degraders with probiotic properties is a promising alternative. In this work, a technological strategy was applied that allowed the production of high densities of dry biomass of *S. cerevisiae* RC016 and *L. rhamnosus* RC007 in optimized culture media with a low cost substrate using experimental statistical designs. Two formulations were obtained at 0.1% of additives in the diet for animal feed. A simple formulation, based on *S. cerevisiae* RC016 ( $1 \times 10^7$  cells/g), and another mixed (1:1 lyophilized mixture *L. rhamnosus* RC007 ( $1 \times 10^8$  cells/g) and *S. cerevisiae* RC016 ( $1 \times 10^7$  cells/g)). Studies conducted by electron microscopy and the profile of macromolecules by infrared spectroscopy revealed that the culture medium and the gastrointestinal tract affected the yeasts cell wall composition and the mycotoxins adsorption. *S. cerevisiae* RC016 had the highest AFB<sub>1</sub> adsorption in gastric juice (95.3%) while *L. rhamnosus* RC007 in intestinal solution, but with high levels of desorption; however, it obtained 80.4% degradation of AFB<sub>1</sub>. Both strains demonstrated absence of cytotoxicity in the Vero cell line and absence of genotoxicity in bone marrow of chickens. The administration of *S. cerevisiae* RC016 and *L. rhamnosus* RC007 to healthy Balb-c mice did not induce changes in proinflammatory cytokines of intestinal fluid. The application of a simple formulation based on *S. cerevisiae* RC016 prevented the effect of mycotoxin ( $p < 0.01$ ). The chickens that received the mixed formulation showed in general an improvement in the productive parameters analyzed and the prevention of the toxic effect of the mycotoxin. This finding was related to minor histological damage in the small intestine. The use of additives based on *S. cerevisiae* RC016 and *L. rhamnosus* RC007 in animal feed provides greater protection against contamination with mycotoxins, provides beneficial characteristics such as

probiotics and is safe for use as a supplement in animal feeds, exerting effects beneficial that improve animal health and productivity. In addition, these strains proved to be industrially scalable.

**ÍNDICE**

<b>Resumen</b>	4
<b>Abstract</b>	6
<b>Introducción</b>	8
Industria de los alimentos destinados a los animales.	9
Antibióticos promotores de crecimiento.	13
Alternativas al uso de antibióticos promotores de crecimiento.	17
Aditivos para alimentación animal.	18
- Aditivos tecnológicos.	19
- Aditivos organolépticos.	19
- Aditivos nutricionales.	20
- Aditivos zootécnicos.	20
- Coccidiostáticos e histomonostáticos.	20
Normativa relativa a los aditivos para piensos para uso animal.	21
- Prebióticos.	21
- Enzimas.	21
- Aditivos fitogénicos.	22
- Péptidos bioactivos.	22
- Micotoxinas.	22
Probióticos.	23
Salud intestinal.	27
Las micotoxinas como agentes toxicos alimentarios.	29
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> RC016.	30
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> RC007.	31
Métodos de evaluación de seguridad de sustancias bioactivas.	32
Producción de probióticos: aspectos tecnológicos	32
<b>Hipótesis general</b>	35
<b>Objetivo general</b>	35
<b>Materiales y métodos</b>	36
<b>a) Optimización y producción de biomasa de <i>S. cerevisiae</i> RC016 y <i>L. rhamnosus</i> RC007 probióticos antimicotoxinas a través de diseños</b>	37

<b>estadísticos experimentales.</b>	
1. Microorganismos.	37
2. Condiciones de cultivo.	37
3. Curvas de crecimiento en medios de cultivo con diferentes fuentes de carbono.	37
4. Determinación del crecimiento celular.	39
5. Parámetros cinéticos.	39
6. Parámetros productivos.	39
7. Determinación de glucosa.	40
8. Determinación de acidez titulable.	40
9. Formulación de un medio de cultivo apropiado para la producción de biomasa utilizando diseños estadísticos experimentales.	40
9.1. Diseños estadísticos experimentales y análisis de los resultados.	40
9.2. Diseño de selección.	40
9.3. Diseños de optimización.	41
<b>b) Escalado de la producción de biomasa de <i>S. cerevisiae</i> RC016 y <i>L. rhamnosus</i> RC007.</b>	41
10. Validación de los medios optimizados en biorreactor.	41
10.1. Parámetro de escalado. Tiempo de mezclado.	42
<b>c) Formulación de aditivos alimentarios biológicos simples y en mezcla.</b>	42
11. Agentes crioprotectores.	42
12. Preparación de la biomasa y protección.	42
13. Liofilización.	43
14. Viabilidad.	43
<b>d) Estudios de la variabilidad ultraestructural de la pared celular de <i>S. cerevisiae</i> RC016 expuesta a diferentes componentes del medio de cultivo y su influencia sobre la adsorción de aflatoxina B<sub>1</sub>.</b>	43
15. Producción de aflatoxina B <sub>1</sub> .	43
16. Cuantificación de aflatoxina B <sub>1</sub> por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC).	44
17. Microscopia electrónica de transmisión (MET).	44
18. Microscopía óptica de alta resolución (MOAR).	44
19. Espectroscopía infrarroja (IR).	45
20. Ensayos de adsorción y desorción de aflatoxina B <sub>1</sub> en tracto gastrointestinal simulado.	45
21. Soluciones artificiales del tracto gastrointestinal.	46
<b>e) Estudio del mecanismo de reducción de aflatoxina B<sub>1</sub> por <i>Lactobacillus</i></b>	48

<b><i>rhamnosus</i> RC007.</b>	
22. Ensayos de adsorción y desorción de aflatoxina B <sub>1</sub> en tracto gastrointestinal simulado.	48
23. Ensayo de degradación de aflatoxina B <sub>1</sub> por extracto libre de células.	48
<b>f) Estudios de seguridad biológica (cito y genotoxicidad) de <i>S. cerevisiae</i> RC016 y <i>L. rhamnosus</i> RC007 y sus sobrenadantes en cultivos celulares.</b>	48
24. Ensayo de citotoxicidad en células Vero.	48
25. Revelación por incorporación de rojo neutro.	49
26. Ensayo de genotoxicidad a partir de médula ósea de pollos parrilleros	49
<b>g) Estudios de la influencia de la mezcla de <i>S. cerevisiae</i> RC016 y <i>L. rhamnosus</i> RC007 sobre el sistema inmunológico en ratones BALB-c.</b>	50
27. Evaluación de los efectos de la mezcla de <i>S. cerevisiae</i> RC016 y <i>L. rhamnosus</i> RC007 en ratones sanos.	50
28. Determinación de citoquinas en fluido intestinal.	50
<b>h) Diseño de estudio <i>in vivo</i> en pollos parrilleros aplicando un aditivo simple.</b>	51
29. Animales y diseño experimental.	51
30. Determinación de los parámetros productivos: ganancia de peso, índice de conversión, rendimiento de carcasa y peso de los órganos.	52
<b>i) Diseño de estudio <i>in vivo</i> en pollos aplicando un aditivo mixto.</b>	52
31. Diseño experimental.	52
31.1. Animales empleados.	52
31.2. Dietas experimentales.	53
32. Variables medidas.	58
32.1. Parámetros productivos.	58
32.2. Parámetros bioquímicos.	58
32.3. Necropsia.	58
32.4. Histopatología de los órganos.	58
32.5. Análisis histológico del intestino delgado.	59
<b>j) Análisis de los resultados.</b>	59
<b>CAPÍTULO I</b>	60
<b>PRODUCCIÓN DE BIOMASA. Optimización, escalado industrial y formulación.</b>	60
<b>Introducción</b>	61

<b>Hipótesis y objetivos</b>	64
<b>Resultados y discusión</b>	65
<b>a) Optimización y producción de biomasa de <i>S. cerevisiae</i> RC016 y <i>L. rhamnosus</i> RC007 probióticos antimicotoxinas a través de diseños estadísticos experimentales.</b>	65
Curvas de crecimiento de <i>S. cerevisiae</i> RC016 en medios de cultivo suplementados con diferentes fuentes de carbono.	65
Curvas de crecimiento de <i>L. rhamnosus</i> RC007 en medios de cultivo suplementados con diferentes fuentes de carbono.	67
Diseños estadísticos experimentales.	69
Diseño de selección de Plackett- Burman.	69
Diseño de optimización de Box- Behnken.	72
Metodología de superficie de respuesta.	72
<b>b) Escalado de la producción de biomasa de <i>S. cerevisiae</i> RC016 y <i>L. rhamnosus</i> RC007.</b>	76
Parámetro de escalado: tiempo de mezclado.	76
Validación de los medios optimizados en biorreactor.	77
<b>c) Formulación de aditivos alimentarios biológicos simples y en mezcla.</b>	79
<b>Conclusiones parciales</b>	82
<b>CAPÍTULO II</b>	83
<b>DINÁMICA DE LA REDUCCIÓN DE AFLATOXINA B1 EN PRESENCIA DE <i>S. cerevisiae</i> RC016 y <i>L. rhamnosus</i> RC007. Influencia del tracto gastrointestinal simulado.</b>	83
<b>Introducción</b>	84
<b>Hipótesis y objetivos</b>	86
<b>Resultados y discusión</b>	87
<b>a) Variabilidad estructural de la pared de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> RC016 y su influencia sobre la adsorción de aflatoxina B<sub>1</sub>.</b>	87
Determinación del tamaño de la pared celular de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> RC016 por microscopía electrónica de transmisión y microscopía óptica de alta resolución.	87
Determinación de la composición química de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> RC016 por espectroscopia IR.	88

Capacidad de adsorción / desorción de AFB1 por <i>Saccharomyces cerevisiae</i> RC016 en tracto gastrointestinal simulado.	92
<b>b) Adsorción/desorción/degradación de aflatoxina B<sub>1</sub> por <i>Lactobacillus rhamnosus</i> RC007.</b>	95
Efecto de las condiciones gastrointestinales simuladas sobre la unión de la aflatoxina B <sub>1</sub> .	96
Ensayo de degradación de aflatoxina B <sub>1</sub> .	97
<b>Conclusiones parciales</b>	100
<b>CAPÍTULO III</b>	101
<b>SEGURIDAD Y EFICACIA DE LA APLICACIÓN DE ADITIVOS BIOLÓGICOS SIMPLES Y MIXTOS COMO PROBIÓTICOS ANTIMICOTOXINAS.</b>	101
<b>Introducción</b>	102
<b>Hipótesis y objetivos</b>	105
<b>Resultados y discusión</b>	106
<b>a) Estudios de seguridad biológica (cito y genotoxicidad) de <i>S. cerevisiae</i> RC016 y <i>L. rhamnosus</i> RC007.</b>	106
Ensayo de citotoxicidad <i>in vitro</i> en cultivos celulares.	106
Ensayo de genotoxicidad a partir de médula ósea de pollos parrilleros.	110
<b>b) Diseño de estudio <i>in vivo</i> en pollos aplicando un aditivo simple.</b>	112
Parámetros productivos: ganancia de peso, índice de conversión y peso de la carcasa.	113
Peso de los diferentes órganos.	120
<b>c) Estudios de la influencia de la mezcla de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> RC016 y <i>Lactobacillus rhamnosus</i> RC007 sobre el sistema inmunológico en ratones BALB/c.</b>	122
<b>d) Diseño de estudio <i>in vivo</i> en pollos aplicando un aditivo mixto</b>	125
Parámetros productivos: ganancia de peso, índice de conversión y rendimiento de carcasa.	127
Parámetros bioquímicos.	132
Peso relativo de los órganos inmunes como marcador de inocuidad para los probióticos.	134
Peso del hígado y análisis de lesiones macroscópicas.	136
Histopatología de los hígados.	139
Análisis histológico del intestino delgado de pollos alimentados con aflatoxina B <sub>1</sub> y el	142

formulado mixto de probióticos.

<b>Conclusiones parciales</b>	145
<b>Conclusiones finales</b>	146
<b>Perspectivas futuras</b>	148
<b>Bibliografía</b>	150
<b>Anexo</b>	165

## Índice de Figuras

<b>Figuras</b>	<b>Página</b>
1 Actores intervinientes en la producción porcina en Argentina (SAGyP. 2016).	11
2 Actores intervinientes en la producción avícola en Argentina (SAGyP. 2016).	12
3 Actores intervinientes en la producción bovina en Argentina (SAGyP. 2016-2017).	12
4 Plan Estratégico Agroalimentario 2020 (PEA2020).	14
5 Propagación de la resistencia a los antibióticos (OMS). ( <a href="http://www.who.int/drugresistance/es/">www.who.int/drugresistance/es/</a> ).	18
6 Esquema general de las aplicaciones benéficas de DFM en rumiantes.	24
7 Esquema general de los mecanismos de acción y aplicaciones beneficiosas de los probióticos en aves.	27
8 Simulación del tracto gastrointestinal de un animal monogástrico.	47
9 Esquema de la distribución de los grupos experimentales en el galpón.	57
10 Esquema de la distribución y cantidad de animales por jaula.	57
11 Curva de crecimiento de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> RC016 con diferentes fuentes de carbono: a) Glucosa; b) Melaza; c) Burlanda (DDG´s) y d) JRC. En frascos agitados a 28°C.	66
12 Curva de crecimiento de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> RC007 incubado en tubos sin microaerofilia a 37°C, en medios de cultivo suplementados con: (A) glucosa; (B) lactosuero; (C) melaza y (D) JRC.	68
13 Gráficos de contorno para el diseño de optimización que muestra el efecto sobre el crecimiento de <i>S. cerevisiae</i> RC016 (N° células/ mL) de: (A) concentración de extracto de DDG´s (%) y tiempo de incubación (h), (B) concentración de urea (%) y concentración de extracto de DDG´s (%), (C) concentración de urea (%) y tiempo de incubación (h). La escala de colores muestra los niveles de producción de biomasa de la levadura.	74
14 Gráficos de contorno para el diseño de optimización que muestra el efecto sobre el crecimiento de <i>L. rhamnosus</i> RC007 (rendimiento x/s) de: (A) extracto de levadura (g/L) y CaCO <sub>3</sub> (g/L), (B) azúcares reductores (g/L) y extracto de levadura (g/L), (C) azúcares reductores (g/L) y CaCO <sub>3</sub> (g/L). La escala de colores muestra los niveles de producción de biomasa.	75
15 Fotografía del polvo obtenido luego del proceso de liofilización: (A) <i>S. cerevisiae</i> RC016 y (B) <i>L. rhamnosus</i> RC007.	81
16 Análisis de la ultraestructura de las células de levaduras de <i>Saccharomyces</i>	87

	<i>cerevisiae</i> RC0016: (a) espesor de la pared celular en medio DDGse y (b) espesor de la pared celular en medio YPD. Ampliación 12 000.	
17	Composición en macromoléculas de células completas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> RC016 crecidas en diferentes medios de cultivo y sometidas luego a la solución intestinal artificial por espectrometría FT-IR.	90
18	Perfil de la región de polisacáridos presentes en las células completas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> RC016 crecidas en diferentes medios de cultivo y sometidas luego a la solución intestinal artificial por espectrometría FT-IR.	91
19	Hígados representativos de pollos parrilleros en los distintos tratamientos. T1: control; T2: toxina; T3: formulado mixto ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> RC016 + <i>Lactobacillus rhamnosus</i> RC007); T4: formulado mixto + toxina; T5: comercial.	138
20	Histopatología de los hígados de pollos parrilleros sometidos a diferentes tratamientos. a) T1: control; b) T2: toxina; c) T3: formulado mixto ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> RC016 + <i>Lactobacillus rhamnosus</i> RC007); d) T4: formulado mixto + toxina; e) T5: comercial. Aumento 40X.	141
21	Microfotografías representativas del intestino delgado de cada grupo de tratamientos a 500x y 1000x. T1: control; T2: toxina; T3: formulado mixto ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> RC016 + <i>Lactobacillus rhamnosus</i> RC007); T4: formulado mixto + toxina; T5: comercial. ↓ Indica la presencia de glándulas Brünner.	144

## Índice de Tablas

<b>Tabla</b>		<b>Página</b>
1	Microorganismos utilizados como probióticos en alimentación animal.	25
2	Especificaciones y composición del jarabe de refinera comercial.	38
3	Composición del alimento iniciador para pollos parrilleros.	54
4	Composición centesimal del alimento iniciador para pollos parrilleros.	54
5	Concentración de aditivos.	55
6	Niveles de AFB <sub>1</sub> presentes en las distintas dietas experimentales.	56
7	Parámetros cinéticos: Velocidad específica de crecimiento ( $\mu_{\text{máx}}$ ) y tiempo de duplicación (Td), de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> RC016 en medios de cultivo suplementados con diferentes fuentes de carbono, incubados en Erlenmeyer agitados a 180 rpm y 28°C.	66
8	Parámetros cinéticos: velocidad de crecimiento ( $\mu_{\text{máx}}$ ) y tiempo de duplicación (Td), de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> RC007 en medios de cultivo suplementados con diferentes fuentes de carbono, en tubos a 37°C, sin microaerofilia.	68
9	Diseño de selección de Plackett- Burman para <i>S. cerevisiae</i> RC016 con DDGse como fuente de carbono.	71
10	Diseño de selección de Plackett- Burman para <i>L. rhamnosus</i> RC007 con melaza como fuente de carbono.	71
11	Parámetro de escalado tiempo de mezclado medido en distintas condiciones de agitación y de pH.	77
12	Parámetros cinéticos y productivos de <i>S. cerevisiae</i> RC016 y <i>L. rhamnosus</i> RC007 utilizando JRC como fuente de carbono para el medio de cultivo optimizado.	79
13	Análisis de la ultraestructura de la pared celular de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> RC016.	88
14	Adsorción de aflatoxina B1 (ng/mL) por <i>Saccharomyces cerevisiae</i> RC016 crecida en medio YPD simulando el pasaje a través del tracto gastrointestinal parcial y completo.	94

15	Adsorción de aflatoxina B <sub>1</sub> (ng/mL) por <i>Saccharomyces cerevisiae</i> RC016 crecida en medio DDGse simulando el pasaje a través del tracto gastrointestinal parcial y completo.	95
16	Capacidad de adsorción y desorción de aflatoxina B <sub>1</sub> de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> RC007 simulando el pasaje por el tracto gastrointestinal completo.	96
17	Capacidad de adsorción y desorción de aflatoxina B1 de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> RC007 en cada porción del tracto gastrointestinal simulando.	97
18	Porcentajes de degradación de aflatoxin B1 por el extracto libre de células de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> RC007 en diferentes tiempos de exposición.	98
19	Porcentaje de viabilidad de células Vero enfrentadas a diferentes concentraciones de <i>S. cerevisiae</i> RC016, <i>L. rhamnosus</i> RC007 y en mezcla.	108
20	Porcentaje de viabilidad de células Vero enfrentadas a diferentes concentraciones de sobrenadante de <i>S. cerevisiae</i> RC016, <i>L. rhamnosus</i> RC007 y en mezcla.	109
21	Porcentaje de eritrocitos normocromáticos micronucleados (%ENCMN) en pollos parrilleros alimentados con diferentes tratamientos experimentales.	111
22	Ganancia de peso total de los pollos en los diferentes tratamientos con levadura y AFB1.	114
23	Índice de conversión de los pollos en los diferentes tratamientos con levadura y AFB1.	115
24	Peso de las carcasas (kg) de pollos que recibieron diferentes dietas con levadura y AFB1.	115
25	Peso de diferentes órganos (g) de pollos que recibieron diferentes dietas con levadura y AFB1.	121
26	Efecto de un formulado líquido mixto de <i>S. cerevisiae</i> RC016 y <i>L.</i>	122

	<i>rhamnosus</i> RC007 en la producción de citoquinas en fluido intestinal de ratones BALB/c.	
27	Ganancia de peso total (kg) de los pollos parrilleros en los distintos tratamientos.	129
28	Consumo diario de los pollos parrilleros en los distintos tratamientos.	130
29	Índice de conversión por día de los pollos parrilleros en los distintos tratamientos.	130
30	Porcentaje en peso de las carcasas (g) de los pollos parrilleros en los distintos tratamientos.	132
31	Parámetros bioquímicos a partir de sueros de pollos parrilleros en los distintos tratamientos.	133
32	Parámetros bioquímicos a partir de sueros de pollos parrilleros en los distintos tratamientos.	134
33	Porcentaje en peso de los órganos inmunes de pollos parrilleros en los distintos tratamientos.	136
34	Porcentaje de peso relativo de los hígados de pollos parrilleros en los distintos tratamientos.	137

## ***Introducción***

---

## **INDUSTRIA DE LOS ALIMENTOS DESTINADOS A LOS ANIMALES**

Según la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE), los países en desarrollo concentrarán el crecimiento demográfico a nivel mundial. Antes del año 2050, serán 9306 billones de personas en el planeta, 2410 billones más que en el año 2010. África y Asia, compuestos principalmente por países en desarrollo, concentrarán el 89,1% del número adicional de habitantes del planeta, junto con algunas naciones de América Latina. La Food and Agriculture Organization (FAO) (2009), revela que el consumo de carne mundial continúa en alza, a una velocidad mayor que el mismo crecimiento de la población. El documento “El Estado Mundial de la Agricultura y la Alimentación” de las Naciones Unidas, FAO (2009), revela que este crecimiento, acompañado de un aumento en los ingresos y la urbanización, en especial en los países en desarrollo, permiten estimar para el año 2050, un incremento en el consumo per cápita de todas las carnes de aproximadamente 36%. Al aumentar la cantidad de carne consumida, habrá un aumento en la demanda de alimentos balanceados, de sus ingredientes y suplementos.

La industria de la alimentación animal ha experimentado un crecimiento del 14,6% en los últimos cinco años, lo que equivale a un promedio anual de 2,76%. La producción mundial de alimento balanceado durante 2018 aumentó un 3%, alcanzando 1103 millones de toneladas, superando los 1000 millones de toneladas métricas por tercer año consecutivo. Son escasos los datos oficiales respecto de la producción de alimentos balanceados a nivel mundial; una empresa privada realizó una encuesta en el año 2018 (abarca 144 países y más de 30.000 fábricas de alimento balanceado donde se muestra que los 30 principales mercados –entre los que se encuentra la Argentina- poseen el 82% de las fábricas de alimento balanceado del mundo y producen el 86% del total global) que estima que en los últimos cinco años, la industria de alimento balanceado ha visto un crecimiento del 13%, lo que equivale a un promedio de 2,49% anual. China y Estados Unidos siguen siendo los dos principales países, produciendo un tercio de todo el alimento balanceado, y el crecimiento predominante proviene de los sectores de cerdos, pollo de engorde y ganado lechero, así como de las regiones de Europa y Asia-Pacífico. En América Latina Brasil sigue siendo el líder en la producción de alimento balanceado de la región y el tercero a nivel mundial. Brasil, México y Argentina representan casi el 75% de la producción regional de alimento balanceado. “La industria de alimentos balanceados en el país viene creciendo en los últimos diez años, acompañando a la producción intensiva como es la producción intensiva o en feed-lot, la industria avícola y la porcina; por lo tanto podemos decir que la región está muy bien

posicionada a nivel mundial en este tema”, sostuvo el presidente del Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA), Jorge Dillon, al disertar en la 5° Reunión del Comité Mixto de FeedLatina, que se realizó en Buenos Aires, entre el 12 y el 15 de junio. El funcionario del SENASA también dijo que “la Argentina está marcando un camino en cuanto a la resistencia antimicrobiana, mediante una estrategia nacional conformada por los ministerios nacionales de Agroindustria y de Salud” y afirmó que “la norma sancionada en 2015 en nuestro país establece que para 2019 no se acepten más registros de alimentos para animales que contengan medicamentos y que sean utilizados con el concepto de patrón de crecimiento” (<http://www.senasa.gob.ar/senasa-comunica/noticias/dillon-crece-la-industria-de-alimentos-balanceados-en-la-argentina>).

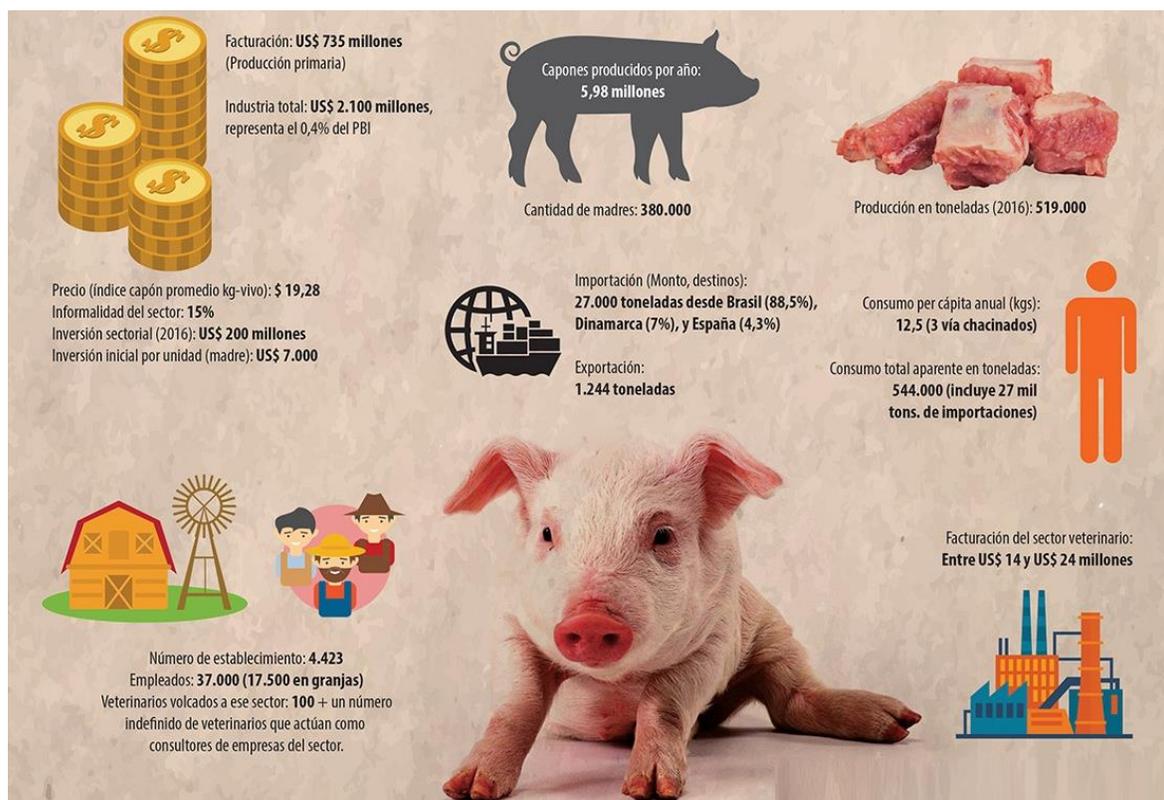
Argentina es un país que se ha caracterizado a lo largo del tiempo por su importante producción agropecuaria. Las características de su territorio, de grandes y fértiles extensiones han influido y potenciado el desarrollo de la actividad agrícola-ganadera, uno de los más importantes pilares sobre el que se asienta la economía argentina.

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.

La necesidad de incrementar la eficiencia productiva de los sistemas, no solo para aumentar la producción de carne sino para mejorar su competitividad, ha dado lugar a un proceso de intensificación de los sistemas productivos. Los sistemas pastoriles se han intensificado incorporando a la dieta de los animales forrajes conservados como ensilajes y/o henos y granos de cereales. Incluso la terminación en cría intensiva o “feed-lot” de los animales ha tenido un importante crecimiento en las últimas décadas (Rearte, 2011).

En cuanto a la producción porcina, la carne de cerdo es la más elegida por los consumidores en el mundo occidental. En Argentina, su popularidad viene en aumento: solo en 2016 incrementó otro kilo su participación en las mesas locales. Según las últimas cifras divulgadas por SENASA, la faena porcina alcanzó las 5,98 millones de cabezas y las 519000 toneladas de producción el año pasado, experimentando así incrementos del 8,4 y 7,1%, respectivamente en relación a 2015. Los datos oficiales dan cuenta de un consumo per

cápita cercano a los 12,5 kilos en los últimos 12 meses. La Figura 1 muestra el sector porcino en números del año 2016.



**Figura 1.** Actores intervinientes en la producción porcina en Argentina (SAGyP. 2016).

El mismo análisis puede realizarse para el sector de la producción avícola. La Figura 2 muestra los números de este sector productivo y muestra la evolución de la producción de carne y su aumento hasta el año 2017, posicionándose Argentina como el cuarto mayor productor de carne de pollo en América.

Al igual que en los sectores porcino y avícola se puede observar la composición del sector de producción de carne bovina en Argentina y los actores intervinientes (Figura 3).

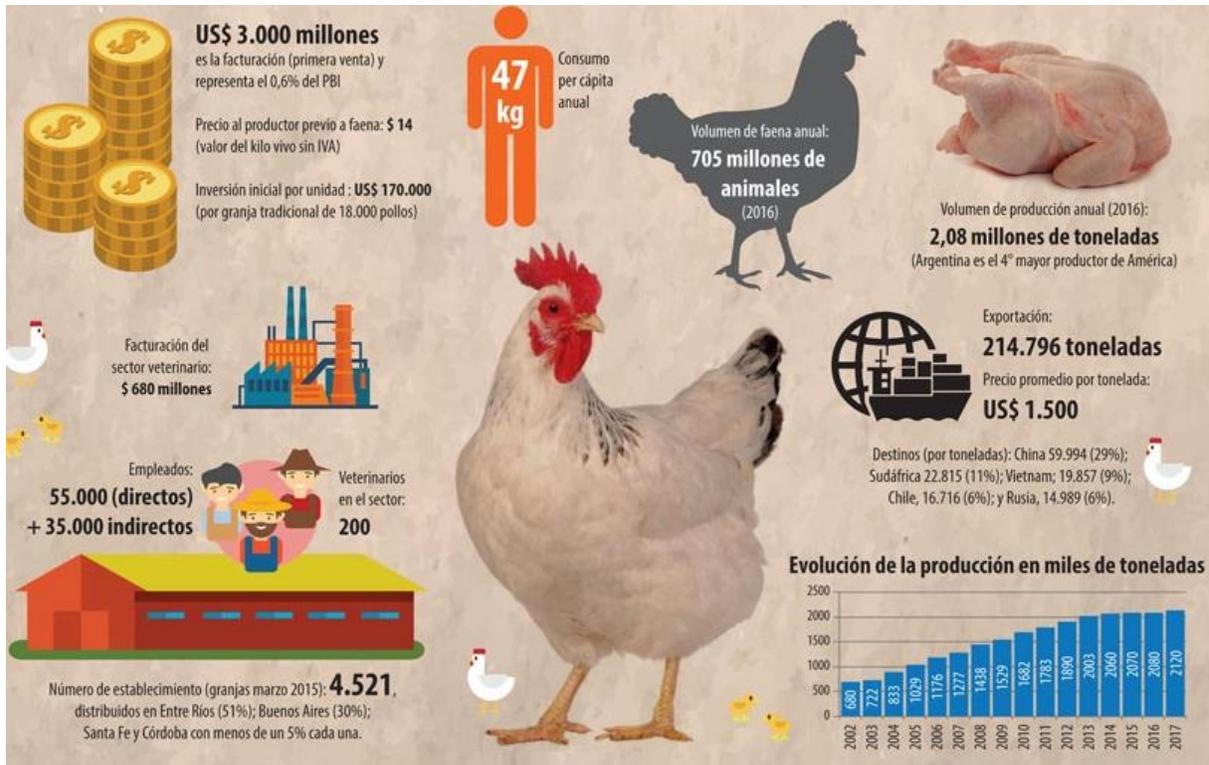


Figura 2. Actores intervinientes en la producción avícola en Argentina (SAGyP. 2016).

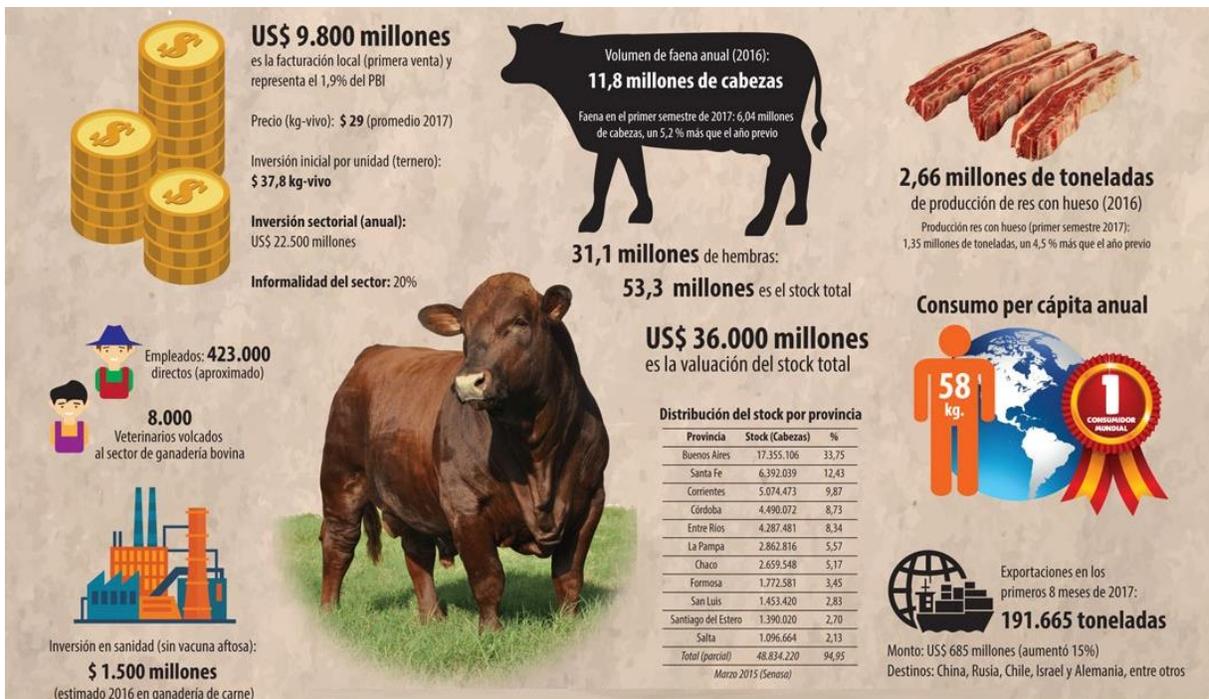


Figura 3. Actores intervinientes en la producción bovina en Argentina (SAGyP. 2016-2017).

Estos datos demuestran que con el aumento en las producciones y el consumo de carnes traerá aparejado un mayor consumo de alimentos balanceados y por consiguiente, insumos destinados a la sanidad animal entre ellos los aditivos para alimentación animal.

En el desarrollo de sistemas productivos intensivos, se han presentado diferentes desafíos frente a las enfermedades que pueden llegar a desarrollar los animales. La salud animal y el rendimiento del crecimiento se ven afectados por muchos factores, como la dieta, el estrés, los antibióticos y las prácticas modernas de cría. Los antibióticos se han incorporado como promotores de crecimiento en alimentos para animales durante los últimos 40 años (Daşkıran y col., 2012).

La producción de alimentos balanceados en Argentina está contemplada dentro del Plan Estratégico Agroalimentario 2020 (PEA2020). La Argentina del 2020 con pueblos y ciudades del interior con desarrollo sustentable bajo la órbita de una sociedad con alto compromiso social empresarial, ordenado y guiado por un plan estratégico municipal y regional en sintonía con el PEA 2020 (Figura 4).

## **ANTIBIÓTICOS PROMOTORES DE CRECIMIENTO**

El descubrimiento de los antibióticos fue uno de los logros más significativos de la medicina durante el siglo XX. Los antibióticos se han utilizado en diversas aplicaciones, incluida la medicina humana y animal, la producción de alimentos, la agricultura y las aplicaciones industriales, contribuyendo sustancialmente a la reducción de la carga de enfermedades infecciosas comunes en humanos y animales a nivel mundial (Laxminarayan y col., 2015).

En los animales de producción, los antibióticos se usan comúnmente con tres propósitos: razones terapéuticas (para curar una enfermedad), razones profilácticas (para prevenir una enfermedad) y como promotores del crecimiento (APC) (cantidades sub-terapéuticas de antibióticos aumentan las tasas de crecimiento de los animales y mejoran la eficiencia de la alimentación). Éstos contribuyen indirectamente a la seguridad alimentaria y a la economía de la producción animal (Laxminarayan y col., 2015). Durante muchas décadas, los APC se han utilizado como aditivos para piensos en diversas especies de animales de granja, para reducir la frecuencia de diarrea en ciertas condiciones. Además, en la mayoría de los casos, mejoraron los parámetros de rendimiento como el aumento de peso corporal o la conversión alimentaria. Estos efectos beneficiosos de los APC generalmente se explican por las modificaciones de las bacterias intestinales y su interacción con el huésped animal, incluidas las interacciones bacterianas con el tejido intestinal (recambio de células epiteliales,

revestimiento de la superficie, formación y secreción de mucinas, invasión celular y lesiones resultantes) así como el sistema inmunológico (respuesta de la población de linfocitos y formación y secreción de globulinas inmunes). Por lo tanto, la microbiota intestinal no solo participa en la conversión de nutrientes a lo largo del tracto gastrointestinal (TGI), sino que también puede afectar la salud animal (Simon y col., 2005).

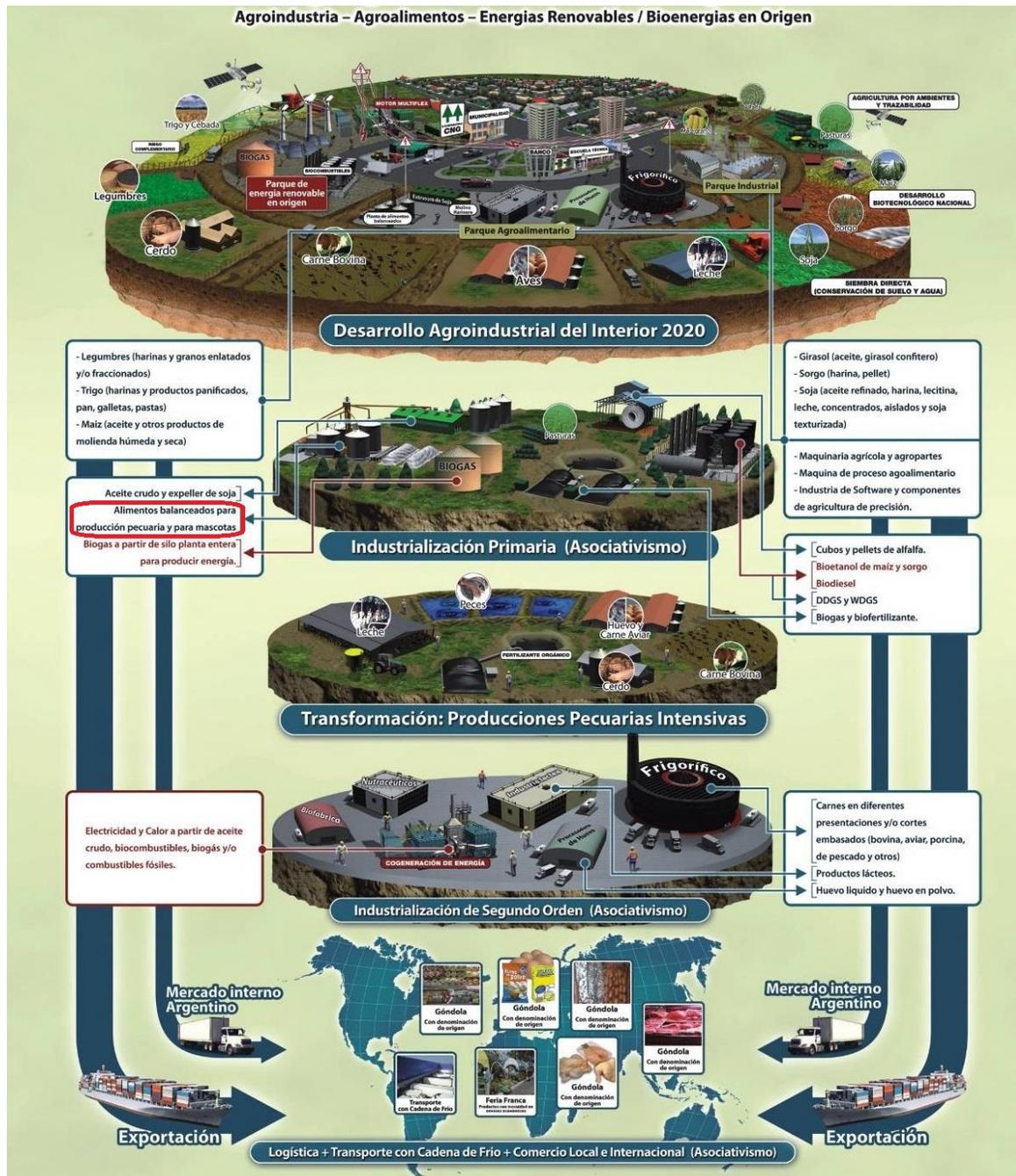


Figura 4. Plan Estratégico Agroalimentario 2020 (PEA2020).

Una amplia gama de antibióticos se utiliza en el ganado en todo el mundo (Page y Gautier, 2012). Las tres principales clases de antibióticos a la venta para uso animal en 2009 fueron los macrólidos (USD 0,6 billones), las penicilinas (USD 0,6 billones) y las tetraciclinas (USD 0,5 billones), tres clases de antibióticos considerados de importancia crítica en la medicina humana por la Organización Mundial de la Salud (WHO, 2011).

Durante varias décadas, los antibióticos se utilizaron como aditivos promotores del crecimiento animal para mejorar la salud y el bienestar de los animales, como así también para aumentar el crecimiento y la eficiencia de la conversión. Por otro lado, grandes cantidades de antibióticos se excretan en el medio ambiente a través de la orina y las heces de los animales constituyéndose los sistemas de eliminación de aguas residuales en una de las rutas más importantes por las cuales los antibióticos pueden ingresar al medio ambiente (Ronquillo y Hernández, 2017). El uso abusivo de antibióticos y la presión de selección asociada han llevado a una disminución de la eficacia terapéutica y han creado poblaciones de microorganismos resistentes a los antibióticos. *Campylobacter sp.*, *Escherichia coli* (*E. coli* O157) y *Salmonella sp.* son bacterias transmitidas por alimentos y generalizadas en el mundo, cuyas infecciones causan gastroenteritis con distinto grado de gravedad de acuerdo a la población afectada, se han informado tasas de contaminación en pollos por *E. coli*, *Campylobacter* y *Salmonella sp.* del 96%, 25% y 34% respectivamente (CSCRA, 2016) y resistencia multi-farmacológica en aislados de *Enterobacteriaceae* a partir de huevos y carne de pollo, además de sus residuos en productos de origen animal (Ronquillo y Hernández, 2017; Yulistiani y col., 2017). Braykov y col. (2016) mostraron que la resistencia a la tetraciclina se detectó en el 78% de cepas aisladas de los pollos de engorde y ponedoras. La Figura 5 muestra la propagación de la resistencia a los antibióticos según la OMS (WHO, 2014 a, b)

Debido a la aparición de microorganismos resistentes a los antibióticos que se usan para tratar infecciones humanas y animales, la Comisión Europea (CE) decidió eliminar, y finalmente prohibir (1 de enero de 2006), la comercialización y el uso de antibióticos como promotores del crecimiento en los piensos (Reglamento CE n° 1831/20031). Esta decisión política se adoptó invocando el principio de precaución: "Cuando haya amenazas de daños graves o irreversibles, la falta de certeza científica absoluta no se utilizará como razón para posponer medidas eficaces en función de los costos para prevenir la degradación ambiental" (Principio 15 de la Declaración de Río, 1992). En un contexto en el que la eficacia de los antimicrobianos se enfrenta cada vez más a la emergencia de la resistencia bacteriana, es

importante realizar un uso prudente y responsable de los agentes antimicrobianos por parte de veterinarios y productores. Argentina desde el 2015, es uno de los primeros países de América en comenzar a trabajar bajo el concepto “Una salud” a partir de una resolución ministerial, con el objetivo de mejorar las condiciones sanitarias de la población. En este sentido, el SENASA creó el Programa Nacional de Vigilancia de la Resistencia Antimicrobiana en animales destinados al consumo humano para prevenir la generación y difusión de bacterias que resisten la acción de los fármacos que las controlan. La medida está contemplada en la Resolución SENASA 591 del 24 de noviembre de 2015, publicada en el Boletín Oficial, la cual en su Art. 12, inc. c. menciona “El SENASA no aceptará solicitudes de registro de alimentos para animales con antibióticos, antiparasitarios o coccidiostáticos a partir del 1 de julio de 2017. Además menciona en el inc. d. “A partir del 2 de enero de 2019 quedan automáticamente dados de baja los registros y certificados de uso y comercialización de alimentos para animales con antibióticos, antiparasitarios o coccidiostáticos”. El 28 de diciembre de 2018 una nueva modificación a la Res 591/15 establece una prórroga de modo tal que a partir del 1 de julio de 2020 no se aceptará el registro de alimentos destinados a producción animal que contengan ATB, antiparasitarios o coccidiostáticos. La presión de los consumidores y su preocupación por los efectos nocivos del uso de antibióticos y la prohibición de los antibióticos en la UE han llevado a los investigadores a pensar en alternativas a los antibióticos como promotores del crecimiento animal. Partiendo de la premisa que no hay producción sustentable sin una sanidad controlada, se hace necesaria la implementación de estrategias biológicas, en reemplazo de los antibióticos que pueden afectar no sólo la cadena alimentaria sino la posibilidad de acceder a mercados internacionales con mayores niveles de exigencia. Entre ellas se proponen los probióticos, los prebióticos, las enzimas y los aditivos fitobióticos, entre otros. Para ser aceptados por la industria, los efectos de estos productos deben ser demostrados por una mejora de los rendimientos productivos de los animales similar a la alcanzada con los APC.

La prohibición total del uso de APC puede tener repercusiones sobre la salud de los animales y de los consumidores, así como sobre el medio ambiente. Asimismo, esta prohibición tendrá importantes implicaciones económicas. Debido a la actividad antimicrobiana de los APC, algunos investigadores han sugerido que la supresión de estas sustancias puede provocar un aumento de la incidencia de determinadas patologías en los animales (diarreas, acidosis, timpanismo, etc.). Sin embargo, otros autores sugieren que si se toman medidas para mejorar el estado higiénico-sanitario de los animales se pueden paliar estos posibles efectos negativos sobre su salud y bienestar. Esta prohibición tendrá

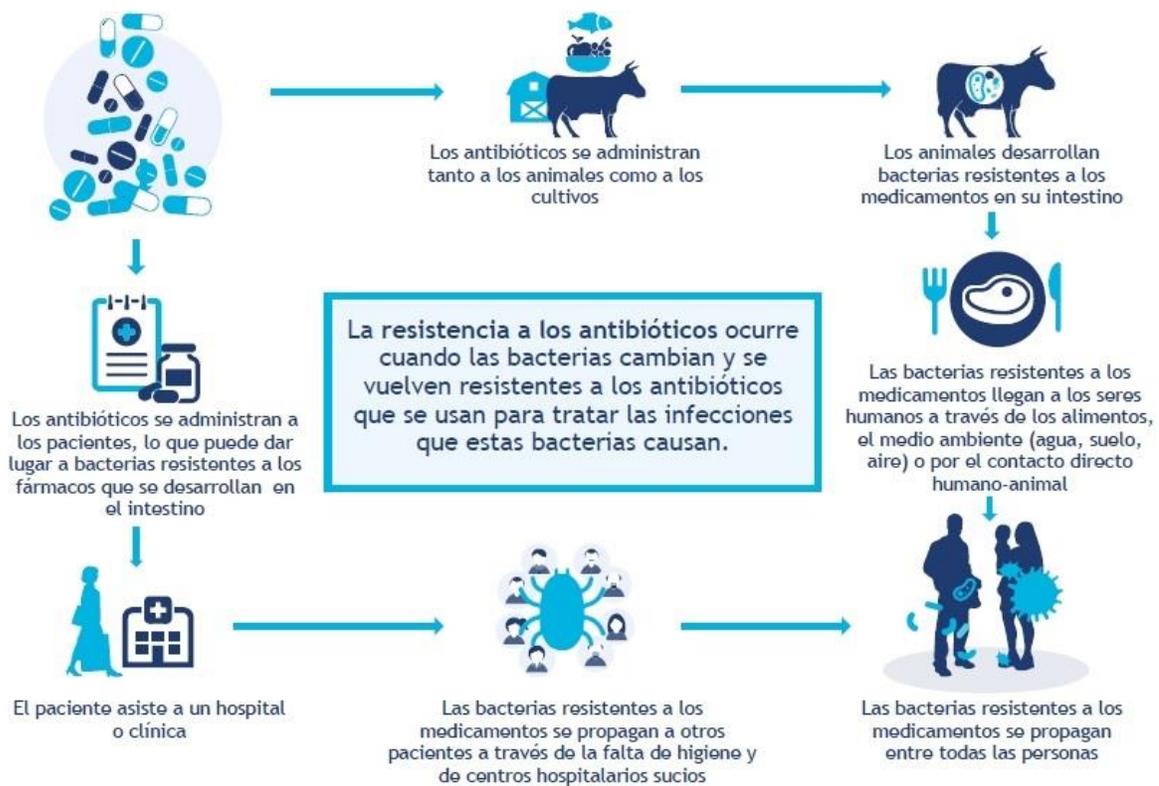
importantes implicaciones económicas en el sector zootécnico, ya que conllevará un aumento de los costos de producción. En nuestro país, se ha estimado que la prohibición del uso de APC puede provocar un aumento global de los costos de producción entre el 3,5 y el 5%, según la producción considerada.

Las mejoras en eficiencia productiva del animal con el uso de APC deberán ser remplazadas con otro tipo de mecanismo de control antimicrobiano; así como las mejoras en la eficiencia productiva del animal, podrán ser logradas sobre la base de un mejor entendimiento y manipulación de los factores que regulan la disponibilidad y utilización de nutrientes en el tracto digestivo del animal (salud intestinal).

Actualmente, un buen número de investigaciones se centran en el desarrollo de alternativas a los antibióticos para mantener o mejorar la salud y aumentar la disponibilidad de nutrientes y el rendimiento de los animales y también en demostrar que sean seguras en cuanto a los riesgos para la salud humana, la salud animal y el medio ambiente (Lillehoj y col., 2018).

### **ALTERNATIVAS AL USO DE ANTIBIÓTICOS PROMOTORES DE CRECIMIENTO**

Dentro de las principales prácticas descritas para afrontar las posibles pérdidas en la eficiencia productiva de los animales cuando los APC no sean utilizados en sus dietas, estarían aquellas encaminadas a mejorar las condiciones de bienestar y de salud del animal: 1) un mejor manejo de los animales, instalaciones y densidades de población; 2) mejora de las medidas de bioseguridad e higiene 3) cambios en los programas de alimentación, ingredientes y formulación de dietas y 4) aplicación de nuevas vacunas. Sumadas a estas medidas, el empleo en las dietas de nuevos aditivos no-antimicrobianos que puedan ejercer efectos en el animal de tipo nutricional o de mejorar las condiciones de salud del tracto digestivo (nutracéuticos): enzimas, microorganismos, extractos de plantas, ácidos orgánicos, manano-oligosacáridos e inmuno-estimulantes (polisacáridos), son actualmente y serán empleados en la nutrición moderna como alternativas para mejorar la productividad del animal ante la ausencia de APC (Gadde y col., 2017).



**Figura 5.** Propagación de la resistencia a los antibióticos – OMS (WHO, 2014 a, b).

## ADITIVOS PARA ALIMENTACIÓN ANIMAL

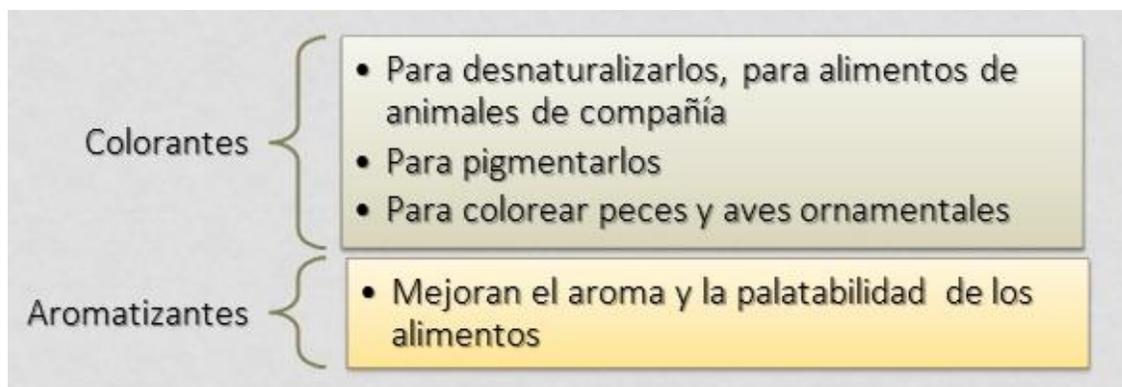
Según la CE, los aditivos para piensos son productos utilizados en la nutrición animal para mejorar la calidad del alimento y la calidad del alimento de origen animal, o para mejorar el rendimiento y la salud de los animales, por ejemplo, proporcionando una mejor digestibilidad de los materiales del alimento y además demostrar que el aditivo no tiene efectos nocivos para la salud humana y animal ni para el medio ambiente.

Debido a la preocupación de que el uso de antibióticos como aditivo para alimentos podría contribuir a un aumento de la resistencia a los antibióticos bacterianos, la Unión Europea (UE) prohibió el uso de los antibióticos como aditivos para alimentos. Por lo tanto, se iniciaron muchas actividades para establecer otras sustancias con efectos beneficiosos en animales a través de modificaciones de la microbiota intestinal. El Reglamento (EC) N° 1831/2003 clasifica a los aditivos para alimentación animal en las siguientes cinco categorías:

a) **Aditivos tecnológicos**, que se definen como cualquier sustancia añadida a los piensos con fines tecnológicos y que incluyen a los conservantes, antioxidantes, emulgentes, estabilizantes, espesantes, gelificantes, ligantes, antiaglomerantes, reguladores de la acidez, aditivos para ensilaje y desnaturalizantes.



b) **Aditivos organolépticos**, que se definen como cualquier sustancia que, añadida a los piensos, mejora o modifica las propiedades organolépticas de éstos o las características visuales de los alimentos de origen animal y que incluyen a los colorantes y aromatizantes.



c) **Aditivos nutricionales**, que incluyen a las vitaminas, provitaminas y sustancias químicamente definidas de efecto análogo, oligoelementos o compuestos de oligoelementos, aminoácidos, sus sales y análogos, y a la urea y sus derivados.



d) **Aditivos zootécnicos**, que se definen como cualquier aditivo utilizado para influir positivamente en la productividad de los animales sanos o en el medio ambiente y que incluyen a diversos grupos funcionales, como los digestivos, los estabilizadores de la flora intestinal, las sustancias que influyen positivamente en el medio ambiente y a otros aditivos zootécnicos.

e) **Coccidiostáticos e histomonostáticos**, de los cinco grupos de aditivos, y desde el punto de vista de la producción animal, los aditivos zootécnicos son uno de los grupos que suscita mayor interés, ya que su utilización puede mejorar el rendimiento productivo de los animales y disminuir los costos de producción.



## NORMATIVA RELATIVA A LOS ADITIVOS PARA PIENSOS PARA USO ANIMAL

Un aditivo zootécnico es cualquier aditivo que no sea el material de alimentación y las mezclas previas que se utilizan para afectar favorablemente el rendimiento de los animales que gozan de buena salud o que se utilizan para afectar favorablemente el medio ambiente. La categoría "aditivo zootécnico" se puede dividir en cuatro grupos funcionales: (1) potenciadores de digestibilidad; estas son sustancias que, cuando se alimentan a los animales, aumentan la digestibilidad de la dieta, a través de la acción sobre los materiales de alimentación específicos; (2) estabilizadores de la flora intestinal; estos son microorganismos u otras sustancias definidas químicamente que, cuando se administran a los animales, tienen un efecto positivo en la flora intestinal; (3) sustancias que afectan favorablemente al medio ambiente; (4) Otros aditivos zootécnicos. (Thacker 2013).

Dentro de este grupo de aditivos se encuentran principalmente los prebióticos, las enzimas, los fitobióticos, secuestrantes de micotoxinas y los probióticos.

Los **prebióticos** son componentes de alimentos no digeribles que son potencialmente beneficiosos para la salud del huésped debido a sus propiedades fermentables que estimulan el crecimiento y / o actividad bacteriana en el íleon, las bacterias pueden metabolizarlas para producir ácidos grasos de cadena corta como propionato, acetato y butirato (Józefiak y col., 2008). Generalmente consiste en polisacáridos de cadena corta y oligosacáridos. Varios prebióticos se generan a partir de las paredes celulares de levadura. Tienen efectos positivos en la productividad avícola y contribuyen a un tracto intestinal saludable y pueden ser una buena alternativa a los antibióticos (Morales-Lopez y col., 2009). La administración de prebióticos (0,2%) en la dieta de pollo confiere beneficios de salud intestinal sobre los antibióticos. Estas ventajas se expresan mediante una reducción de las bacterias patógenas, un desarrollo morfológico (altura de las vellosidades y número de células caliciformes) y una mayor colonización por bacterias beneficiosas (Baurhoo y col., 2009).

Las **enzimas** utilizadas en la alimentación se producen a través de la fermentación de hongos y bacterias. Las enzimas facilitan la degradación de componentes tales como proteínas, fitatos y glucanos. La tecnología de enzimas alimentarias ha ganado un incremento en su aceptación a lo largo de los últimos 15 años y hoy se considera una importante herramienta requerida para la alimentación eficiente y limpia de los animales de producción. Endo- $\beta$ -1-4-xilanasas y  $\beta$ -1-3,1-4-glucanasas se han utilizado en dietas de trigo y

cebada de pollos de engorde para mejorar su digestión (Cowieson y col., 2006). Además, la enzima fitasa puede aumentar el ancho de las vellosidades y disminuir la profundidad de las criptas, lo que puede mejorar la ADG (Mohammadagheri y col., 2016).

Los **aditivos fitogénicos** para piensos derivados de plantas, hierbas y especias se utilizan para mejorar el rendimiento animal. Han sido muy exitosos debido a sus efectos positivos sobre el crecimiento, la mejora del sistema inmune y la reducción de la respuesta al estrés. Los resultados recientes mostraron que las ALP eran buenas alternativas a los antibióticos y promovieron el crecimiento del pollo de engorde (Ghasemi y col. 2014; Li y col., 2015; Toghyani y col., 2011).

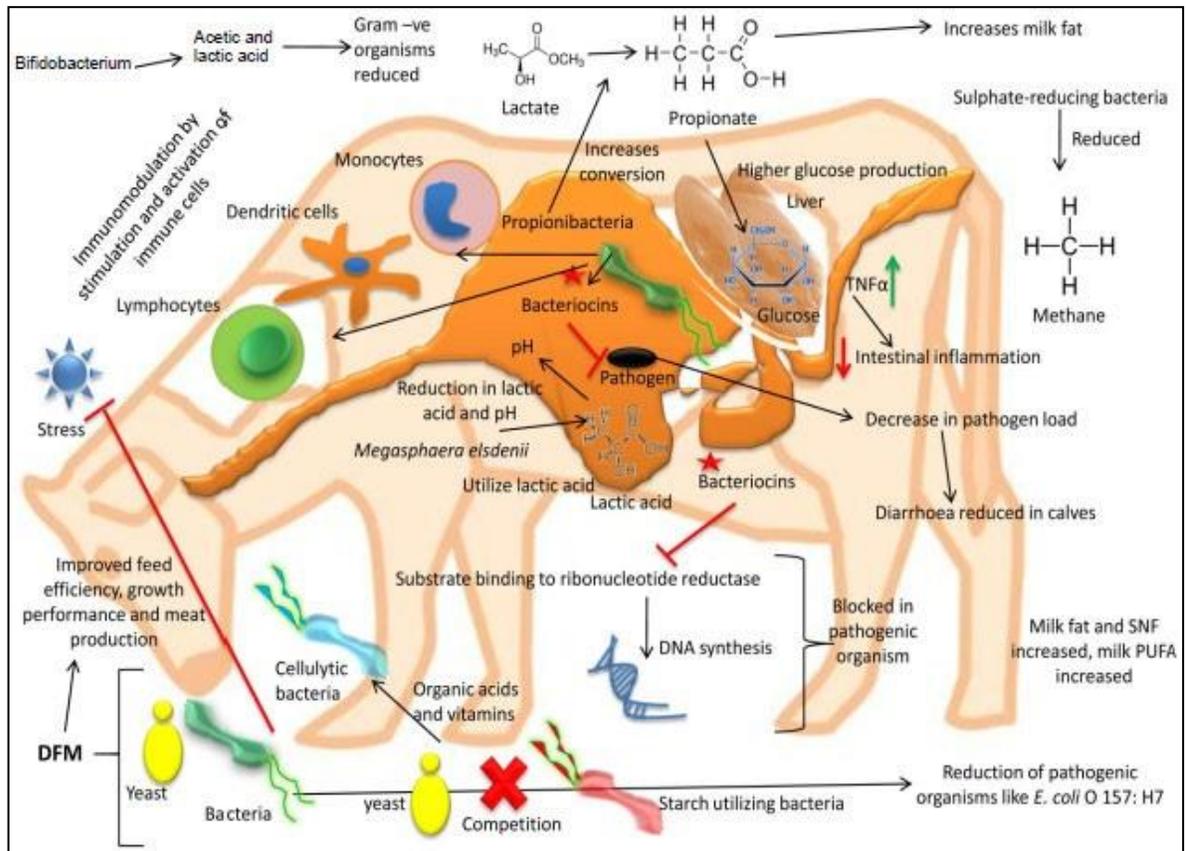
La incorporación de componentes como **péptidos bioactivos** (PB) en sistemas alimentarios, permite de manera simple el desarrollo de alimentos funcionales novedosos. Los PB liberados pueden inducir un amplio rango de funcionalidades, entre las que se destacan actividad antimicrobiana, efecto antihipertensivo, actividad antioxidante y efecto inmunomodulador en sistemas vivos, incrementando su potencial empleo para fines terapéuticos (Agyei y Danquah 2011). Numerosa evidencia clínica y experimental ha demostrado que el estrés oxidativo es un serio problema, debido a sus implicancias en la salud de los animales y sus crías. Se considera que es un factor de riesgo en la reducción de los mecanismos de defensa, asociado con diversos procesos patológicos de la medicina veterinaria.

Las **micotoxinas** están siempre presentes como contaminantes naturales de granos, semillas y forrajes que son las principales materias primas utilizadas en la elaboración de alimentos destinados a la nutrición animal. Numerosos estudios han demostrado la incidencia de los principales hongos y toxinas fúngicas en ingredientes e insumos terminados destinados a la alimentación animal (González Pereyra y col., 2008; Magnoli y col., 2002; Alonso y col., 2009; Cavaglieri y col., 2009; Fernández Juri y col., 2009; González Pereyra y col., 2008), muchos de las cuales se encontraron por encima de los niveles tolerados por las reglamentaciones internacionales. Diversos trabajos alrededor del mundo documentan la capacidad de diferentes microorganismos para adsorber o degradar micotoxinas (bacterias, levaduras y hongos) (Hathout y col., 2011; Adebo y col., 2017, Vanhoutte y col., 2016, González Pereyra y col., 2018). Nuevas investigaciones sobre las vías de detoxificación se basan en vías de biodegradación conocidas de otras sustancias que no son micotoxinas pero que poseen grupos químicos similares que pueden ser el blanco de enzimas producidas por microorganismos.

## PROBIÓTICOS

Los probióticos han sido definidos como “microorganismos vivos que administrados en cantidades adecuadas confieren beneficios para la salud del huésped” (FAO/WHO 2001). El uso de probióticos en alimentación también se conoce DFM (del inglés direct-fed microbials, que significa alimentación directa microbiana). Entre los microorganismos probióticos más utilizados en alimentación animal se encuentran las bacterias ácido-lácticas (BAL), especialmente las del género *Lactobacillus*, *Enterococcus* y *Pediococcus*, y las levaduras, fundamentalmente las del género *Saccharomyces*. Los probióticos se han consolidado como una de las alternativas naturales al uso de los antibióticos promotores de crecimiento en animales, pues no generan efectos colaterales y producen mejor digestibilidad, ganancia en peso y mayor índice de conversión alimentaria.

También conocidos como microorganismos de alimentación directa (“direct-fed microbials” - DFM), la suplementación con probióticos se considera una alternativa para disminuir el uso de antibióticos (Blajman y col., 2015; Frizzo y col., 2011). El uso de probióticos en animales de producción está destinado a mejorar la conversión alimenticia, a promover el crecimiento e inhibir el desarrollo de bacterias patógenas (Rosmini y col., 2004; Blajman y col., 2015). El avance en el estado del conocimiento sobre el uso de probióticos puede sustituir las terapias con antibióticos y brinda así una nueva alternativa menos agresiva para los animales (Caly y col., 2015). En la Figura 6 se observa una descripción general de los modos de acción y aplicaciones beneficiosas de DFM para mejorar la producción de rumiantes y proteger la salud. En las siguientes secciones se analizan diversas aplicaciones beneficiosas de los DFM en rumiantes (efecto sobre el rendimiento de los rumiantes, la productividad, las actividades inmunomoduladoras, la protección contra patógenos/infecciones, la protección de la salud y la mitigación de la emisión de metano).



**Figura 6.** Esquema general de las aplicaciones beneficiosas de DFM en rumiantes.

La eficacia de estos preparados microbianos depende de su capacidad para mantener su viabilidad e integridad fisiológica, ya que suelen administrarse con el alimento o el agua de bebida. Estos microorganismos deben ser capaces de soportar el procesamiento tecnológico por ejemplo las altas temperaturas utilizadas en algunos de los procesos de fabricación de piensos (granulación, extrusión). Para que puedan sobrevivir en estas condiciones deben ser protegidos mediante diferentes tratamientos que aseguren su eficacia, lo que suele encarecer el precio del producto comercial. En cualquier caso, para garantizar la máxima eficacia, los microorganismos deben mantenerse viables hasta su administración al animal (Carro y col., 2006).

Entre los microorganismos con gran potencial probiótico se encuentran algunas especies bacterianas del género *Lactobacillus* y *Bifidobacteria* y las levaduras. Los microorganismos que se han utilizado como probióticos en la alimentación animal se enumeran en la Tabla 1 (FAO, 2016).

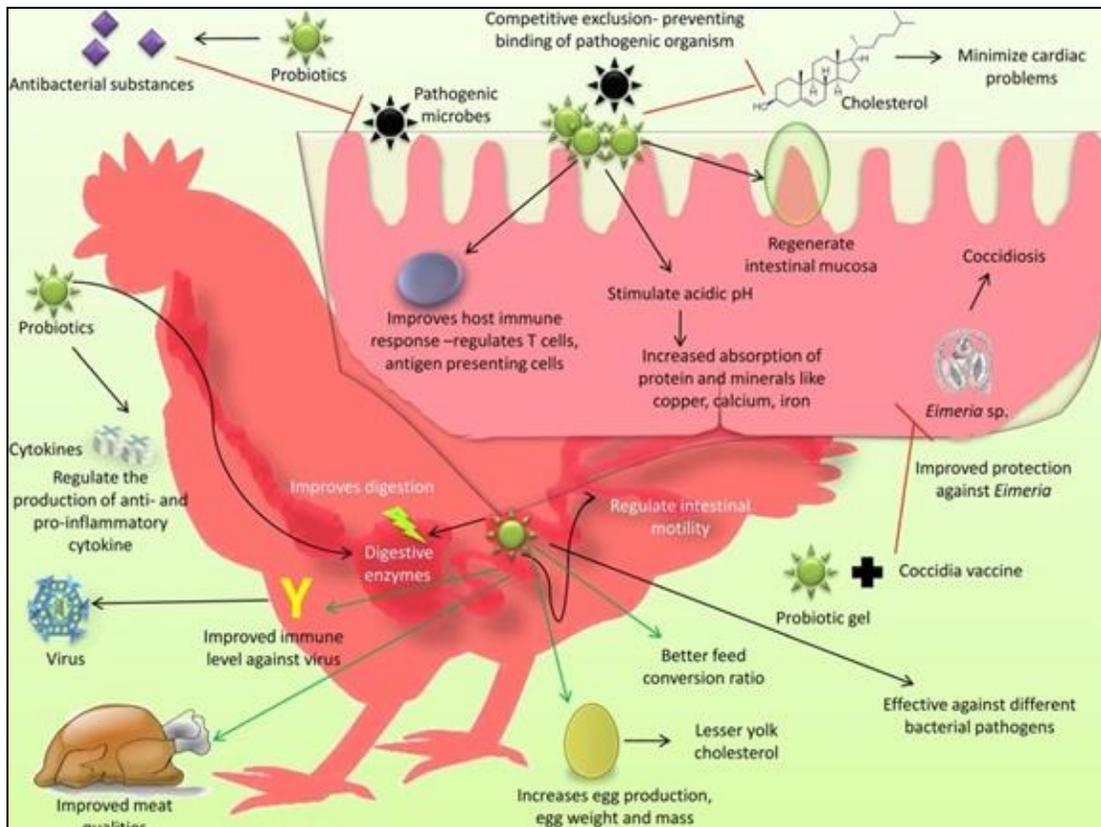
**Tabla 1.** Microorganismos utilizados como probióticos en alimentación animal.

Species	Strain	Commercial products containing the species	References
<b>BACILLUS</b>			
<i>amylolique-faciens</i>	CECT 5940 H57	Ecobiol Norel Animal Nutrition, Madrid, Spain	Ortiz <i>et al.</i> , 2013
<i>toyonensis</i>	BCT-7112	Toyocerin Rubinum S.A., Barcelona, Spain	Taras <i>et al.</i> , 2005; Kantas <i>et al.</i> , 2015
<i>coagulans</i>	ATCC 7050 ZJU0616	–	Adami and Cavazzoni, 1999; Hung <i>et al.</i> , 2012
<i>licheniformis</i>	DSM 5749	Microguard, PeterLab Holdings, Negeri Sembilan, Malaysia, LSP 122 Alpharma, Vega Baja, Puerto Rico, BioPlus 2B Chr Hansen, Hørsholm, Denmark, Probios Chr Hansen, Hørsholm, Denmark, BioPlus YC Evonik Industries, Essen, Germany	Alexopoulos <i>et al.</i> , 2004a; Rahman <i>et al.</i> , 2013
<i>megaterium</i>	–	Microguard, PeterLab Holdings, Negeri Sembilan, Malaysia	Rahman <i>et al.</i> , 2013
<i>mesentericus</i>	–	Microguard, PeterLab Holdings, Negeri Sembilan, Malaysia	Rahman <i>et al.</i> , 2013
<i>polymyxa</i>	–	Microguard, PeterLab Holdings, Negeri Sembilan, Malaysia	Rahman <i>et al.</i> , 2013
<i>subtilis</i>	588, CA #20, DSM 17299, PB6, ATCC-PTA 6737, DSM 5750	GalliPro Evonik Industries, Essen, Germany, Microguard, PeterLab Holdings, Negeri Sembilan, Malaysia, Super-CyC Choong Ang Biotech Co. Ltd., Gyeonggy, South Korea, CloSTATTM Kemir Industries Inc., Des Moines, USA, MicroSource 5 Agtech Products Inc., Waukesha, USA, BioPlus 2B Chr Hansen, Hørsholm, Denmark, Probios Chr Hansen, Hørsholm, Denmark, BioPlus YC Evonik Industries, Essen, Germany, Enviva Pro DANISCO Animal Nutrition, Wiltshire, UK, Probion Woogene B&G Co. Ltd., Seoul, South Korea	Alexopoulos <i>et al.</i> , 2004a; Davis <i>et al.</i> , 2008; Rahman <i>et al.</i> , 2013; Afsharmanesh and Sadaghi, 2014
<b>BIFIDOBACTERIUM</b>			
<i>animalis</i>	503, DSM 16284	PoultryStar ME BIOMIN GmbH, Getzersdorf, Austria, Probios Chr Hansen, Hørsholm, Denmark	Mountzouris <i>et al.</i> , 2010; Giannenas <i>et al.</i> , 2012; Wideman <i>et al.</i> , 2012
<i>bifidium</i>	–	PrimaLac Star Labs, Inc., Clarksdale, USA, Protexin International Animal Health Products, Huntingwood, Australia	Haghighi <i>et al.</i> , 2008; Daskiran <i>et al.</i> , 2012; Landy and Kavyani, 2013
<i>bifidus</i>	–	Microguard PeterLab Holdings, Negeri Sembilan, Malaysia	Rahman <i>et al.</i> , 2013
<i>thermophilus</i>	–	PrimaLac Star Labs, Inc., Clarksdale, USA,	Khaksar, Golian and Kermanshahi, 2012; Pedroso <i>et al.</i> , 2013
<i>longum</i>	–	–	Seo <i>et al.</i> , 2010
<i>pseudo-longum</i>	–	–	Seo <i>et al.</i> , 2010
<i>lactis</i>	–	–	Seo <i>et al.</i> , 2010
<b>LACTOCOCCUS</b>			
<i>lactis</i>	CECT 539	–	Fajardo <i>et al.</i> , 2012
<b>PEDIOCOCCUS</b>			
<i>acidilactici</i>	DSM 16210	All-Lac Alltech Inc., Nicholasville, USA, PoultryStar ME BIOMIN GmbH, Getzersdorf, Austria	Mountzouris <i>et al.</i> , 2010; Wideman <i>et al.</i> , 2012; Pedroso <i>et al.</i> , 2013
<i>parvulus</i>	–	FloraMax-B11 Pacific Vet Group, Fayetteville, USA	Biloni <i>et al.</i> , 2013
<b>LACTOBACILLUS</b>			
<i>thermophilus</i>	–	All-Lac Alltech Inc., Nicholasville, USA	Pedroso <i>et al.</i> , 2013
<i>acidophilus</i>	–	Probios Chr Hansen, Hørsholm, Denmark, Microguard PeterLab Holdings, Negeri Sembilan, Malaysia, Protexin International Animal Health Products, Huntingwood Australia, UltraCruz Santa Cruz Animal Health, Paso Robles, USA, PrimaLac, Avian PAC Soluble, Probion Woogene B&G Co. Ltd., Seoul, South Korea	Morishita <i>et al.</i> , 1997; Haghighi <i>et al.</i> , 2008; Daskiran <i>et al.</i> , 2012; Khaksar, Golian and Kermanshahi, 2012; Shim <i>et al.</i> , 2012; Rahman <i>et al.</i> , 2013; Zhanq <i>et al.</i> , 2014a

<i>brevis</i>	I 12, I 211, I 218, I 23, I 25	–	Mookiah <i>et al.</i> , 2014
<i>bulgaricus</i>	–	Microguard, PeterLab Holdings, Negeri Sembilan, Malaysia, Protexin International Animal Health Products, Huntingwood, Australia	Daskiran <i>et al.</i> , 2012; Rahman <i>et al.</i> , 2013
<i>casei</i>	CECT 4043	PrimaLac Star Labs, Inc., Clarksdale, USA, , Probios, UltraCruz Santa Cruz Animal Health, Paso Robles, USA	Fajardo <i>et al.</i> , 2012; Khaksar, Golian and Kermanshahi, 2012; Landy and Kavyani, 2013
<i>delbrueckii subspecies bulgaricus</i>	–	Protexin International Animal Health Products, Huntingwood, Australia	Daskiran <i>et al.</i> , 2012
<i>farciminis</i>	–	Enviva MPI DANISCO Animal Nutrition, Wiltshire, UK	–
<i>fermentum</i>	JS	JSA-101 Gold Well-being LS Co. Ltd., Gangwon, Korea	Bai <i>et al.</i> , 2013
<i>gallinarum</i>	I 16, I 26, LCB 12	–	Ohya, Marubashi and Ito, 2000; Mookiah <i>et al.</i> , 2014
<i>jensenii</i>	–	–	Sato <i>et al.</i> , 2009
<i>paracasei</i>	–	–	Bomba <i>et al.</i> , 2002
<i>plantarum</i>	–	Microguard PeterLab Holdings, Negeri Sembilan, Malaysia, Protexin International Animal Health Products, Huntingwood, Australia, UltraCruz Santa Cruz Animal Health, Paso Robles, USA, Probios Chr Hansen, Hørsholm, Denmark	Daskiran <i>et al.</i> , 2012; Rahman <i>et al.</i> , 2013
<i>reuteri</i>	514, C 1, C10, C16, DSM 16350, DSM 16350	PoultryStar ME BIOMIN GmbH, Getzersdorf, Austria	Mountzouris <i>et al.</i> , 2010; Giannenas <i>et al.</i> , 2012; Wideman <i>et al.</i> , 2012; Mookiah <i>et al.</i> , 2014
<i>rhamnosus</i>	–	Protexin International Animal Health Products, Huntingwood, Australia, Enviva MPI DANISCO Animal Nutrition, Wiltshire, UK	Daskiran <i>et al.</i> , 2012; Hashemzadeh <i>et al.</i> , 2013
<i>lactis</i>	–	Probios Chr Hansen, Hørsholm, Denmark	
<i>salivarius</i>	DSM 16351, I 24	FloraMax-B11 Pacific Vet Group, Fayetteville , USA, PoultryStar ME BIOMIN GmbH, Getzersdorf, Austria	Mountzouris <i>et al.</i> , 2010; Biloni <i>et al.</i> , 2013; Mookiah <i>et al.</i> , 2014
<i>sobrius</i>	–	–	Konstantinov <i>et al.</i> , 2008
<b>SACCHAROMYCES</b>			
<i>bourirdii</i>	–	Microguard, PeterLab Holdings, Negeri Sembilan, Malaysia	Rahman <i>et al.</i> , 2013
<i>cerevisiae</i>	KCTC No.7193	JSA-101 Gold, Super-CyC Choong Ang Biotech Co. Ltd., Gyeonggi, South Korea	Shim <i>et al.</i> , 2012; Abdel-Rahman <i>et al.</i> , 2013; Bai <i>et al.</i> , 2013
<i>servisia</i>	–	Bro-biofair Vitality Co., Egypt	Abdel-Raheem, Abd-Allah and Hassanein, 2012

Además de no ser patógenos para los animales, los microorganismos utilizados como probióticos se seleccionan en función de su supervivencia en el entorno gastrointestinal y su capacidad para soportar un pH bajo y altas concentraciones de ácidos biliares. Además, la cepa elegida debe tolerar los procesos de fabricación, transporte, almacenamiento y aplicación, manteniendo su viabilidad y las características deseables (Collado y Sanz, 2006; Mishra y Prasad, 2005). La Figura 7 representa una visión general de los mecanismos de acción y aplicaciones beneficiosas de los probióticos para mejorar la producción de las aves

y proteger la salud. La capacidad de crecer rápidamente en medios de bajo costo es un requisito para una producción económicamente viable. Por lo tanto, un microorganismo probiótico ideal debería ser capaz de soportar el procesamiento y el almacenamiento, sobrevivir en el ambiente gástrico ácido, adherirse al epitelio intestinal, producir compuestos antimicrobianos, y modular la respuesta inmune. Sin embargo, no todas las cepas exhiben todas las propiedades anteriores y se debe tener cuidado para seleccionar las cepas o sus combinaciones que lograrán el máximo efecto beneficioso *in vivo* (Cheng y col., 2014).



**Figura 7.** Esquema general de los mecanismos de acción y aplicaciones beneficiosas de los probióticos en aves.

## SALUD INTESTINAL

La suplementación con probióticos alimenticios mejora el crecimiento, la eficiencia alimenticia y la salud intestinal (Ghasemi y col., 2014; Giannenas y col., 2012; Samli y col., 2007).

Los aditivos se agregan comúnmente a las dietas de los animales para estimular el rendimiento de la producción y para mejorar el bienestar y la salud, especialmente en períodos estresantes de la vida. El rendimiento de producción más alto generalmente será el

resultado de una mayor ingesta de alimento, mejor digestión y absorción de nutrientes, de una mejor salud intestinal o resistencia frente a los desafíos sistémicos o una combinación de ellos. Muchos aditivos para piensos tienen un efecto directo o indirecto en la mejora de la integridad del epitelio intestinal y en la cantidad de sustrato fermentable disponible para la microbiota intestinal.

Debido a la gran variedad de modos de acción por los cuales los aditivos alimentarios pueden estimular el consumo de alimento (mejorando la integridad intestinal, previniendo el daño intestinal, compensando los requerimientos nutricionales adicionales para la respuesta inmune, reduciendo la cantidad de sustrato para la microbiota o previniendo la inflamación) o reduciendo la ingesta de alimentos (mediante la adición de enzimas alimentarias para mejorar el valor energético de la dieta o el rechazo de alimentos debido a problemas organolépticos asociados con la adición de ácidos grasos de cadena media y ácidos orgánicos a altos niveles de inclusión) es difícil concluir sobre los efectos generales. Además, dado que diferentes aditivos podrían tener efectos similares en parte, se puede esperar que estos efectos no sean aditivos.

En la literatura se han descrito varios modos de acción de los aditivos alimentarios en los procesos del TGI (Turner y col., 2001).

1. Potenciadores de la palatabilidad.
2. Mejora el suministro de nutrientes.
3. Reducción de la producción de proteínas endógenas y pérdidas.
4. Reducción del crecimiento microbiano.
5. Inflamación reducida y permeabilidad intestinal.
6. Aumento de la unión de toxinas.
7. Mejora la recuperación intestinal y la función
8. Mayor colonización y microbioma mejorado.

La mayoría de los beneficios para la salud que se atribuyen a la administración de probióticos están relacionados con la modulación de factores bacterianos o del hospedador en el TGI.

## LAS MICOTOXINAS COMO AGENTES TOXICOS ALIMENTARIOS

Los aditivos para piensos se agregan principalmente en alimentos para animales vulnerables a los desafíos. Estos desafíos pueden ser de origen ambiental (estrés, control o presión de infección) o causados por los ingredientes del alimento (factores anti-nutricionales, micotoxinas o alimentos de bajo contenido digerible) a través de una cascada de reacciones que influyen en la salud intestinal y, finalmente, reducen la ingesta de alimentos. La reducción de la capacidad digestiva de la pared intestinal y el daño de las uniones estrechas desempeñan un papel central en los eventos que conducen a una menor ingesta de alimento.

En condiciones de daño intestinal, se crea un desequilibrio en la microbiota intestinal y se reducen los mecanismos de defensa del cuerpo, lo que mediante la suplementación de probióticos, tales problemas se minimizarían, evidenciando diferencias en los resultados de rendimiento (Ducatelle y col., 2015; Heo y col., 2013).

La contaminación de la alimentación animal con micotoxinas todavía ocurre con mucha frecuencia, a pesar de los grandes esfuerzos para prevenirla. Los alimentos para animales están contaminados, en niveles bajos, con varias micotoxinas, particularmente con aquellas producidas por los géneros *Aspergillus* y *Fusarium* entre ellas, aflatoxina B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>), ocratoxina A (OTA), zearalenona (ZEA), desoxinivalenol (DON) y fumonisina B<sub>1</sub> (FB<sub>1</sub>).

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 (Monge y col., 2012; Garrido y col., 2012).

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 exacerbaban los problemas de rendimiento y/o toxicidad en los animales que los consumen (Kabak y col., 2006; Klich, 2007; Kana y col., 2013; Perrone y Gallo, 2017).

Debido a la presencia de micotoxinas en los alimentos, hay un aumento en la demanda de procedimientos prácticos de descontaminación. En 2009, se agregó un nuevo grupo

funcional en la categoría de aditivos tecnológicos para piensos. Este grupo está definido por el Reglamento de la Comisión (CE) N° 386/2009 como «sustancias para reducir la contaminación de los piensos por micotoxinas: sustancias que pueden suprimir o reducir la absorción, promover la excreción de micotoxinas o modificar su modo de acción» (Reglamento EC, 2009). Estas sustancias se conocen como agentes desintoxicantes.

Los aditivos se agregan a la dieta de los animales (principalmente de cerdos, aves de corral y ganado) con el fin de reducir la absorción de micotoxinas del tracto gastrointestinal y su distribución a la sangre y los órganos diana. Dependiendo de su modo de acción, actúan ya sea uniéndose a micotoxinas a su superficie (adsorción), o degradando o transformándolas en metabolitos menos tóxicos (biotransformación), (Kolossova y Stroka 2011).

Dado que el epitelio gastrointestinal es la primera barrera que entra en contacto con las micotoxinas después de la ingestión, se han realizado varios estudios para estudiar el efecto de las micotoxinas en la integridad intestinal. La mayoría de los estudios se han realizado con células Caco-2 epiteliales del intestino humano (Caloni y col., 2002) y las líneas celulares epiteliales porcinas IPEC1 e IPEC-J2 (Awad y col., 2012). La mayoría de los estudios con micotoxinas se han realizado con aflatoxinas o con toxinas de hongos del género *Fusarium*, como el DON, la toxina T-2, la zearalenona y la AFB<sub>1</sub>.

La aflatoxina es probablemente la micotoxina más estudiada. El principal efecto negativo de esta micotoxina es sobre el metabolismo del hígado. Sin embargo, la aflatoxina también tiene un efecto directo sobre la integridad epitelial a través de la inhibición de la síntesis de proteínas en los enterocitos.

El uso efectivo de aditivos alimentarios que contengan cepas de levaduras y/o BAL como adsorbentes y/o degradadores de micotoxinas con propiedades probióticas constituye una alternativa promisoriosa.

Estudios realizados por nuestro grupo de investigación han permitido el aislamiento y la selección de cepas de levaduras y bacterias lácticas (BAL).

### ***Saccharomyces cerevisiae* RC016**

En estudios previos se demostró la capacidad de cepas de *S. cerevisiae* aisladas de intestino de cerdos sanos o de alimentos para adsorber aflatoxina B1 y para tolerar el pasaje por el TGI (Armando y col., 2011). Estas cepas fueron capaces de conservar la capacidad de unión de micotoxinas en condiciones del TGI de rumiantes y mejorar la fermentación ruminal (Dogi y col., 2011). En otros estudios se evaluó su capacidad de adsorber OTA y ZEA

además de reducir significativamente el crecimiento de los hongos productores de estas micotoxinas (Armando y col., 2012). Se demostró además la influencia de la presencia de sales biliares y bajo condiciones de pH semejantes a los del estómago y del intestino. La cepa *S. cerevisiae* RC016 no produjo cito ni geno toxicidad en estudios in vivo (González Pereyra y col., 2014). García y col. (2018) demostraron la capacidad de la misma levadura para contrarrestar la inflamación intestinal en un modelo ex vivo, luego de las primer semana post- destete y además la administración oral de *S. cerevisiae* RC016 no indujo translocación microbiana al hígado.

### ***Lactobacillus rhamnosus* RC007**

Trabajos previos en este grupo de investigación permitieron seleccionar cepas de bacterias ácido lácticas (BAL) de ensilaje, con capacidad de reducir o inhibir el crecimiento de *Fusarium graminearum* y *Aspergillus parasiticus*, dos de los hongos micotocogénicos más prevalentes presentes en el ensilaje reportado previamente en la región central de Argentina (Pereyra y col., 2008). Se demostró que estas cepas no poseen genes de resistencia a antibióticos de importancia veterinaria (Dogi y col., 2013). Además, se pudo profundizar en cómo las bacterias ácido lácticas interaccionan con la microbiota intestinal y modulan el sistema inmune del huésped, incrementando su resistencia frente a patógenos (Dogi y col., 2010). En un modelo experimental de ratones BALB/c se evaluó el efecto de la administración de la cepa *L. rhamnosus* RC007 tanto en huéspedes sanos como en intestinos inflamados, donde se logró estimular el sistema inmune del ratón no sólo en el intestino, sino también mediante la activación de la fagocitosis de macrófagos peritoneales; se estimuló la liberación de citoquinas, tales como TNF- $\alpha$  e IL-10 en el intestino, mostrando un potencial anti-inflamatorio, también se observó menos daño intestinal, que se relaciona con menos translocación microbiana al hígado. Además, García y col. (2017) demostraron en explantos de yeyuno utilizando como agente inductor de inflamación a DON, una micotoxina que tiene su principal acción a nivel intestinal, y esta misma BAL fue capaz de contrarrestar los efectos tóxicos intestinales generados por el DON, ayudando a mantener un tracto gastrointestinal saludable. *Lactobacillus rhamnosus* RC007 es una bacteria probiótica potencial para su uso como suplemento en piensos para animales, que puede ejercer efectos beneficiosos, como mantener el estado normal inmunitario en huéspedes sanos como así también en animales infectados o inflamados (Dogi y col., 2016).

## **MÉTODOS DE EVALUACIÓN DE SEGURIDAD DE SUSTANCIAS BIOACTIVAS**

Los principales métodos para evaluar la seguridad de sustancias bioactivas son los estudios toxicológicos, entre los que podemos encontrar tanto estudios *in vitro*, como estudios *in vivo*. Entre los estudios de seguridad *in vitro* podemos mencionar el ensayo de letalidad en *Artemia salina* (Meyer y col., 1982), el cual se utiliza para evaluar posibles efectos tóxicos, así como actividad biológica. Citotoxicidad en líneas celulares, genotoxicidad mediante ensayos con insectos como la *Drosophila*, microorganismos como la prueba de Ames o componentes celulares como la prueba de inducción de micronúcleos. Respecto a los estudios *in vivo* es posible evaluar la toxicidad sistémica mediante la prueba de toxicidad aguda en roedores, con esta prueba es posible determinar la dosis letal media (DL 50). Los estudios de irritación dérmica e irritación ocular son también estudios agudos de una sola exposición, comúnmente utilizada en productos de aplicación tópica o que puedan dañar el ojo. Otros estudios en modelos animales son los estudios de toxicidad en dosis repetidas con las cuales se evalúan los niveles de exposición a partir de los cuales aparecen efectos tóxicos o establecer el mayor nivel de dosis al cual no se producen efectos adversos

## **PRODUCCIÓN DE PROBIÓTICOS: ASPECTOS TECNOLÓGICOS**

Debido al desarrollo industrial acelerado de las últimas décadas, existe la necesidad de desarrollar procesos ambientalmente sostenibles (Jin y col., 2005). Esta tendencia hacia la sostenibilidad ambiental y utilización de recursos renovables ha incrementado significativamente el interés en la producción y recuperación de productos biotecnológicos (John y col., 2007), como así también en la producción de insumos químicos por medio de procesos fermentativos y en el potencial de nuevas tecnologías de fermentación energéticamente más eficientes (Wasewar y col., 2004).

Para la producción de los aditivos propuestos es sumamente necesaria la optimización de los medios de fermentación para lograr la máxima producción de biomasa y de este modo garantizar la viabilidad del proceso biotecnológico. La evaluación económica del proceso de producción microbiana depende principalmente del costo de la fuente de carbono. Así, es deseable producir biomasa a partir de fuentes de carbono de bajo costo o incluso a partir de productos de desecho como la burlanda, la melaza o el lactosuero, co-productos de la agroindustria de nuestra región. Los desechos agroindustriales son una fuente rica de energía y materia biodegradable, por esto existe un gran potencial biotecnológico de estos residuos como materia prima para la producción de productos de valor agregado: desde

enzimas, ácidos orgánicos, etanol, aminoácidos y proteína celular, hasta alimentos, aditivos y químicos industriales. (John y col., 2007). Actualmente el número de estos insumos producidos por fermentación está creciendo y está comenzando a competir con la producción sintética tradicional de productos químicos (Wasewar y col., 2004).

Un inconveniente asociado al empleo de microorganismos con fines biotecnológicos es su escasa resistencia a los procesos tecnológicos y a diferentes condiciones ambientales (de Vos y col., 2010). Con el objeto de sortear dichos inconvenientes, se han desarrollado estrategias que generan una barrera física que evita su exposición a las condiciones adversas del entorno, logrando su estabilización. La liofilización es un método ampliamente utilizado para la conservación de microorganismos debido a que permite que estos mantengan su viabilidad a temperatura ambiente por largos períodos de tiempo con una buena estabilidad genética. Dado que es un proceso físico de deshidratación, donde el agua pasa por diferentes fases, las células pueden verse afectadas estructuralmente disminuyendo su viabilidad. Es por esto que es muy importante el uso de agentes lioprotectores y condiciones de liofilización adecuadas para cada tipo de microorganismos (Morgan y col., 2006).

La industria argentina de alimentos destinados a animales necesita producir alimentos de alto valor nutritivo y calidad microbiológica, para asegurar una buena salud animal y la performance de los mismos. La innovación de los aditivos que se desean producir a través de esta tesis radica en su capacidad de reunir las propiedades probióticas y decontaminante de micotoxinas que permitirán además su acción como promotores de crecimiento en reemplazo de antibióticos que se usan para este fin. Para definir la factibilidad de esta innovación se propone el escalado de la producción de estos aditivos y el desarrollo de sistemas de protección para la realización de estudios *in vivo* que permitan determinar su efectividad. La producción a gran escala de estos aditivos alimentarios permitirá su aplicación en la alimentación animal y la consecuente reducción de riesgos a la población humana.

***Hipótesis y Objetivo***

---

## **HIPÓTESIS GENERAL**

La producción de levaduras y/o bacterias lácticas, con demostradas propiedades de adsorción de micotoxinas, probióticas y bio- controladora de hongos toxicogénicos, aplicadas como aditivos alimentarios biológicos (autóctonos, inocuos e innovadores, ya que se complementan la acción probiótica y la decontaminación de micotoxinas en un mismo producto), mejora la sanidad de los animales y los productos derivados para consumo humano.

## **OBJETIVO GENERAL**

Aplicar levaduras y/o bacterias lácticas con propiedades probióticas y antimicotoxinas para el mejoramiento de la calidad e inocuidad de alimentos y de la producción animal.

***Materiales y métodos***

---

a) **Optimización y producción de biomasa de *S. cerevisiae* RC016 y *L. rhamnosus* RC007 probióticos antimicotoxinas a través de diseños estadísticos experimentales.**

### **1. Microorganismos**

En el presente trabajo se utilizaron las cepas:

\* *Lactobacillus rhamnosus* RC007, una bacteria ácido láctica (BAL) aislada de ensilaje de maíz, caracterizada bioquímicamente (API 50 CHL) y molecularmente (secuencia del gen 16S rRNA) (Dogi y col., 2013) y mantenida en glicerol 30% (v/v) a -80°C

\* *Saccharomyces cerevisiae* RC016, aislada de intestino delgado de cerdo sano, con demostradas propiedades probióticas y adsorbentes de micotoxinas; caracterizada fenotípica y molecularmente (Armando y col., 2011; 2012) y conservada en glicerol 30% (v/v) a -80°C y en tubos inclinados conteniendo agar peptona dextrosa (YPD) a 4°C.

Ambas cepas se encuentran depositadas en el cepario del grupo de Biotecnología Aplicada a la Producción de Aditivos para Alimentación Animal (BIOAPLA) del Departamento de Microbiología e Inmunología, de la Universidad Nacional de Río Cuarto.

### **2. Condiciones de cultivo**

Para las determinaciones que se realizaron las células de la levadura mantenidas en estrías en medio agar YPD se sembraron en caldo YPD y se incubaron a 28°C en agitación orbital (180 rpm), durante 24 h. Las células de BAL fueron mantenidas en estrías en medio agar De Man, Rogosa, and Sharpe (MRS, 1960) y se sembraron en caldo MRS a 37°C en microaerofilia, durante 24 h.

### **3. Curvas de crecimiento en medios de cultivo con diferentes fuentes de carbono**

Para la obtención de curvas de crecimiento de la levadura se utilizó el medio de cultivo YPD y se probaron diferentes fuentes de carbono reemplazando la glucosa con 2% (m/v) de: glicerol, etanol, melaza, burlanda (DDG's) y jarabe de refinera comercial (JRC) (Tabla 2). Se sembró 1 mL del inóculo inicial (5%, v/v) en frascos Erlenmeyer de 100 mL conteniendo 10 mL de los diferentes los medios. Los frascos se incubaron en agitación

orbital (180 rpm) a 28°C, y se tomaron alícuotas a diferentes tiempos, para medir el crecimiento de la levadura.

Para la obtención de curvas de crecimiento de la BAL se sembraron 5 mL del inóculo inicial (10%, v/v) en tubos Falcon de 50 mL conteniendo 45 mL del medio MRS y se reemplazó la glucosa (equivalente a 8 g/L de carbono) con: melaza, lactosuero, glicerol, lactosa y fructovil. Los tubos se incubaron a 37°C en microaerofilia y se tomaron alícuotas a distintos tiempos, para medir el crecimiento de la BAL.

**Tabla 2.** Especificaciones y composición del jarabe de refinera comercial.

<b>Especificaciones</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>
Sólidos [%p/p]	76.5	77.5
°Brix [refractométrico, 20°C]	74.8	75.8
IR 45°C	1.4716	1.4740
Densidad [kg/l]	1.3717	1.3780
SO <sub>2</sub> [ppm]	-	3.0
pH	3.3	4.3
Color [UI]	-	20
Cenizas sulfatadas [%]	-	0.05
Proteínas [%]	≤0.08	≤0.08
Olor-Sabor	Normal	Normal
Viscosidad 25°C [cP]	-	1300
<b>Distribución de azúcares [B.S]</b>		
Levulosa [%]	55.0	-
Levulosa + Dextrosa [%]	95.0	-
<b>Análisis microbiológico</b>		
Recuento total [ufc/10g]	-	200
Levaduras [ufc/10g]	-	10
Hongos [ufc/10g]	-	10
Coliformes [ufc/10g]	-	10
E. Coli [ufc/g]	-	Ausencia
Salmonella [ufc/25g]	-	Ausencia
<b>Información Nutricional (en 100 g)</b>		
Valor energético	308 kcal	
Carbohidratos	76 g	
Azúcares (Reductores, BS)	98.7 g	
Almidón	0 g	

#### 4. Determinación del crecimiento celular

- Concentración de levaduras totales: se determinó midiendo 1) la densidad óptica (DO) en un espectrofotómetro Metrolab 330 (Technique SRL, Argentina) a una longitud de onda de 640 nm, 2) por recuento microscópico de células en cámara de Neubauer y 3) por determinación del peso seco de alícuotas que se centrifugaron (5000 rpm, 10 min) y se secaron en estufa a 105°C hasta peso constante.
- Concentración de BAL: se determinó mediante: 1) el recuento de células viables (UFC/mL) en placas de agar MRS a partir de diluciones seriadas en agua peptona, 2) la medición de la densidad óptica (DO) en un espectrofotómetro Metrolab 330 (Technique SRL, Argentina) a una longitud de onda de 640 nm y 3) determinación del peso seco de alícuotas que se centrifugaron (5000 rpm, 10 min) y se secaron en estufa a 105°C hasta peso constante.

#### 5. Parámetros cinéticos

Con los datos obtenidos de las curvas de crecimiento se determinaron parámetros cinéticos como velocidad específica de crecimiento  $\mu \times (h^{-1})$  (Fórmula 1) y tiempo de duplicación  $t_d$  (h) (Fórmula 2) en los diferentes medios ensayados.

$$\mu_{\max} = \frac{\ln x - \ln x_0}{t - t_0} \quad (\text{Fórmula 1})$$

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu} \quad (\text{Fórmula 2})$$

Donde,  $x$  es el número de células en el tiempo y  $x_0$  es el número de células en el tiempo cero.

#### 6. Parámetros productivos

Con los datos obtenidos de las curvas de crecimiento se determinaron los parámetros productivos como productividad máxima ( $P_{\max}$ - g/L.h- m/v.t), producción máxima ( $X_{\max}$ - g/L- m/v) y rendimiento ( $Y_{x/s}$ ) (Fórmula 3) en los diferentes medios ensayados.

$$Y_{x/s} = \frac{\text{Biomasa } \left(\frac{g}{L}\right)}{\text{Consumo de sustrato } \left(\frac{g}{L}\right)} \quad (\text{Fórmula 3})$$

## 7. Determinación de glucosa

Se determinó la concentración de glucosa por el método de azúcares reductores por dinitrosalicílico (DNS). Se pesó 75 g de tartrato de NaK y 4 g de NaOH. Se disolvió el NaOH en 200 mL de agua destilada y se añadió lentamente en agitación el tartrato de NaK. Se añadió lentamente 0,25 g de ácido 3,5 DNS y se enrasó en matraz aforado con agua destilada hasta 250 mL. En tubos protegidos de la luz, se agregó 100 µL de la muestra y 1 mL del reactivo DNS, luego fueron llevados a baño María a 100°C durante 10 min. Luego se dejó enfriar y se midió en espectrofotómetro a 540 nm. El blanco se realizó reemplazando la muestra por agua destilada. La curva de calibración se realizó utilizando diferentes concentraciones de glucosa.

## 8. Determinación de acidez titulable

La acidez titulable se midió en el sobrenadante en cada punto de la curva por titulación con NaOH 0,1 N y el resultado se expresó como porcentaje de ácido láctico (Fórmula 4).

$$\text{Concentración de ácido láctico (g/L)} = \frac{(V_{\text{NaOH}}) \times (N_{\text{NaOH}}) \times 90}{\text{ml}_{\text{muestra}}} \quad (\text{Fórmula 4})$$

## 9. Formulación de un medio de cultivo apropiado para la producción de biomasa utilizando diseños estadísticos experimentales.

### 9.1. Diseños experimentales estadísticos y análisis de los resultados

Los diseños experimentales que se utilizaron en este estudio fueron de dos tipos: diseños de selección y diseños de optimización. Se realizaron curvas de crecimiento en cada condición. La respuesta analizada fue la producción de biomasa (UFC/mL y g/L).

### 9.2. Diseño de selección

Se utilizó el Diseño de Selección de Plackett-Burman (PBSD) para evaluar el efecto de las variables independientes sobre el crecimiento.

Los parámetros analizados fueron:

\* *Saccharomyces cerevisiae* RC016: concentración de fuente de carbono, concentración de peptona, concentración de extracto de levadura, tamaño del inóculo y tiempo de

incubación. Para todos los tratamientos la temperatura de incubación fue 28°C y la agitación 180 rpm.

\* *Lactobacillus rhamnosus* RC007: concentración de fuente de carbono, concentración de peptona, concentración de extracto de levadura, presencia o ausencia de concentrado de sales, agitación (0 – 100 rpm) y aireación (0 – 1 (vol. de aire/vol. reactor. min<sup>-1</sup> –vvm-). Para todos los tratamientos el tamaño del inóculo fue 10% (v/v) y la temperatura de incubación fue 37°C.

### 9.3. Diseños de optimización

Se empleó el Diseño de Optimización Box- Behnken (BBOD) a partir de las variables que resultaron significativas en el diseño de selección. Luego, se realizaron gráficos de superficie a través de la metodología de superficie de respuesta (MSR) para obtener el valor óptimo de cada variable.

**b) Escalado de la producción de biomasa de *S. cerevisiae* RC016 y *L. rhamnosus* RC007.**

## 10. Validación de los medios optimizados en biorreactor

Se realizaron fermentaciones discontinuas para evaluar el medio de cultivo optimizado en los ensayos previos. Se utilizó un reactor tipo tanque agitado y aireado equipado con dos series de seis agitadores mecánicos (turbinas tipo Rushton) y difusores (baffles) laterales (New Brunswick BioFlo 2000) de 5 L de volumen de trabajo; con sensores de pH, temperatura y oxígeno disuelto. Las condiciones del ensayo se eligieron según los ensayos previos.

\* *Saccharomyces cerevisiae* RC016: las condiciones de cultivo fueron 3 L de medio de cultivo optimizado con sustrato de bajo costo, agitación 180 rpm, 28°C y 2 vvm, inóculo 10% (v/v), el pH se mantuvo entre 4,5 y 5,5 con la adición de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (18 N) o Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (20%) p/v. La concentración de oxígeno disuelto al comienzo del experimento fue 100% de saturación. La producción de espuma se controló mediante la adición de antiespumante 289 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.). Finalizado el proceso se retiró el cultivo en forma aséptica del reactor, se transfirió el contenido a frascos estériles y se centrifugó a 5000 rpm, a 4°C, durante 10 min.

\* *Lactobacillus rhamnosus* RC007: las condiciones de cultivo fueron 3 L de medio de cultivo optimizado con sustrato de bajo costo, agitación 50 rpm, 37°C, inóculo 10% (v/v). La concentración de oxígeno disuelto al comienzo del experimento fue 0%. La producción de espuma se controló mediante la adición de antiespumante 289 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.). El pH se mantuvo entre 6,5 – 7 con adición de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (18 N) o Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (20%) p/v. Finalizado el proceso se retiró el cultivo en forma aséptica del reactor, se transfirió el contenido a frascos estériles y se centrifugó a 5000 rpm, a 4°C, durante 10 min.

A partir de estos procesos fermentativos se obtuvieron las curvas de crecimiento y se determinaron los parámetros cinéticos y productivos que permitieron comparar la eficiencia del medio optimizado con respecto al medio sin optimizar.

### **10.1. Parámetro de escalado. Tiempo de mezclado**

El tiempo de mezclado del Bioreactor Bioflo 2000 (New Brunswick) se determinó utilizando pulsos de ácido ((HCl 100 mM) y base (NaOH 5N) y en diferentes condiciones de agitación. Los cambios de pH se midieron en el tiempo utilizando un electrodo de pH (Mettler - Toledo).

### **c) Formulación de aditivos alimentarios biológicos simples y en mezcla.**

## **11. Agentes crioprotectores**

Dos medios de suspensión fueron evaluados como agentes crioprotectores, su composición expresada en % (p/v) en agua destilada fue la siguiente:

Leche descremada en polvo 10% + extracto de levadura 0,5%,

Leche descremada en polvo 10%.

Ambos agentes se esterilizaron previamente por vapor fluente durante 30 min.

## **12. Preparación de la biomasa y protección**

La biomasa obtenida al final de la fermentación tanto de levadura como de BAL fue centrifugada a 5000 rpm por 10 min, se descartó el sobrenadante y el pellet obtenido fue lavado con solución fisiológica y vuelto a centrifugar. Finalmente el pellet concentrado fue resuspendido en igual volumen de crioprotector, leche descremada al 10% más extracto

de levadura al 5%, para el caso de la levadura y sólo leche descremada al 10% para la BAL, y se conservó a -80°C hasta el momento de liofilizar.

### 13. Liofilización

La liofilización se realizó en un equipo liofilizador de laboratorio tipo tambor de cuatro bocas marca Rificor, modelo L-T4. El proceso se inició a una temperatura de congelación - 70 °C. La presión de trabajo en la cámara fue de 0,001 Pa. Una vez concluido el proceso, los frascos fueron almacenados entre 2 y 8°C para garantizar su estabilidad a largo plazo.

### 14. Viabilidad

Se determinó de viabilidad a partir de 1 gr del del formulado liofilizado que fue resuspendido en 9 mL de agua peptonada estéril, y se realizaron diluciones seriadas y recuento de viables (UFC/g) en agar YPD y MRS (según sea levadura o BAL). Cada dilución se sembró por triplicado. Se consideró satisfactoria una concentración celular igual o superior a  $10^5$  UFC/mL, valor mínimo establecido para ser utilizado en un formulado de aditivo alimentario.

**d) Estudios de la variabilidad ultraestructural de la pared celular de *S. cerevisiae* RC016 expuesta a diferentes componentes del medio de cultivo y su influencia sobre la adsorción de aflatoxina B<sub>1</sub>.**

### 15. Producción de aflatoxina B<sub>1</sub>

La producción de AFB<sub>1</sub> se realizó en Erlenmeyers de 250 mL, donde se colocaron 25 g de arroz tinalizado, el cual fue inoculado con un taco de la cepa *A. parasiticus* NRRL 2999 desarrollada en agar MEA durante 5 días a 25°C. Se hidrató el arroz inoculado con 10 mL de agua estéril. Los cultivos fueron incubados a 25°C durante 14 días en oscuridad.

Posteriormente los Erlenmeyers se autoclavaron a 121°C durante 20 min a 1 atm de presión. El cultivo se secó a 40°C durante 48 h en estufa de aire forzado y se molió hasta obtener un polvo fino. Los niveles de AFB<sub>1</sub> en el polvo de arroz se cuantificaron por HPLC de acuerdo a la metodología descrita por Trucksess y col. (1994) y AOAC (1995).

## 16. Cuantificación de aflatoxina B<sub>1</sub> por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)

La detección y cuantificación de AFB<sub>1</sub> fue realizada 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, 5µm); 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 20 µl y el tiempo de retención fue de 4,4 min. Se realizó una curva de calibración con testigos de AFB<sub>1</sub> (Sigma). La cuantificación de la toxina fue obtenida por comparación de las respectivas áreas (testigos y muestras). Las muestras y testigos fueron derivatizados previo a la inyección con 200 µL de muestra + 700 µL de solución derivatizante (ácido trifluoroacético 20%, ácido acético glacial 10% en agua destilada). 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.

## 17. Microscopía electrónica de transmisión (MET)

Para realizar el estudio de MET, se obtuvieron por centrifugación los pellets de levadura crecida en dos medios de cultivo, YPD y DDG's. Las muestras de *S. cerevisiae* RC016 fueron luego fijadas en glutaraldehído al 2,5% en 0,2 M de S-colidina pH 7,4; 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 (60 nm) fueron cortadas y colocadas en rejillas de cobre, contrastadas con acetato de uranilo saturado y citrato de plomo acuoso.

Las secciones fueron examinadas en el microscopio electrónico de transmisión Elmiskop 101 (Siemens, Alemania).

## 18. Microscopía óptica de alta resolución (MOAR)

Para realizar el estudio de MOAR fueron utilizadas las secciones semidelgadas ( $\pm 0,25$  µm) de las muestras de *S. cerevisiae* analizadas por MET. Las secciones semidelgadas fueron contrastadas con azul de toluidina acuoso y se cubrieron en un agente de embebido-DPX (Merck, Alemania). Las imágenes digitales se adquirieron con el software Axiovision 4.6.3.

### **19. Espectroscopía infrarroja (IR)**

Para determinar los carbohidratos presentes en la levadura bajo la influencia de diferentes fuentes de carbono, se realizó una espectroscopía infrarroja. Las células completas liofilizadas se mezclaron con KBr (1 mg de muestra / 200 mg KBr). Esta mezcla se trituró en un mortero de ágata y se formó una pastilla bajo presión ( $\approx 15 \text{ ton / cm}^2$ ), aplicando vacío dinámico durante 15 min. Las mediciones se realizaron en un espectrómetro Nicolet FTIR Impact 400. Los espectros fueron el resultado de una acumulación de 200 mediciones para aumentar la relación señal / ruido, y se midieron entre 4000 y 400  $\text{cm}^{-1}$  con una resolución de 4  $\text{cm}^{-1}$ .

### **20. Ensayos de adsorción y desorción de aflatoxina B<sub>1</sub> en tracto gastrointestinal simulado**

La técnica de adsorción de micotoxinas se realizó de acuerdo a la metodología propuesta por Bueno y col. (2007) con modificaciones.

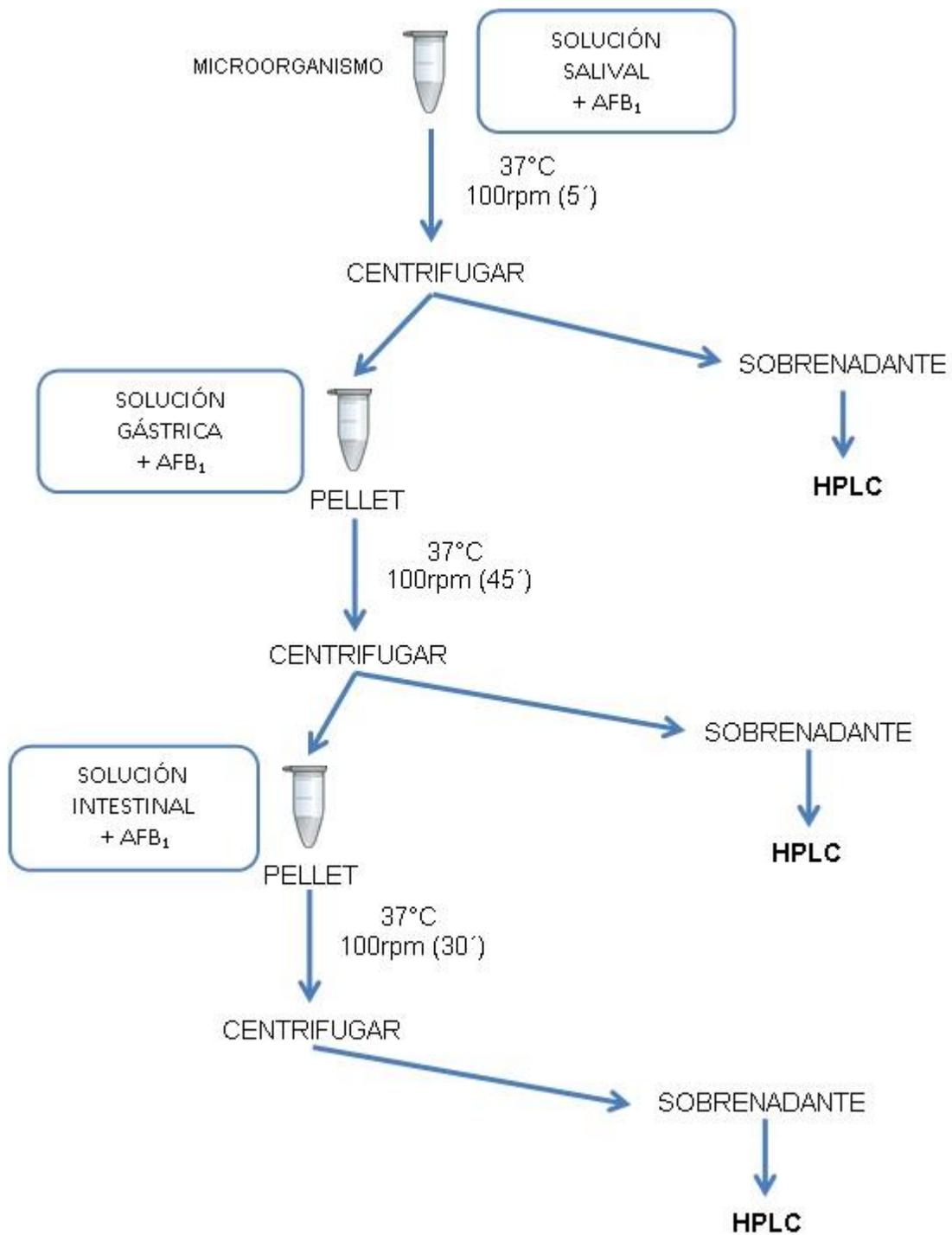
En este ensayo se simuló la temperatura corporal de monogástricos (37°C), pH, sales, enzimas y movimientos peristálticos (por agitación), para cada porción del TGI: boca, estómago e intestino (Figura 8).

A partir de un cultivo overnight de la levadura, se centrifugó y se descartó el sobrenadante. El pellet fue resuspendido en una solución salival artificial contaminada con AFB<sub>1</sub>. Se incubó durante 5 min a 37°C en agitación (100 rpm). Luego se centrifugó para obtener el sobrenadante conteniendo la toxina desorbida y se conservó a -20°C hasta su análisis cuantitativo por HPLC. El pellet fue resuspendido en una solución gástrica artificial y se incubó durante 45 min a 37°C en agitación (100 rpm). Luego se centrifugó para obtener el sobrenadante conteniendo la toxina desorbida en esta etapa y se conservó a -20°C hasta su análisis cuantitativo por HPLC. Finalmente, el pellet fue resuspendido en una solución intestinal artificial y se incubó durante 30 min a 37°C en agitación (100 rpm). El sobrenadante conteniendo la toxina desorbida se obtuvo por centrifugación y se conservó a -20°C para su análisis cuantitativo por HPLC.

Los controles se realizaron con las soluciones del TGI pero sin toxina. Todos los análisis fueron realizados por triplicado.

**21. Soluciones artificiales del tracto gastrointestinal**

- *Solución salival (SS)*: lisozima 2 mg/mL (Sigma 47700 U/mg) en solución salina pH 6,5.
- *Solución gástrica (SG)*: ClNa 125 mM; ClK 7mM; NaHCO<sub>3</sub> 45 mM, Pepsina 3g/L (Sigma 427 U/mg) y HCl en concentración variable entre 80 y 100 mM para ajustar el pH final a 3.
- *Solución intestinal (SI)*: Bilis 0,3% (p/v); tripsina 1 mg/mL (Fluka 11531 U/mg), y quimiotripsina 1 mg/mL (Fluka 80 U/mg). El pH fue ajustado a 8 con NaOH 5N.



**Figura 8.** Simulación del tracto gastrointestinal de un animal monogástrico.

**e) Estudio del mecanismo de reducción de aflatoxina B<sub>1</sub> por *Lactobacillus rhamnosus* RC007.**

**22. Ensayos de adsorción y desorción de aflatoxina B<sub>1</sub> en tracto gastrointestinal simulado**

Se realizó la técnica de adsorción de micotoxinas de acuerdo a la metodología de Bueno y col. (2007) previamente descripta. Se utilizó un cultivo *overnight* de la BAL, se centrifugó y se descartó el sobrenadante. El pellet fue resuspendido en una solución salival artificial contaminada con AFB<sub>1</sub> y se trabajó de acuerdo a lo detallado en la Figura 8.

**23. Ensayo de degradación de aflatoxina B<sub>1</sub> por extracto libre de células**

Se realizó la técnica de degradación de micotoxinas de acuerdo a la metodología propuesta por Teniola y col. (2005) con modificaciones. El experimento se realizó en tubos de 15 mL, se colocó un extracto libre de células de un cultivo de 24 h de *L. rhamnosus* RC007 y se lo contaminó con una solución de AFB<sub>1</sub> a una concentración de 150 ng/mL. La mezcla se incubó en oscuridad a 37°C sin agitación durante 6, 12, 24 y 48 h. Luego se realizó la extracción con cloroformo (1:1) (v/v) de la AFB<sub>1</sub> restante para su posterior cuantificación por HPLC. Todos los experimentos se llevaron a cabo por triplicado.

**f) Estudios de seguridad biológica (cito y genotoxicidad) de *S. cerevisiae* RC016 y *L. rhamnosus* RC007 y sus sobrenadantes en cultivos celulares.**

**24. Ensayo de citotoxicidad en células Vero**

La actividad citotóxica de *S. cerevisiae* RC016 y *L. rhamnosus* RC007 y sus sobrenadantes, solos y en mezcla se midió mediante la exposición directa de las células Vero. Las células Vero (células de riñón de mono verde africano) se propagaron en MEM suplementado con 8% de suero fetal bovino, gentamicina 50 ug/mL y glutamina 2 mM. La viabilidad de las células Vero se midió mediante un ensayo de captación de rojo según lo descrito por Borenfreund y Puerner (1985) con modificaciones. Las células se sembraron en placas de cultivo de 96 pocillos (10<sup>4</sup> células/pocillo). Después de la formación de la monocapa, se trataron con 3 diluciones de un cultivo *overnight* de *S. cerevisiae* (2,08x10<sup>7</sup>, 2,08x10<sup>6</sup> y 2,08x10<sup>5</sup> UFC/pocillo), 3 diluciones de un cultivo *overnight* de *L. rhamnosus*

( $8,33 \times 10^7$ ,  $8,33 \times 10^6$  y  $8,33 \times 10^5$  UFC/pocillo) y la mezcla 1:1 de ambos cultivos en las 3 diluciones. Por otra parte se obtuvieron los sobrenadantes de cada cultivo y se inocularon 3 diluciones y las mezclas de los mismos. Como controles se usaron células sin tratar. La placa se incubó a 37°C en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> durante 24hs. se trataron con diferentes concentraciones de cada microorganismo, solos y en mezcla y con diferentes concentraciones de sus sobrenadantes solos y en mezcla.

Las células se colocaron en placas a una densidad de  $2 \times 10^5$  células / pocillo en una placa de 96 pocillos y se cultivaron durante 24 h. El medio de cultivo se eliminó y las monocapas celulares se lavaron dos veces con PBS. Luego, se agregaron 250 µl de medio de cultivo y FBS al 10% a cada pocillo.

### **25. Revelación por incorporación de rojo neutro**

Después de 24 h, el medio se reemplazó con 150 uL de una solución de 50 mg/mL de rojo neutro en MEM (previa incubación del colorante a 37°C durante 24 h) y se incubó nuevamente a 37°C durante 3 h. Posteriormente, se eliminó el medio que contenía el colorante y los pocillos se lavaron dos veces con PBS (150 uL/pocillo). El colorante dentro de las células viables se liberó por extracción con una mezcla de ácido acético, etanol y agua (1:50:49). Después de agitar los cultivos durante 10 min, se leyeron los valores de absorbancia a 540 nm. La viabilidad celular se expresó como el porcentaje de rojo neutro incorporado, relativo a los grupos control (no tratados).

### **26. Ensayo de genotoxicidad a partir de médula ósea de pollos parrilleros**

El efecto de *S. cerevisiae* RC016 y *L. rhamosus* RC007 sobre la genotoxicidad en eritrocitos se evaluó mediante el ensayo de micronúcleos en médula ósea de pollos parrilleros (Gonzalez Pereyra y col., 2014). Se extrajeron los fémures y se lavó la médula ósea con suero fetal bovino (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Munich, Alemania). Las células se centrifugaron dos veces a 112 g durante 10 min. Los sobrenadantes se descartaron dejando solo 0,1 – 0,2 mL para resuspender los sedimentos celulares. Los portaobjetos se dejaron secar, se fijaron con metanol absoluto y se tiñeron con May-Grunwald Giemsa. Se contaron mil eritrocitos por animal/réplica/tratamiento para determinar la tasa de eritrocitos normocromáticos micronucleados (%ENCMN) sobre el total de eritrocitos. Además, se estudió la capacidad de estos microorganismos probióticos para reducir la genotoxicidad causada por aflatoxina B<sub>1</sub>.

**g) Estudios de la influencia de la mezcla de *S. cerevisiae* RC016 y *L. rhamnosus* RC007 sobre el sistema inmunológico en ratones Balb/c.**

**27. Evaluación de los efectos de la mezcla de *S. cerevisiae* RC016 y *L. rhamnosus* RC007 en ratones sanos**

Para este ensayo se utilizaron ratones BALB/c machos, de 5 semanas de edad, con un peso inicial de  $9,3 \pm 0,9$  g, los cuales fueron obtenidos de las instalaciones para animales en la Universidad Nacional de Río Cuarto.

El protocolo de trabajo y las técnicas utilizadas cumplen con las regulaciones del Subcomité de Bioética Animal bajo el Comité de Ética de Investigación Científica de la Universidad Nacional de Río Cuarto, según lo establecido en la Resolución 253/10 del Consejo Superior (Anexo 1).

Los animales se dividieron en 2 grupos: control y tratamiento con la mezcla de microorganismos. Los ratones del tratamiento recibieron diariamente por vía oral 0,1 mL de la mezcla (1:1) de *L. rhamnosus* ( $1 \times 10^8$  células/mL) y *S. cerevisiae* ( $1 \times 10^7$  células/mL) resuspendido en PBS. El grupo control recibió diariamente por vía oral 0,1 mL de PBS. Después de 10 días de administración, los ratones se sacrificaron por dislocación cervical y se obtuvieron las muestras de contenido intestinal.

**28. Determinación de citoquinas en fluido intestinal**

Los contenidos intestinales se recolectaron de intestino delgado con 1 mL de PBS y se centrifugaron inmediatamente a 5000 rpm durante 15 min a 4°C. Los sobrenadantes se recuperaron y se almacenaron a -80°C hasta la determinación de citoquinas utilizando la metodología propuesta por Dogi y col. (2016). Estas muestras se analizaron con el kit de inflamación Cytometric Bead Array Mouse (CBA, BD Bioscience, San Diego, CA, EE. UU.) para medir los niveles de interleuquina (IL) -6, IL-10, factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ). La cuantificación de citoquinas se realizó con un citómetro de flujo FACS Calibur (BD Bioscience) y los datos adquiridos para cada muestra y estándar (proporcionados por el fabricante) se analizaron utilizando el software FCAP Array V1.0.1 (BD Bioscience). El ensayo se realizó por duplicado. Los resultados se expresaron como la concentración de cada citoquina en el fluido intestinal (pg/mL).

**h) Diseño de estudio *in vivo* en pollos parrilleros aplicando un aditivo simple.****29. Animales y diseño experimental**

Para este ensayo se utilizaron 20 pollos machos (raza Cobb) de un día de edad, que tenían un peso inicial de 0,05075 kg en promedio, vacunados contra la enfermedad de Marek. Estos se obtuvieron de un criadero comercial y se colocaron bajo luz fluorescente continua con alimento y agua *ad libitum* hasta los 18 días de edad.

Los animales fueron inicialmente aclimatados por un período de una semana. A los mismos se los dividió en 4 tratamientos (5 animales / tratamiento) y fueron alojados en jaulas de acero inoxidable en una habitación con temperatura controlada ( $23 \pm 1$  °C) y artificialmente iluminada (ciclo de 12 h luz / oscuridad), libre de cualquier fuente de contaminación química, según las normas éticas y de conformidad sanitario internacional.

Las aves se alimentaron según cada tratamiento durante 21 días.

Se utilizó una dieta estándar de harina de maíz-soja (dieta basal) que cumplía con los requerimientos nutricionales para pollos (NRC 1994) desde el primer día hasta el final del experimento. La dieta basal ya poseía una incidencia natural de AFB<sub>1</sub> (2 ug/kg), determinada mediante HPLC. Las dietas experimentales para cada tratamiento fueron las siguientes:

- ✓ T<sub>1</sub> (control): dieta basal;
- ✓ T<sub>2</sub> (toxina): dieta basal + contaminación experimental con AFB<sub>1</sub> (50 µg/kg);
- ✓ T<sub>3</sub> (aditivo simple): dieta basal + 0,1% de *S. cerevisiae* RC016 liofilizada;
- ✓ T<sub>4</sub> (toxina + aditivo simple): dieta basal + contaminación experimental con AFB<sub>1</sub> (50 µg/kg) + 0,1% de *S. cerevisiae* RC016 liofilizada.

El estado de salud general de los pollos se evaluó mediante el registro de los cambios en el comportamiento, la actividad, la postura, la alimentación y la ingesta de agua, posibles enfermedades y muertes. Los animales se pesaron a los 0, 7, 14, 16, 18 y 21 días del experimento.

El protocolo de este estudio fue aprobado por el Comité de Ética y Bioseguridad de la Universidad Nacional de Río Cuarto (Anexo 1).

### **30. Determinación de los parámetros productivos: ganancia de peso, índice de conversión, rendimiento de carcasa y peso de los órganos.**

Cuando los pollos llegaron a los 21 días de edad, el ensayo de alimentación culminó y se seleccionaron 3 pollos de cada tratamiento. Los animales seleccionados se pesaron y luego se procedió a la eutanasia por dislocación cervical. A continuación, se llevó a cabo la necropsia. Los órganos hígado, timo, bazo y Bolsa de Fabricio fueron retirados y pesados.

La ganancia de peso total (GPT) se calculó como la diferencia entre el peso de los animales en el comienzo y al final del experimento. La ganancia de peso diaria (GPD) se calculó pesando los animales diariamente y teniendo en cuenta la diferencia entre el peso en el día actual y el peso del día anterior. El índice de conversión se calculó como la cantidad de alimento (kg) necesario para producir 1 kg de peso vivo. El peso y el rendimiento de la carcasa se evaluaron como el peso del cuerpo de los animales sacrificados después de la eliminación de las vísceras, piel y pezuñas.

Cada uno de estos parámetros de crecimiento se midió de forma individual (por animal) y por tratamiento y se analizaron estadísticamente.

#### **i) Diseño de estudio *in vivo* en pollos aplicando un aditivo mixto.**

### **31. Diseño experimental**

#### **31.1. Animales empleados**

Los ensayos experimentales *in vivo* se llevaron a cabo en las instalaciones de la Universidad Nacional de Río Cuarto, Laboratorio de Nutrición animal, fueron realizados en galpones que contaban con jaulas de alambre, con comederos y bebederos individuales y calefaccionados con estufa halógena y aire acondicionado frío/calor, para evitar las pérdidas de peso por bajas temperaturas en la primera semana de vida de los pollos.

La ubicación de las jaulas dentro del galpón fue planificada para el control de las corrientes de aire y para garantizar la ventilación. Las características descritas se muestran en las Figuras 9 y 10.

Para este ensayo se utilizaron 75 pollos machos y hembras (Cobb) de un día de edad, que tenían un peso inicial de  $0,084 \pm 0,02$  kg, vacunados contra la enfermedad de Marek.

Estos se obtuvieron de un criadero comercial y se colocaron bajo luz fluorescente continua con alimento y agua *ad libitum*.

Los animales fueron inicialmente aclimatados por un período de una semana. Luego fueron pesados individualmente y se los dividió al azar en 5 grupos (5 animales/tratamiento/ réplica) con 3 réplicas cada uno y alojados en jaulas de acero inoxidable en una habitación con temperatura controlada ( $23 \pm 1^\circ\text{C}$ ) e iluminación fluorescente continua, libre de cualquier fuente de contaminación química.

En cuanto al manejo, se evitó acumular polvos en los tejidos y paredes, la cama mojada se retiró periódicamente y se la reemplazó por material seco. Los bebederos se limpiaron y recargaron diariamente. Se realizó limpieza y desinfección periódica del galpón.

El estado de salud general de los pollos se evaluó mediante el registro de los cambios en el comportamiento, la actividad, la postura, la alimentación y la ingesta de agua, posibles enfermedades y muertes. Los animales se pesaron a los 1, 7, 17, 24, 28 y 34 días del experimento.

El protocolo de este estudio fue aprobado por el Comité de Ética y Bioseguridad de la Universidad Nacional de Río Cuarto (Anexo 1).

### **31.2. Dietas experimentales**

Las aves recibieron la dieta correspondiente a cada tratamiento durante 34 días. Se utilizó una dieta estándar de harina de maíz-soja (dieta basal) (Tabla 3, 4 y 5) que cumplía con los requerimientos nutricionales para pollos (NRC 1994).

**Tabla 3.** Composición del alimento iniciador para pollos parrilleros.

<b>Componentes</b>
Complejo vitamínico mineral parrillero
Fosfato monodivale
Metionina
Sal entrefina
Carbonato de calcio
Aditivo enzimático
Suplemento mineral antioxidante
Aditivo adsorbente
Maíz
Pellet de soja
Afrechillo de trigo

**Tabla 4.** Composición centesimal del alimento iniciador para pollos parrilleros.

<b>SUSTANCIA TAL CUAL</b>	<b>(%) p/p</b>
Tenor mínimo de proteína bruta	20
Tenor mínimo de extracto etéreo	4
Tenor máximo de fibra cruda	3,9
Tenor máximo de cenizas	7,5
Tenor máximo de humedad	11
Tenor de calcio mínimo	0,9
Tenor de calcio máximo	1,3
Tenor de fósforo mínimo	0,6
Tenor de fósforo máximo	0,68
<b>VALOR ENERGÉTICO: 2900 Kcal/kg</b>	

**Tabla 5.** Concentración de aditivos.

<b>MINERALES</b>	<b>mg/kg</b>
Cobre	4,3
Zinc	50
Manganeso	88
Yodo	1,1
Hierro	21
Selenio	0,15
<b>VITAMINAS</b>	
Vitamina A	8600 UI/kg
Vitamina D3	1700 UI/kg
Vitamina E	10 UI/kg
Vitamina K3	2,1 mg/kg
Vitamina B2	3,6 mg
Vitamina B12	0,012 mg/kg
Niacina	22,5 mg/kg
Pantotenato de calcio	7,7 mg/kg
colina	1030 mg/kg
<b>AMINOÁCIDOS</b>	<b>mg/kg</b>
Metionina	1600
Lisina	1300

Las dietas experimentales para cada tratamiento se formularon de la siguiente manera:

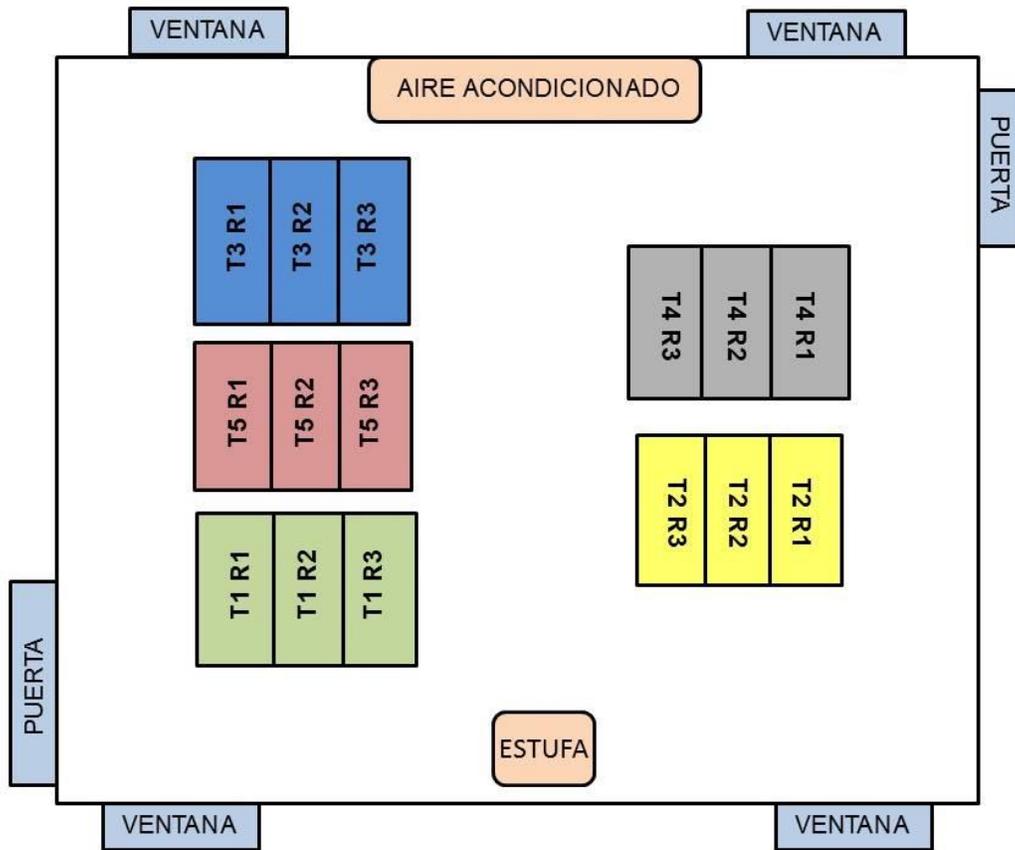
- ✓ **T<sub>1</sub>** (control): dieta basal;
- ✓ **T<sub>2</sub>** (toxina): dieta basal + contaminación experimental con AFB<sub>1</sub> (506,14 ± 22,1 ppb);
- ✓ **T<sub>3</sub>** (aditivo mixto): dieta basal + 0,1% de la mezcla (1:1) de microorganismos liofilizados: *L. rhamnosus* RC007 (1x10<sup>8</sup> células / g) y *S. cerevisiae* RC016 (1x10<sup>7</sup> células / g);
- ✓ **T<sub>4</sub>** (toxina + aditivo mixto): dieta basal + contaminación experimental con AFB<sub>1</sub> (506,14 ± 22,1 ppb) + 0,1% de la mezcla de microorganismos (*L. rhamnosus* RC007 + *S. cerevisiae* RC016) y
- ✓ **T<sub>5</sub>** (comercial): dieta basal comercial estándar (promotores de crecimiento + adsorbentes de micotoxinas).

Las diferentes dietas se prepararon en una mezcladora industrial. Posteriormente se tomaron muestras para la extracción y cuantificación de AFB<sub>1</sub> (Tabla 6).

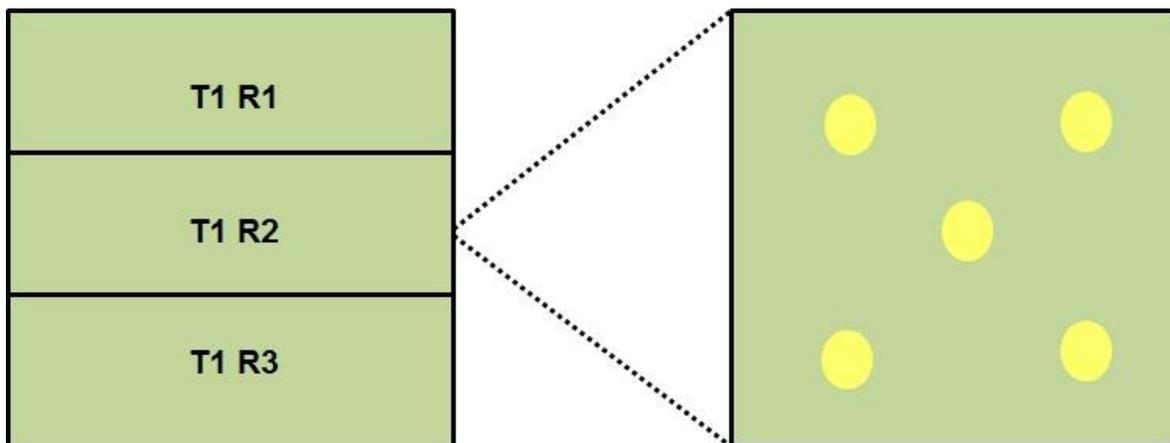
**Tabla 6.** Niveles de AFB<sub>1</sub> presentes en las distintas dietas experimentales.

Dietas experimentales	AFB <sub>1</sub>
	Media (ng/g) ± D.E
Control	18,72 ± 3,78 a
Contaminada artificialmente	506,14 ± 22,1 b
Comercial	22,15 ± 1,15 a

\* Las letras diferentes en las columnas indican diferencias significativas, de acuerdo con el test LSD de Fisher (p<0.0001). D.E: desvío estándar.



**Figura 9.** Esquema de la distribución de los grupos experimentales en el galpón.



**Figura 10.** Esquema de la distribución y cantidad de animales por jaula.

## **32. Variables medidas**

### **32.1. Parámetros productivos.**

Los parámetros de producción se midieron semanalmente durante el período de tratamiento (7 a 34 días de edad). Se determinaron el consumo de alimento, la ganancia de peso y el índice de conversión alimenticia y el peso y rendimiento de la carcasa, descritos previamente. Cada uno de estos parámetros de crecimiento se midió de forma individual (por animal) y por tratamiento y se analizaron estadísticamente.

### **32.2. Parámetros bioquímicos.**

Al final del experimento, se recogieron muestras de sangre (1 mL por ave). Luego se obtuvo el suero por centrifugación ( $2.500 \times g$  durante 15 min a temperatura ambiente) y se almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$  para la determinación de proteínas totales (TP), albúmina (Alb), se calculó la fracción total de globulina (Glob) restando la albúmina de la proteína total, y la relación de Alb / Glob. También se determinaron las enzimas aspartato aminotransferasa (AST), alanina aminotransferasa (ALT), la gamma-glutamilttransferasa (GGT) y la lactato deshidrogenasa (LDH) mediante el método colorimétrico utilizando un kit comercial (Wiener Lab).

### **32.3. Necropsia.**

A los 35 días de edad, se realizó la necropsia en 2 aves de cada réplica (6 aves/tratamiento). Se extrajeron y pesaron los órganos hígado, bazo, Bolsa de Fabricio y timo. El peso del órgano se expresó como un porcentaje del peso corporal (peso del órgano/100 g de peso corporal vivo). Los hígados se recogieron, se examinaron y se registraron las lesiones macroscópicas.

### **32.4. Histopatología de los órganos.**

Las secciones de hígado e intestino de todas las aves se fijaron en paraformaldehído al 4% y se procesaron para inclusión en parafina mediante métodos estándar. Las secciones embebidas en parafina con un grosor de  $5 \mu\text{m}$  se cortaron, fueron teñidas con hematoxilina/eosina y fueron examinadas microscópicamente.

### 32.5. Análisis histológico del intestino delgado.

Microscópicamente, la extensión del daño y la inflamación del intestino se evaluaron mediante un sistema de clasificación histopatológica estándar. Las puntuaciones altas de daño histológico indican un aumento del daño en los intestinos:

- ✓ Grado 1: hallazgos histológicos idénticos a los pollos normales (grado 0); infiltrado inflamatorio leve de la mucosa y/o submucosa (mezcla de neutrófilos) y edema, erosiones puntiformes de la mucosa a menudo asociadas con la proliferación capilar, mucosa muscular intacta;
- ✓ Grado 2: cambios del grado 1 que involucran el 50% de la muestra;
- ✓ Grado 3: infiltrado inflamatorio prominente y edema (predominan los neutrófilos) con frecuencia con áreas más profundas de ulceración que se extienden a través de la mucosa muscular hacia la submucosa; células inflamatorias raras que invaden la musculatura propia pero sin necrosis muscular;
- ✓ Grado 4: cambios del grado 3 que involucran el 50% de la muestra;
- ✓ Grado 5: ulceración extensa con necrosis coagulativa limitada por numerosos neutrófilos y menor número de células mononucleares; la necrosis se extiende profundamente en la musculatura propia;
- ✓ Grado 6: cambios del grado 5 que involucran el 50% de la muestra.

#### j) Análisis de los resultados

Las medias obtenidas de los ensayos fueron analizadas por el análisis de la varianza (ANOVA). Las variables que presentaron diferencias significativas se compararon mediante el test de la mínima diferencia significativa de Fisher LSD (Quinn y col. 2002). El análisis se realizó utilizando Info Stat para Windows 2012 Version 2.03 (SPSS Inc.) (Di Rienzo y col., 2015).

## ***Capítulo I***

---

PRODUCCIÓN DE BIOMASA

Optimización, escalado industrial y formulación.

## INTRODUCCIÓN

La producción industrial de microorganismos probióticos 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; Muller y col., 2009).

La viabilidad de un proceso biotecnológico incluye un análisis estratégico para la reducción de los costos de producción en la optimización de la producción de biomasa. Para la formulación de un medio de cultivo de tipo industrial es necesario que éste cumpla con todos los requerimientos nutricionales, característicos de cada especie, que permita un buen crecimiento del microorganismo, que estén disponibles en el mercado o en su defecto que sean materia prima obtenida como subproducto de algún otro proceso, y además sea de bajo costo para la producción.

Los componentes de los medios tienen un impacto muy fuerte en la economía de los procesos de fermentación industrial y pueden representar hasta el 30% del costo total de la producción (Lee, 2005; Rivas y col., 2004; Rodrigues y col., 2006). El uso de sustratos químicos puros como fuentes de carbono para la fermentación generalmente produce productos de alta calidad (Javanainen y Linko, 1995; Xiaodong y col., 1997). Sin embargo, los subproductos agrícolas y otros productos industriales son sustratos preferidos para la fermentación debido a su costo reducido (Hofvendahl y Hahn-Hägerdal, 2000). Por ejemplo, los sustratos populares para la fermentación industrial son suero (Timmer y Kromkamp y col., 1994; Oyaas y col., 1996), melaza (Montelongo y col., 1993; Göksungur y Güvenç, 1997) y almidón (Xiaodong y col., 1997). De manera similar, el extracto de levadura y la peptona son fuentes populares de nitrógeno en los medios de fermentación (Chiarini y col., 1992). El extracto de levadura se puede reemplazar con productos agrícolas más baratos (por ejemplo, harina de lentejas) como fuentes de nitrógeno (Altaf y col., 2006).

Para llevar a cabo la producción de biomasa a gran escala, es necesaria no sólo la búsqueda de un sustrato económico, sino también de las condiciones óptimas de producción. Una alternativa a los ensayos clásicos para mejorar procesos fermentativos con mayor eficiencia es el uso de los diseños estadísticos experimentales. 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, como la producción de biomasa o de un metabolito específico (Montgomery, 2001; Rao y col., 2004; Xu y col., 2002).

Los diseños de selección son utilizados para evaluar diferentes factores o variables a la vez, estos modelos son utilizados como un estudio preliminar que permite la fijación o eliminación de las variables, dependiendo de la influencia que éstas tengan sobre la respuesta a estudiar. Algunos de estos diseños son: factoriales, factoriales generales, Plackett-Burman, Taguchi (Plackett y Burman, 1946; Kaur y Satyanarayana, 2005; Li y col., 2008a, b; Sharma y Satyanarayana, 2006; Wang y col., 2007).

Una vez seleccionadas las variables que influyen significativamente en el proceso de interés, se utilizan diseños de optimización para determinar en forma cuantitativa los valores más apropiados para los parámetros en estudio de modo de maximizar la respuesta. Estos diseños son: Box-Behnken, diseño central compuesto (DCC) y la metodología de superficie de respuesta (RSM) que es una herramienta que permite representar el rendimiento como una superficie, ésta puede visualizarse como un mapa topográfico en el que la altura sobre el nivel del mar es el rendimiento y los componentes del medio proporcionan la referencia de la rejilla (Box y col. 1987; Ferreira y col., 2007).

La propagación de microorganismos 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.

La función principal de un biorreactor o fermentador es proporcionar un entorno adecuado en el que un organismo pueda producir eficientemente un producto objetivo que puede ser biomasa celular, un metabolito o un producto de bioconversión. El rendimiento de cualquier producto en el fermentador depende de muchos factores, pero los parámetros físicos y químicos clave que deben controlarse son la velocidad de agitación, la transferencia de oxígeno, el pH, la temperatura y la producción de espuma. Obtener una alta concentración celular es un objetivo importante para optimizar el proceso de fermentación (Champagne y col., 2007).

Estudios realizados por nuestro grupo de investigación han permitido la selección de dos cepas que han demostrado ser candidatos prometedores para ser incluidos en la formulación de aditivos para mejorar la sanidad y el rendimiento de la producción animal. La levadura *S. cerevisiae* RC016, aislada de intestino de cerdos sanos, posee la capacidad de adsorber aflatoxina B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>), ocratoxina A (OTA) y zearalenona (ZEA) y tolerar el pasaje por el TGI (Armando y col., 2011), además se demostró que fue capaz de

reducir significativamente el crecimiento de los hongos productores de estas micotoxinas (Armando y col., 2012). Esta levadura no produjo cito ni genotoxicidad en estudios *in vivo* en ratas (González Pereyra y col. 2014). La BAL *L. rhamnosus* RC007, aislada de ensilaje, mostró la capacidad de reducir o inhibir el crecimiento de hongos micotoxicogénicos (Pereyra y col., 2008), además no posee genes de resistencia a antibióticos de importancia veterinaria (Dogi y col., 2013). En ensayos *in vivo* demostró incrementar la resistencia frente a patógenos, como potencial anti-inflamatorio (Dogi y col., 2010).

Debido a estas propiedades previamente demostradas, se propone formular aditivos para la alimentación animal a partir de la propagación a gran escala de ambos microorganismos utilizando los diseños estadísticos experimentales para la optimización del proceso de producción.

## HIPÓTESIS

“El uso de diseños estadísticos experimentales mejora eficazmente la producción de biomasa de *S. cerevisiae* RC016 y *L. rhamnosus* RC007 en los procesos fermentativos.”

## OBJETIVOS

1. Evaluar los parámetros cinéticos (velocidad específica de crecimiento y tiempo de duplicación) y productivos (rendimiento, producción máxima y productividad) para la producción de biomasa de *S. cerevisiae* RC016 y *L. rhamnosus* RC007, a través de curvas de crecimiento utilizando sustratos de bajo costo.
2. Realizar la metodología de Diseños Estadísticos Experimentales (DOEs) y validación de las condiciones de proceso optimizadas anteriormente.
3. Formular aditivos simples y mixtos para alimentación animal.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### a) Optimización y producción de biomasa de *S. cerevisiae* RC016 y *L. rhamnosus* RC007 probióticos antimicotoxinas a través de DOEs.

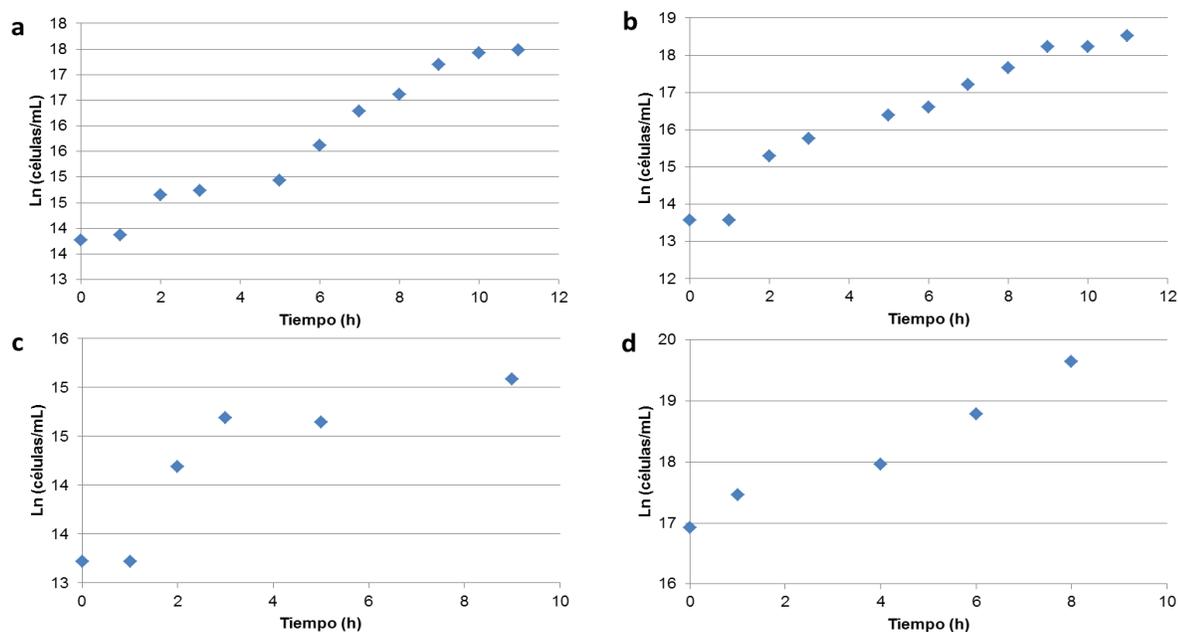
Uno de los aspectos biotecnológicos de la producción de biomasa implica el diseño o la selección del medio de cultivo. Este diseño debe reflejar la composición elemental y la capacidad biosintética de una célula microbiana determinada y debe cumplir con todos los requerimientos nutricionales, característicos de cada especie, que permita el buen crecimiento del microorganismo, que esté disponibles en el mercado o en su defecto sean materia prima obtenida como subproducto de algún otro proceso, y además sea de bajo costo para la producción. Para estandarizar el proceso de producción se evaluaron diferentes sustratos económicos que permitieron la producción a mayor escala. En esta etapa se logró disminuir la fase de adaptación del microorganismo en la fermentación lo cual permitió optimizar y obtener un buen rendimiento del crecimiento y que el medio resulte rentable.

Si bien la composición elemental de las células microbianas es relativamente similar, su capacidad de biosíntesis varía ampliamente. Diferentes cepas probióticas generalmente requieren diferentes medios de cultivo (Muller y col., 2009). En este trabajo se utilizaron dos microorganismos, por un lado la levadura *S. cerevisiae* RC016, que tiene una gran capacidad biosintética y crece en medios definidos como el caldo YPD; y también la BAL *L. rhamnosus* RC007 que requiere un medio rico o complementado para lograr un crecimiento eficiente como el caldo MRS.

### Curvas de crecimiento de *S. cerevisiae* RC016 en medios de cultivo suplementados con diferentes fuentes de carbono.

La levadura *S. cerevisiae* RC016 crece en el medio de cultivo YPD, el cual 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; Hahn-Hägerdal y col., 2005); sin embargo es un medio costoso cuando se pretende obtener biomasa a gran escala, por lo que se reemplazó la glucosa por otras fuentes de carbono, en la misma proporción (2% (m/v)), entre ellas: melaza, burlanda (DDG's) y JRC.

En la Figura 11 se puede observar la cinética de crecimiento de la levadura en cada fuente carbonada probada y los parámetros cinéticos determinados en cada caso.



**Figura 11.** Curva de crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* RC016 con diferentes fuentes de carbono: a) Glucosa; b) Melaza; c) Burlanda (DDG's) y d) JRC. En frascos agitados a 28°C.

En la Tabla 7 se muestran los parámetros cinéticos de cada fuente carbonada ensayada; el medio con burlanda presentó la mayor velocidad de crecimiento ( $0,319 \text{ h}^{-1}$ ) y el menor tiempo de duplicación (2,17 h).

**Tabla 7.** Parámetros cinéticos: Velocidad específica de crecimiento ( $\mu_{\text{máx}}$ ) y tiempo de duplicación ( $T_d$ ), de *Saccharomyces cerevisiae* RC016 en medios de cultivo suplementados con diferentes fuentes de carbono, incubados en Erlenmeyer agitados a 180 rpm y 28°C.

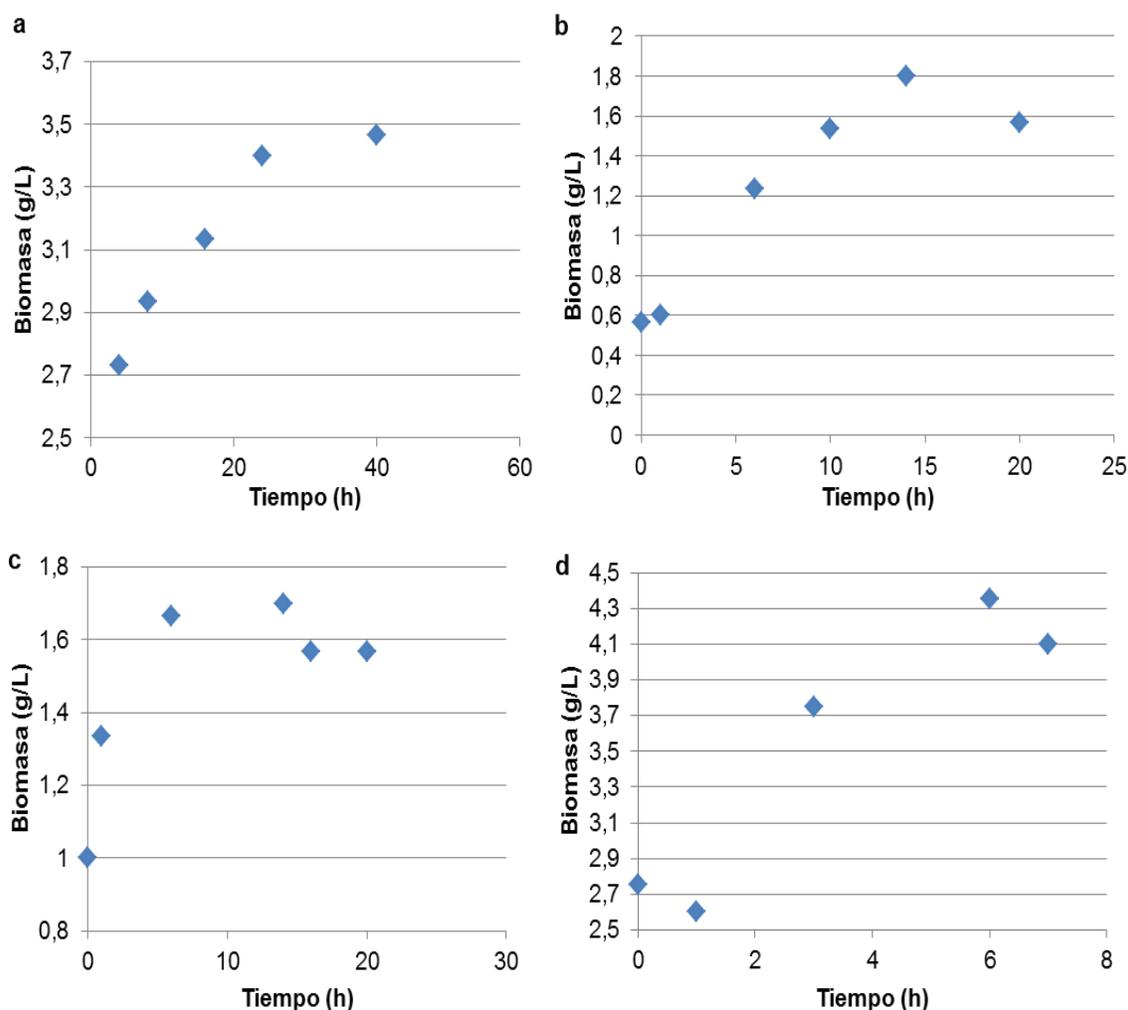
Fuente de carbono	Velocidad de crecimiento ( $\mu_{\text{máx}}$ )( $\text{h}^{-1}$ )	Tiempo de duplicación ( $t_d$ )(h)
Glucosa	0,248	2,79
Melaza	0,208	3,33
Burlanda	0,319	2,17
JRC	0,317	2,18

**Curvas de crecimiento de *L. rhamnosus* RC007 en medios de cultivo suplementados con diferentes fuentes de carbono.**

El medio MRS se considera un medio de cultivo que contiene macro y microelementos específicos para la producción de los lactobacilos (DeMan, Rogosa y Sharpe, 1960; Axelsson, 2004). Sin embargo, no resulta rentable, por lo que en este trabajo surge la necesidad de buscar otras fuentes económicas de materia prima.

Por esta razón, se realizaron diferentes curvas de crecimiento, utilizando el medio de cultivo comercial para lactobacilos MRS y se comparó el desarrollo de la cepa reemplazando la fuente de carbono glucosa con: melaza, lactosuero y JRC (el equivalente a 8 g/L de carbono). En todos los casos se incubó a 37°C sin microaerofilia, esto se debe a que se pretende escalar la producción a nivel industrial y la generación de microerofilia aumentaría considerablemente los costos de producción. El metabolismo respiratorio aumenta el rendimiento de la biomasa, así como la resistencia al estrés oxidativo y, por tanto, mejora el rendimiento en la producción de cultivos a gran escala (Pedersen y col., 2012; Rezaïki y col., 2004; Watanabe y col., 2012). Varios estudios han descrito el comportamiento de los lactobacilos con capacidad para usar oxígeno. Si bien *L. rhamnosus* es catalasa negativo, puede reaccionar con el oxígeno por un sistema de superóxido dismutasa y flavoproteína oxidasas implicadas en la degradación de aniones superóxido y peróxido de hidrógeno. De esta manera, la NADH oxidasa y la peroxidasa regeneran NAD<sup>+</sup>, que puede ser un beneficio fisiológico para las bacterias (Desmazeaud y de Roissart, 1994).

Otros autores demostraron que una cepa de *L. rhamnosus* C83 puede soportar más del 60% de oxígeno disuelto en el medio y que una pequeña cantidad de oxígeno (pO<sub>2</sub> 10%) parecía estimular el crecimiento bacteriano. También observaron que los niveles de oxígeno disuelto cayeron durante el desarrollo celular, lo que indicaría que el oxígeno fue consumido; bajo estas condiciones, la biomasa final, la tasa de crecimiento y el rendimiento de crecimiento se incrementaron sustancialmente (Gamar - Nourani y col., 1998). Este resultado confirma el efecto estimulador de una ligera aireación y sugiere que el oxígeno residual en el medio es suficiente para mantener un buen estado fisiológico.



**Figura 12.** Curva de crecimiento de *Lactobacillus rhamnosus* RC007 incubado en tubos sin microaerofilia a 37°C, en medios de cultivo suplementados con: (A) glucosa; (B) lactosuero; (C) melaza y (D) JRC.

**Tabla 8.** Parámetros cinéticos: velocidad de crecimiento ( $\mu_{\text{máx}}$ ) y tiempo de duplicación ( $T_d$ ), de *Lactobacillus rhamnosus* RC007 en medios de cultivo suplementados con diferentes fuentes de carbono, en tubos a 37°C, sin microaerofilia.

Fuente de carbono	Velocidad de crecimiento ( $\mu_{\text{máx}}$ )( $\text{h}^{-1}$ )	Tiempo de duplicación ( $t_d$ )(h)
Glucosa	0,0595	11,65
Melaza	0,06	11,55
Lactosuero	0,206	3,35
JRC	0,1575	4,4

En la Figura 12 A, se puede observar el desarrollo de *L. rhamnosus* RC007 en el medio de cultivo MRS, en el cual no presentó fase de latencia, lo que es esperado ya que es el medio de referencia para BAL. A las 20 h de cultivo se obtuvo la cosecha máxima de células viables ( $1 \times 10^9$  UFC/mL), donde se produjeron 3,1 g/L de biomasa seca, para lo que necesita consumir 15,5 g/L de glucosa. A las 24 h de cultivo se observó una estabilización del crecimiento bacteriano y por lo tanto del consumo de sustrato.

Cuando la cepa *L. rhamnosus* RC007 creció en medio suplementado con lactosuero como fuente de carbono se obtuvo la mayor velocidad de crecimiento ( $0,2066 \text{ h}^{-1}$ ), con una cosecha máxima de  $6,33 \times 10^8$  UFC/mL, a las 12 h de cultivo (Figura 12 B). La leche y el suero de leche bovina son considerados como buenos nutrientes para el crecimiento de bacterias del género *Lactobacillus*, ya que contienen fuente de nitrógeno en forma orgánica, complejos vitamínicos como el complejo B, pH adecuado, y una forma coloidal que deja disponible los nutrientes (Escobar y col., 2010).

En la Figura 12 C, se puede observar el desarrollo de esta cepa cuando la fuente de carbono fue melaza. Si bien, puede observarse una leve fase de latencia, lo cual es esperable ya que el inóculo fue crecido en medio MRS (original), el cultivo alcanzó una velocidad de crecimiento de  $0,0595 \text{ h}^{-1}$  con un máximo de  $1,57 \times 10^9$  UFC/mL a las 12 h de cultivo, similar a los resultados obtenidos en el medio MRS comercial. Esto puede deberse a los aportes nutricionales de la melaza ya que es una mezcla compleja que contiene sacarosa, azúcar invertido, sales y otros compuestos solubles. Además de los azúcares fermentables: sacarosa, glucosa, fructosa y rafinosa, también contiene sustancias reductoras no fermentables (Honig, 1974).

### **Diseños estadísticos experimentales**

El uso de los diseños estadísticos experimentales permite obtener una rápida aproximación hacia los factores clave que afectan el crecimiento celular y una buena proximidad a las concentraciones que maximizan el efecto sobre la variable de respuesta teniendo en cuenta las diferencias fisiológicas que puedan presentar los microorganismos de interés (Ren y col., 2008).

### **Diseño de selección de Plackett- Burman**

El proceso incluyó primero la identificación de los componentes del medio de cultivo más influyentes, para así enfocar la investigación sobre un subconjunto de componentes

críticos del medio (Plackett y Burman, 1946). El diseño P-B fue usado para identificar las variables que tenían efecto significativo sobre el crecimiento celular.

La fuente de carbono seleccionada para *S. cerevisiae* RC016 fue la burlanda o DDGs, ya que presentó los mejores parámetros cinéticos y además posee ventajas nutricionales y económicas por ser un co-producto de la industria alimentaria propio de la región pampeana y esto disminuye los costos de producción. Se decidió producir un extracto de DDGs a partir del material particulado, para lo cual se colocaron 75 g en 300 ml de agua destilada (20%) a vapor fluente durante 20 min y luego se utilizó el filtrado (extracto) para realizar el medio de cultivo.

En el caso de *L. rhamnosus* RC007, cuando se utilizó el medio suplementado con suero de leche se obtuvieron los mejores parámetros cinéticos (mayor velocidad de crecimiento y el menor tiempo de duplicación). Sin embargo, cuando se analizaron la producción de biomasa máxima y el rendimiento, que muestra la relación entre que la biomasa producida y la cantidad de fuente de carbono consumida, se observó que aunque el medio con glucosa y el medio con melaza mostraron rendimientos máximos similares, estos valores se lograron a las 20 h para MRS y a las 12 h con melaza, demostrando parámetros similares que el medio con glucosa, pero también mejores parámetros productivos, específicamente la producción máxima obtenida en un tiempo menor. Estos resultados demuestran que el uso de melaza constituye un recurso adecuado para optimizar la producción de biomasa a gran escala de *L. rhamnosus* RC007.

En las Tablas 9 y 10 se muestran las variables y niveles (máximo (1) y mínimo (-1)) analizados en cada caso, los que fueron seleccionados de acuerdo con los criterios de aumento en la concentración celular, de acuerdo al diseño de selección de Plackett-Burman.

**Tabla 9.** Diseño de selección de Plackett- Burman para *S. cerevisiae* RC016 con DDGse como fuente de carbono.

VARIABLES	NIVELES	
	-1	1
DDGse (%)	14	28
Urea (%)	0	0,5
YE (%)	0,5	1
Tiempo (h)	1	13

\* DDGse: extracto de DDGs, YE: extracto de levadura

**Tabla 10.** Diseño de selección de Plackett- Burman para *L. rhamnosus* RC007 con melaza como fuente de carbono.

VARIABLES	NIVELES	
	-1	1
Azúcares reductores (g/L)	20	40
Peptona (g/L)	0	10
Extracto de levadura (g/L)	0	5
Concentrado de sales	A	P
Agitación (rpm)	0	100
CaCO <sub>3</sub>	A	P

\*A: ausencia; P: presencia.

### **Diseño de optimización de Box- Behnken**

Posteriormente, se realizó la optimización a través del diseño de Box- Behnken para llegar a la óptima respuesta para la producción de biomasa.

Las variables ensayadas para *S. cerevisiae* RC016 fueron: concentración de extracto de DDGs (rango de 10 a 30%), concentración de urea (rango de 0 a 1%) y tiempo de incubación (rango de 12 a 24 h), no se incluyó extracto de levadura dado su costo por lo cual se dejó fijó en 1% (en los diseños de selección mostró la mayor producción de biomasa en ese porcentaje).

Para la BAL, sólo se ensayaron las variables que resultaron significativas en la selección que fueron la concentración de azúcares reductores (rango de 10 a 20 g/L), la concentración de extracto de levadura (rango de 0 a 2,5 g/L) y la concentración de  $\text{CaCO}_3$  (rango entre 10 a 12 g/L); el resto de los componentes permanecieron fijos en las concentraciones que mostraron mayor crecimiento.

### **Metodología de superficie de respuesta**

El diseño de Box- Behnken permitió construir gráficos de superficie a partir de las combinaciones de los pares de factores, manteniendo el tercer factor a nivel cero a fin de ilustrar los efectos principales de las variables y sus efectos interactivos sobre la producción de biomasa de *S. cerevisiae* RC016 y de *L. rhamnosus* RC007. La naturaleza elíptica de los gráficos de contorno indica que las interacciones entre las variables independientes fueron significativas (Figura 13 y 14).

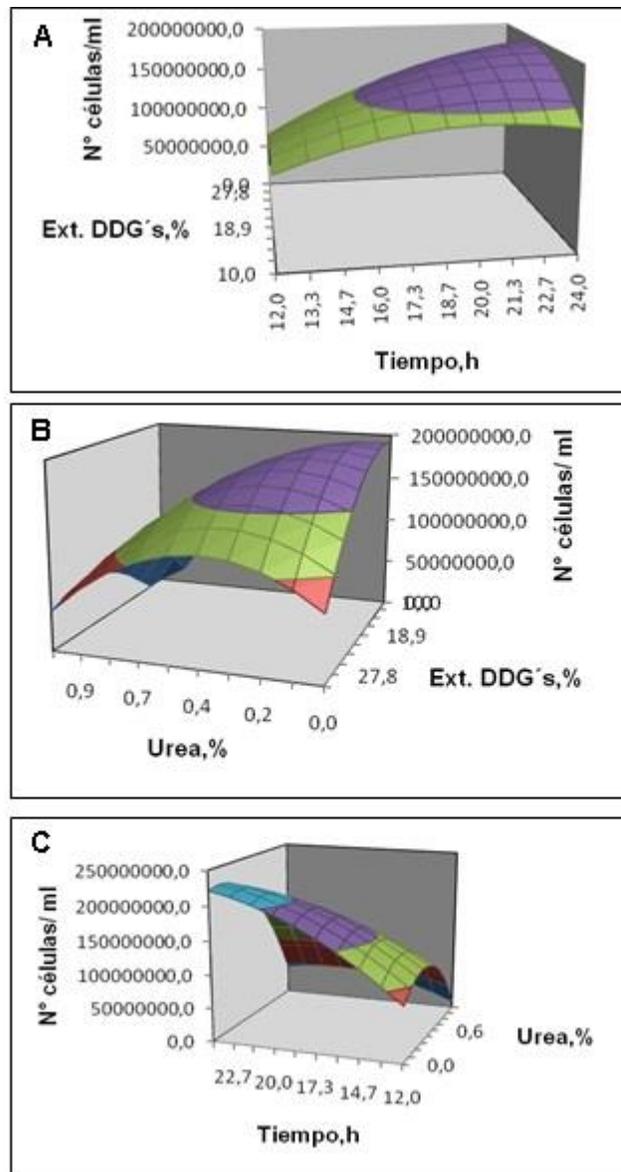
En las Tablas 9 y 10 se muestran los valores óptimos de cada una de las variables que afectaron significativamente el crecimiento de *S. cerevisiae* RC0016 y *L. rhamnosus* RC007.

**Tabla 9.** Valores óptimos de las variables que afectaron significativamente el crecimiento de *S. cerevisiae* RC0016.

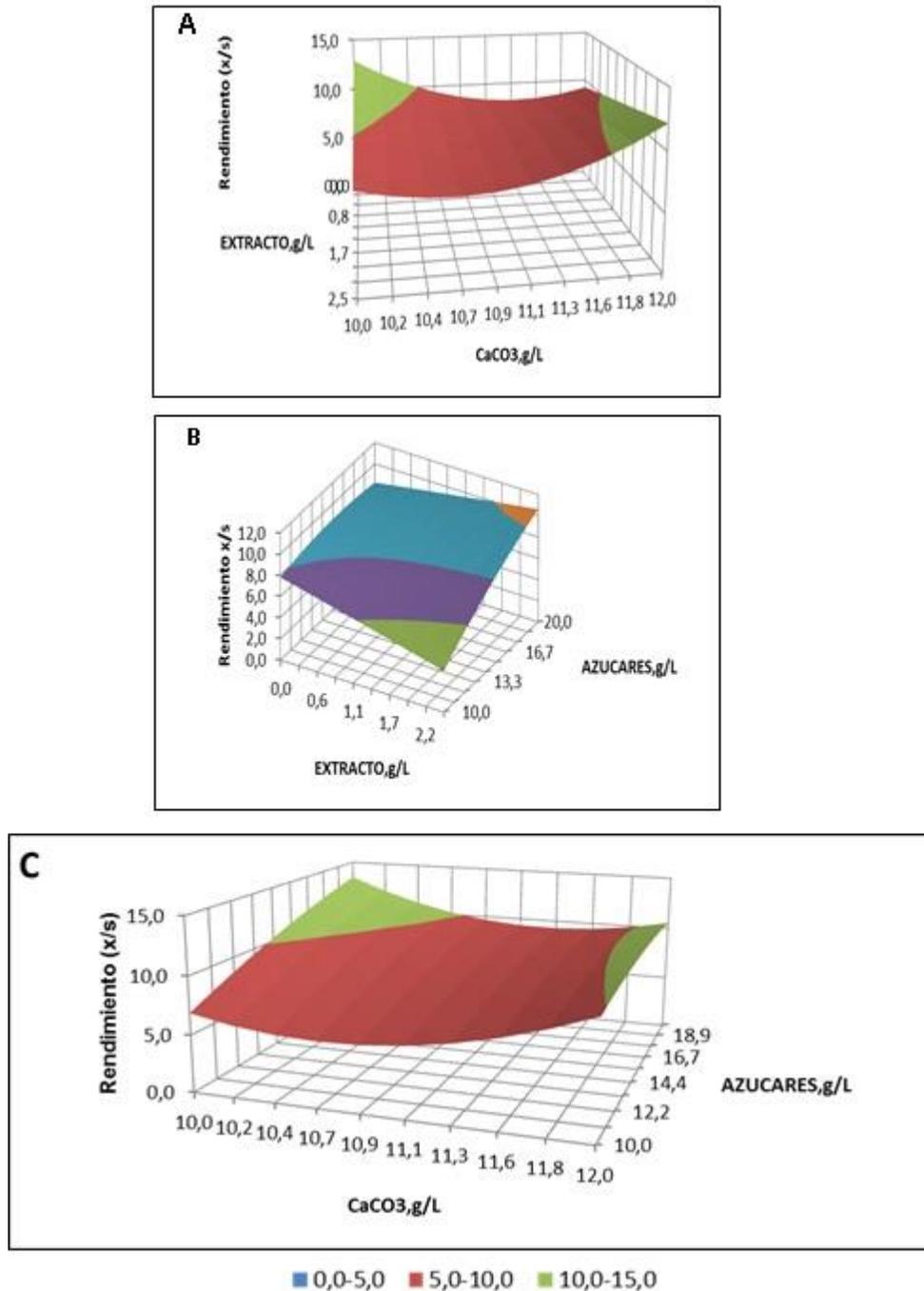
VARIABLES	VALORES ÓPTIMOS
Concentración de extracto de DDG´s	18,9% (m/v)
Concentración de urea	0% (m/v)
Concentración de extracto de levadura	1% (m/v)
Tiempo de incubación	21,3 h
<b>Respuesta máxima: <math>2,53 \times 10^8</math> células/ mL</b>	

**Tabla 10.** Valores óptimos de las variables que afectaron significativamente el crecimiento de *L. rhamnosus* RC0007.

VARIABLES	VALORES ÓPTIMOS
Azúcares reductores	10 g/L
CaCO <sub>3</sub>	10,22 g/L
Concentración de extracto de levadura	2,5 g/L
<b>Respuesta máxima (Rendimiento x/s): 0,68 g/g</b>	



**Figura 13.** Gráficos de contorno para el diseño de optimización que muestra el efecto sobre el crecimiento de *S. cerevisiae* RC016 (N° células/ mL) de: (A) concentración de extracto de DDG's (%) y tiempo de incubación (h), (B) concentración de urea (%) y concentración de extracto de DDG's (%), (C) concentración de urea (%) y tiempo de incubación (h). La escala de colores muestra los niveles de producción de biomasa de la levadura.



**Figura 14.** Gráficos de contorno para el diseño de optimización que muestra el efecto sobre el crecimiento de *L. rhamnosus* RC007 (rendimiento x/s) de: (A) extracto de levadura (g/L) y CaCO<sub>3</sub> (g/L), (B) azúcares reductores (g/L) y extracto de levadura (g/L), (C) azúcares reductores (g/L) y CaCO<sub>3</sub> (g/L). La escala de colores muestra los niveles de producción de biomasa.

**b) Escalado de la producción de biomasa de *S. cerevisiae* RC016 y *L. rhamnosus* RC007.**

**Parámetro de escalado: tiempo de mezclado**

Los bioprocesos se desarrollan e implementan de diferentes maneras, en sus escalas de laboratorio, piloto e industrial. El escalado puede definirse como el procedimiento para diseñar y construir un sistema de gran escala en base a los resultados de experimentos con equipamiento de pequeña escala. El desempeño de los bioprocesos es afectado por varios parámetros: el diseño geométrico, las variables de operación, las propiedades del fluido, los procesos de transporte y la cinética de los organismos.

El objetivo es trasladar a una escala mayor el diseño de un prototipo optimizado, considerando toda esta complejidad de parámetros.

Las reglas generales para el escalado están basadas en aquellos parámetros que se pueden mantener constantes. Uno de los criterios de escalado más típico es mantener constante el tiempo de mezclado.

El tiempo de mezclado es el tiempo requerido para alcanzar un determinado grado de homogeneidad. Se define al tiempo de mezclado como el tiempo requerido para alcanzar un 90% de homogeneidad luego de la inyección de un pulso de trazador. Como trazador es posible utilizar una sustancia coloreada,  $\text{HO}^-$ ,  $\text{H}^+$  o cualquier otra sustancia que pueda ser medida en el tiempo y que no altera la dinámica del sistema de mezclado (Tabla 11).

El tiempo de mezclado de un bioreactor dependerá de su diseño (geometría, forma y tamaño de las hélices), de la viscosidad del medio que se esté utilizando y de la velocidad de agitación (rpm) con las que se trabaje.

Un mezclado insuficiente puede causar regiones en las que haya deficiencia de oxígeno o de algún otro nutriente, gradientes importantes de temperatura y pH, por ello, es importante estudiar el efecto de las variables de operación sobre el grado de mezclado que se pueda alcanzar en el biorreactor.

**Tabla 11.** Parámetro de escalado tiempo de mezclado medido en distintas condiciones de agitación y de pH.

Velocidad de agitación (rpm)	Tiempo (seg)	
	Base	Ácido
200	130	90
300	80	30
400	60	20
500	90	50

### Validación de los medios optimizados en biorreactor

Luego de haber escogido las condiciones del medio de cultivo en las cuales se observó la mayor producción de biomasa tanto de *S. cerevisiae* RC016 como de *L. rhamnosus* RC007, según los análisis estadísticos arrojados por las fermentaciones realizadas en Erlenmeyer, se llevaron a cabo las fermentaciones en biorreactor a fin de validar los resultados obtenidos.

En la mayoría de los procesos fermentativos el objetivo principal es la conversión del sustrato en un producto metabólico primario o secundario útil, como antibióticos, etanol y ácidos orgánicos; donde una vez alcanzada la cantidad óptima del producto deseado, los organismos producidos son simplemente materiales de desecho que deben eliminarse de forma segura y a un costo, o simplemente se utilizan como una fuente barata de alimento para animales. Sin embargo, en la producción de biomasa, las células producidas durante el proceso de fermentación son los productos finales. En consecuencia, la fermentación se optimiza para la producción de una concentración máxima de células microbianas. La biomasa microbiana se usa ampliamente para diferentes propósitos, como cultivos iniciadores de fermentación e inóculos para fermentaciones de alimentos y bebidas, procesos de tratamiento de desechos, producción de ensilaje, inoculantes agrícolas, lixiviación de minerales y como bioplaguicidas; también como fuente de proteínas para la alimentación humana, ya que puede formularse en una amplia gama de alimentos; y también para formular alimentos para los animales, como es el objetivo de este trabajo.

En este trabajo las fermentaciones se realizaron en condiciones de cultivo discontinuo (batch), donde todos los componentes se añaden desde el principio sin renovarse y se determinaron los parámetros de crecimiento claves que permitieron optimizar la producción de biomasa.

La operación del biorreactor incluyó distintas etapas prácticas, tales como, la carga del fermentador con medio fresco; la esterilización del fermentador y medio de cultivo; la inoculación del fermentador; el crecimiento del microorganismo; la recolección de la biomasa junto con el medio de cultivo gastado; y finalmente la limpieza del recipiente.

Las fuentes de carbono seleccionadas para formular los medios de cultivo para validar en biorreactor presentaron todos los requisitos nutricionales necesarios para el crecimiento de cada microorganismo (levadura y BAL), pero no cumplían con los objetivos técnicos del proceso. Entre los factores que pueden afectar la elección final de las materias primas se encuentran: la calidad constante de los distintos lotes, la facilidad de manejo en forma líquida, junto con los costos asociados requeridos para su esterilización (pre tratamientos), las características de formulación, problemas en el mezclado por la viscosidad, que influyen directamente en la agitación, la aireación y la formación de espuma durante el proceso, como así también los niveles y el rango de impurezas no deseadas generados durante el proceso (Wee y col., 2006).

Por estas razones, se decidió utilizar en sus reemplazos, la fuente de carbono JRC, el cual es una solución de levulosa y dextrosa, obtenido por proceso de hidrólisis total del almidón de maíz, seguida de conversión enzimática y posterior refinación.

Este medio de cultivo se utilizó tanto en la etapa de propagación del inóculo como en la fermentación de producción principal a fin de disminuir la etapa de adaptación y permitir el crecimiento óptimo de la levadura y la BAL.

La Tabla 12 muestra que la producción de biomasa en biorreactor de *S. cerevisiae* RC016 y *L. rhamnosus* RC007, mejoró notablemente en el medio optimizado con JRC, debido a su gran contenido en azúcares reductores, su consistencia y ausencia de color e impurezas y su bajo costo, lo que hace rentable al proceso.

**Tabla 12.** Parámetros cinéticos y productivos de *S. cerevisiae* RC016 y *L. rhamnosus* RC007 utilizando JRC como fuente de carbono para el medio de cultivo optimizado.

Microorganismos	Parámetros				
	Cinéticos		Productivos		
	Velocidad de crecimiento	Tiempo de duplicación	Productividad	Producción máxima	Rendimiento
	$\mu_{\text{máx}}$ ( $\text{h}^{-1}$ )	$T_d$ (h)	P (g/L.h)	$P_{\text{máx}}$ (g/L)	$Y_{x/s}$ (g/g) (%)
<i>S. cerevisiae</i> RC016	0,26	2,66	0,92	3,4 (6h)	0,647 (64,7%)
<i>L. rhamnosus</i> RC007	0,15	4,40	0,72	1,6 (6)	0,058 (5,8%)

La optimización total del sistema permitió hacer una descripción completa de todos los parámetros que afectan el crecimiento. En el caso de la producción de biomasa, un parámetro importante es el coeficiente de rendimiento (Y), que relaciona la cantidad de biomasa producida por gramo de sustrato utilizado. Por lo tanto, cuanto mayor sea el coeficiente de rendimiento, mayor será el porcentaje del sustrato original convertido en biomasa microbiana. La determinación de los coeficientes de rendimiento es de vital importancia porque el costo del medio de cultivo, particularmente la fuente de carbono, es una proporción significativa del costo de producción total.

### c) Formulación de aditivos alimentarios biológicos simples y en mezcla.

Una vez completado el proceso de fermentación, que generalmente se determina al medir la concentración de los microorganismos probióticos ensayados en el fermentador, las células se recuperan mediante centrifugación o filtración (Champagne y col., 2007). El nivel de pureza que se debe alcanzar generalmente está determinado por el uso específico del producto. No solo es importante reducir las pérdidas de masa del producto, sino que la retención de la actividad biológica del producto es de vital importancia.

Cada etapa del procedimiento de recuperación general depende en gran medida del protocolo de la fermentación anterior. En este punto, la elección de JRC como fuente de carbono y energía en reemplazo de la burlanda y la melaza (para cada caso), que

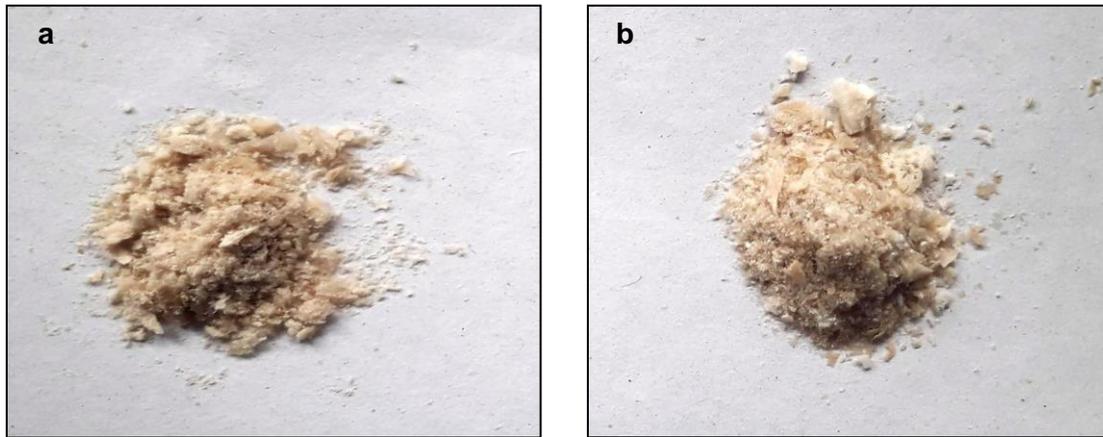
contenían muchas impurezas, nos permitió acelerar el proceso de recuperación de la biomasa y aumentar el rendimiento del producto.

Después de la fermentación, las células bacterianas y de levadura generalmente se secan para facilitar su transporte y almacenamiento, para mantener los microorganismos viables, estables y puros. Los microorganismos probióticos generalmente se secan mediante liofilización o secado por pulverización (Muller y col., 2009). Mantener la viabilidad celular durante el secado es crítico para la producción exitosa de probióticos (Meng y col., 2008).

En este trabajo se realizó una liofilización, un proceso que consiste en dos etapas: congelación y secado. En este método el agua se elimina por sublimación al vacío, directamente del estado sólido al estado vapor. Para eliminar el daño térmico y osmótico se utilizan crioprotectores (Ananta y col., 2004; Bond, 2007). En el caso de la levadura, se utilizó como crioprotector leche descremada al 10% y extracto de levadura, mientras que para la BAL, leche descremada al 10%.

En la Figura 15 se puede observar la textura final del polvo liofilizado de cada microorganismo.

Finalizado el proceso de liofilización se determinó la viabilidad de los microorganismos en placas con agar YPD (para levaduras) y MRS (para BAL). El uso del crioprotector leche descremada, permitió una buena viabilidad para la BAL y la adición de extracto de levadura al 0,5% fue adecuado para recuperar la viabilidad de las levaduras. Se lograron recuentos de  $9,7 \times 10^8$  UFC/g para *S. cerevisiae* RC016 y  $9,3 \times 10^8$  UFC/g para *L. rhamnosus* RC007, los cuales resultan favorables para la formulación de los aditivos para alimentación animal.



**Figura 15.** Fotografía del polvo obtenido luego del proceso de liofilización: (A) *S. cerevisiae* RC016 y (B) *L. rhamnosus* RC007.

Finalmente se procedió a realizar los formulados de aditivos para ser aplicados a los alimentos en los ensayos *in vivo*. En el caso del formulado simple se mezcló el polvo liofilizado de la levadura ( $1 \times 10^7$  células/g) al 0,1% con la dieta basal (concentrado de maíz). Para el formulado mixto, la mezcla (1:1) de microorganismos liofilizados: *L. rhamnosus* RC007 ( $1 \times 10^8$  células/g) y *S. cerevisiae* RC016 ( $1 \times 10^7$  células/g) se utilizó al 0,1% en la dieta basal.

**CONCLUSIONES PARCIALES**

La estrategia tecnológica aplicada permitió la producción de altas densidades de biomasa seca de *S. crevisiae* RC016 y *L. rhamnosus* RC007 en medios de cultivo optimizados con un sustrato de bajo costo utilizando los diseños estadísticos experimentales, para formular aditivos simples y mixtos (con microorganismos estables, viables y puros) aceptable para alimentación animal.

## ***Capítulo II***

---

**DINÁMICA DE LA REDUCCIÓN DE AFLATOXINA B<sub>1</sub> EN PRESENCIA DE  
*S. cerevisiae* RC016 Y *L. rhamnosus* RC007.  
Influencia del tracto gastrointestinal simulado.**

## INTRODUCCIÓN

El rendimiento en la producción animal se ve afectado por la disminución del valor nutritivo del alimento y por el impacto negativo que esto produce en la salud de los animales. La contaminación por micotoxinas reduce la eficiencia de crecimiento, disminuye la conversión de alimento y las tasas de reproducción, perjudica la resistencia a enfermedades infecciosas, reduce la eficacia de la vacunación, e induce daño patológico en distintos órganos (CAST, 2003).

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). La contaminación del producto puede ocurrir en cualquier punto de la cadena alimenticia, desde la cosecha, la recolección, el almacenamiento hasta el transporte, la elaboración y la conservación. Las micotoxinas representan un grave problema en Argentina donde las condiciones climáticas y las prácticas agrícolas se consideran propicias para el crecimiento de hongos y la producción de micotoxinas (González Pereyra y col., 2008; Magnoli y col., 2002).

El impacto económico de las micotoxinas en la producción animal incluye un aumento en los costos de producción, disminución de la producción, disposición final de alimentos y materias primas contaminadas.

Cada toxina tiene características y efectos específicos, sin embargo, cabe destacar que la presencia de dos o más micotoxinas, como normalmente se encuentran en la naturaleza, puede causar más efectos adversos, que la presencia de una sola (Jand y col., 1995).

Los grupos más importantes de micotoxinas que se encuentran en la alimentación animal son producidos por los géneros: *Aspergillus* (AFs y OTA), *Penicillium* (OTA) y especies de *Fusarium* (tricotecenos, FBs y ZEA) (Marin y col., 2013).

Para reducir la carga de micotoxinas en las materias primas y alimentos existen estrategias pre y post cosecha, sin embargo, una vez que las micotoxinas han alcanzado a contaminar un ingrediente o un alimento, resulta sumamente difícil lograr su total eliminación. Algunos métodos eficaces para evitar los riesgos de exposición a las micotoxinas en la cría de animales se basan en el uso de microorganismos que puedan adsorber las micotoxinas limitando de este modo su biodisponibilidad en el cuerpo del

animal (Yiannikouris y col., 2003) y/o utilizando sus enzimas para degradarlas a compuestos menos tóxicos o no tóxicos, permitiendo la desintoxicación biológica de las micotoxinas (Taylor y Draughon, 2001).

La utilización de microorganismos que poseen estructuras en la pared celular con capacidad para adherir micotoxinas incluyen integrantes de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, y levaduras (*S. cerevisiae*) que se utilizan ampliamente en la fermentación de los alimentos (Celik y col., 2003; Shetty y Jespersen, 2006).

Las BAL muestran potencial para mitigar los efectos tóxicos de las aflatoxinas en los alimentos y piensos. Éstas inhiben el crecimiento de hongos toxicogénicos y la producción de aflatoxinas, debido probablemente a la competencia por los nutrientes entre las células bacterianas y los hongos. La unión de las BAL a las aflatoxinas en diferentes matrices depende de las condiciones ambientales y es específica de la cepa. Los lactobacilos están muy estudiados y ofrecen posibilidades notables en la unión a AFB<sub>1</sub> y AFM<sub>1</sub> en los alimentos (Ahlberg y col., 2015).

Estos nuevos productos son generalmente de alto costo económico lo que limita su uso en los sistemas de producción animal. Desde esta perspectiva adquiere importancia la realización de estudios que contribuyan con la generación de productos con efectos positivos demostrados en la producción animal, que combinan las propiedades probióticas y las de adsorción de micotoxinas.

Algunos autores han demostrado que las condiciones de cultivo para la producción de microorganismos, 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. Estos oligosacáridos (β 1-3 glucano y manano-proteínas) constituyen el sitio de unión a varias micotoxinas, entre ellas, AFs, FBs, ZEA y OTA (Aguilar-Uscanga y Francois, 2003; Yiannikouris y col., 2004).

Es por esto que las condiciones de cultivo y las del TGI podrían producir modificaciones estructurales en la pared celular de la levadura influenciando la adsorción de micotoxinas.

## HIPÓTESIS

“Los microorganismos probióticos pueden adsorber, desorber y/o degradar micotoxinas, como método eficaz para evitar los riesgos de exposición a las micotoxinas en los animales y limitar de este modo su biodisponibilidad en el tracto gastrointestinal.

Las condiciones de cultivo para la producción de biomasa a gran escala, tales como el pH, la temperatura, la oxigenación, la naturaleza y concentración de la fuente de carbono modulan la cantidad y las propiedades estructurales de la pared celular de los microorganismos y por eso influyen sobre la adsorción y biodisponibilidad de las micotoxinas en el tracto gastrointestinal.”

## OBJETIVOS

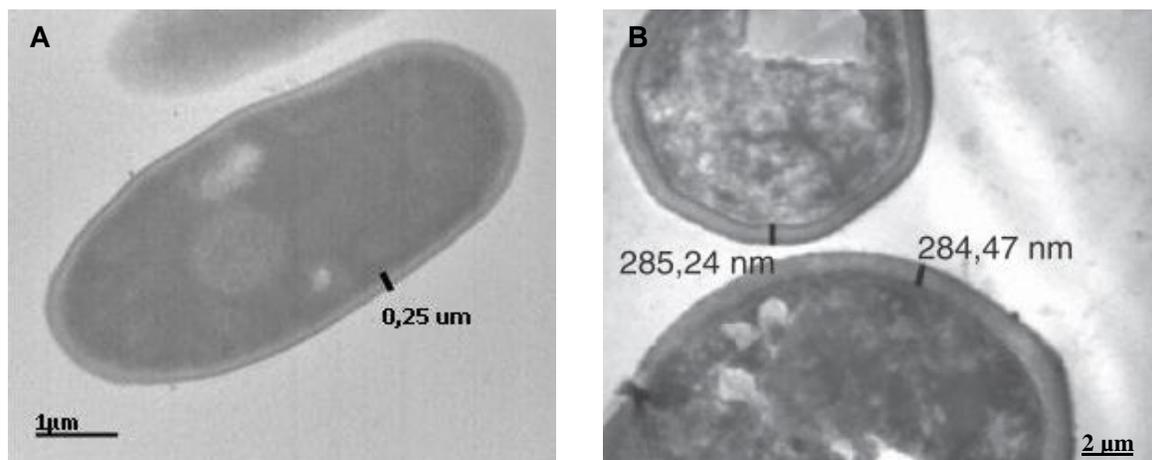
1. Estudiar la variabilidad ultraestructural de la pared celular de *S. cerevisiae* RC016 expuesta a diferentes componentes del medio de cultivo y su influencia sobre la adsorción de AFB<sub>1</sub> en el TGI simulado.
2. Determinar la composición química por espectroscopia IR de *Saccharomyces cerevisiae* RC016 expuesta a diferentes componentes del medio de cultivo y a las condiciones simuladas del TGI.
3. Determinar la capacidad de adsorción, desorción y/o degradación de AFB<sub>1</sub> de *L. rhamnosus* RC007 simulando el pasaje por el TGI.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### a) Variabilidad estructural de la pared de *Saccharomyces cerevisiae* RC016 y su influencia sobre la adsorción de aflatoxina B<sub>1</sub>.

#### Determinación del tamaño de la pared celular de *Saccharomyces cerevisiae* RC016 por microscopía electrónica de transmisión y microscopía óptica de alta resolución

La morfología de la pared celular de levadura determinada por MET se muestra en la Figura 16. Estas células exhiben gran diversidad con respecto al área, diámetro y espesor de pared, la Tabla 13 muestra que estos valores fueron significativamente diferentes cuando la misma creció en medio YPD y en DDGse optimizado.



**Figura 16.** Análisis de la ultraestructura de las células de levaduras de *Saccharomyces cerevisiae* RC0016: (a) espesor de la pared celular en medio DDGse y (b) espesor de la pared celular en medio YPD. Ampliación 12 000.

Las observaciones por MET revelan que tanto el área como el diámetro de la pared disminuyeron significativamente en el medio DDGse optimizado (36,4 y 16,9%, respectivamente), a diferencia del espesor de la pared donde se observó un aumento del 68% ( $p \leq 0,0001$ ).

**Tabla 13.** Análisis de la ultraestructura de la pared celular de *Saccharomyces cerevisiae* RC016.

Medio de cultivo	Área ( $\mu\text{m}^2$ )	Diámetro ( $\mu\text{m}$ )	Espesor de pared ( $\mu\text{m}$ )
	Media $\pm$ D.E.	Media $\pm$ D.E.	Media $\pm$ D.E.
DDGse	6,16 $\pm$ 0,55 b	2,84 $\pm$ 0,13 b	0,25 $\pm$ 0,01 a
YPD	9,69 $\pm$ 0,55 a	3,42 $\pm$ 0,13 a	0,08 $\pm$ 0,01 b

\* DDGse: extracto de granos secos de destilería con solubles; YPD: dextrosa, extracto de levadura, peptona. Las letras diferentes indican diferencia significativa ( $p < 0,0001$ ) según el test de la mínima diferencia significativa de Fisher (LSD). DE: desvío estándar.

### Determinación de la composición química de *Saccharomyces cerevisiae* RC016 por espectroscopia IR.

Para investigar las diferencias entre las células de levadura cultivadas en el medio YPD y el medio DDGse optimizado, así como para caracterizar el paso a través del TGI simulado, se realizó un análisis espectroscópico FT-IR de la composición química celular. Los cambios en el perfil y/o la intensidad de las bandas de absorción en las distintas regiones del espectro FT-IR representan variaciones en la composición y/o concentraciones de estos componentes en las células de levadura (Černá y col., 2003; Galichet y col., 2001).

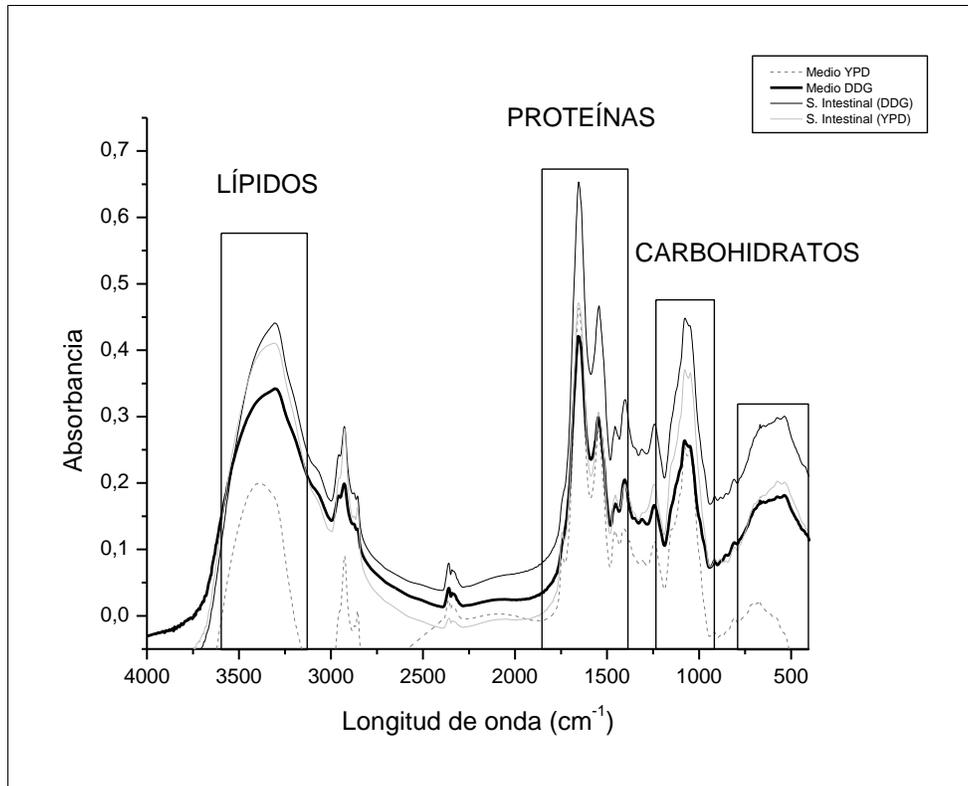
La Figura 17 muestra los espectros FTIR en el rango de frecuencia de  $4000\text{--}500\text{ cm}^{-1}$  de las células de levadura crecidas en medio YPD, DDGse y luego del paso a través del TGI simulado. Se observaron tres regiones principales correspondientes a carbohidratos ( $500 - 1250\text{ cm}^{-1}$ ), proteínas ( $1300 - 1900\text{ cm}^{-1}$ ) y lípidos ( $3000 - 3600\text{ cm}^{-1}$ ). Estos espectros se corresponden con los encontrados por Galichet y col. (2001) y Adt y col. (2006) que caracterizaron la pared celular de levaduras. En todos los tratamientos los espectros de las células enteras, tienen un patrón espectral similar y están casi superpuestos, lo que indica una composición química similar, pero la intensidad de absorbancia de cada tratamiento es ligeramente diferente.

En la región de los carbohidratos (rango espectral  $900 - 1400\text{ cm}^{-1}$ ) se encuentran las bandas donde absorben principalmente los azúcares presentes en la pared celular de la levadura (Figura 18). La mayoría de los polisacáridos de la célula de levadura se

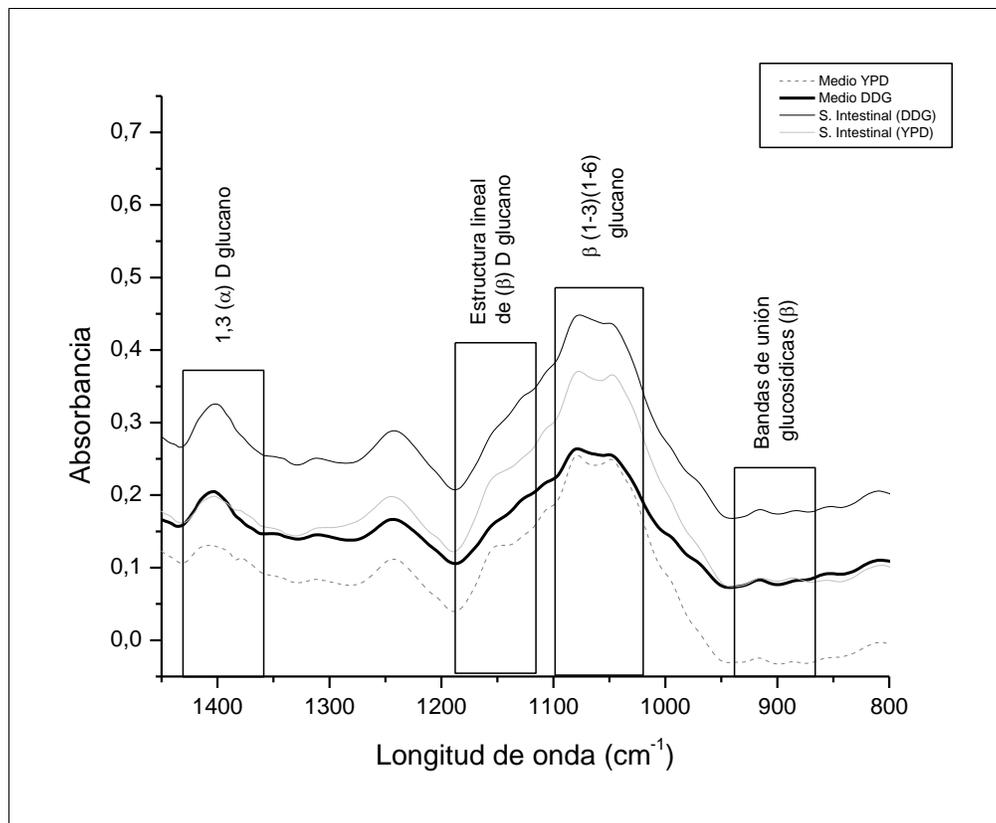
encuentran en su pared (Klis y col., 2002). Los glucanos, más precisamente los  $\beta$  (1-3) glucanos, son los componentes principales de la pared celular, son responsables de la forma y rigidez (Chauhan y col., 2002; Calderone y Braun 1991). Las bandas identificadas entre 1100 y 1000  $\text{cm}^{-1}$ , en general, se asignan a  $\beta$  (1-3) glucanos y  $\beta$  (1-6) glucanos. Estas asignaciones se basan en espectros de productos puros y extractos celulares (Michell y Scurfield, 1970). Otro componente encontrado de la pared celular son los mananos, donde las bandas de absorción se observaron a 968  $\text{cm}^{-1}$ , las que se corresponden con las encontradas por Adt y col. (2006) y Burattini y col. (2008). También se observó las proteínas y péptidos, representados por bandas de absorción de amidas I (1654  $\text{cm}^{-1}$ ) y amida II (1541  $\text{cm}^{-1}$ ), al igual que las encontradas por Naruemon y col. (2013) estudiando los cambios que ocurren en la composición de la pared celular cuando las células crecen en diversas condiciones.

Los espectros FT-IR de la biomasa de *S. cerevisiae* mostraron diferencias en las intensidades de la banda de absorción. En general, el medio DDGse presentó las bandas de absorción de mayor intensidad con respecto al control en YPD y éstas a su vez, se incrementan luego del pasaje por la solución intestinal artificial.

Estas diferencias observadas a partir de los perfiles de los espectros dependen del entorno de crecimiento y están influenciadas por las condiciones de pH, sales y enzimas del TGI simulado.



**Figura 17.** Composición en macromoléculas de células completas de *Saccharomyces cerevisiae* RC016 crecidas en diferentes medios de cultivo y sometidas luego a la solución intestinal artificial por espectrometría FT-IR.



**Figura 18.** Perfil de la región de polisacáridos presentes en las células completas de *Saccharomyces cerevisiae* RC016 crecidas en diferentes medios de cultivo y sometidas luego a la solución intestinal artificial por espectrometría FT-IR.

Este estudio mostró las posibilidades de la espectroscopia IR para detectar la influencia de las condiciones de fermentación en la composición macromolecular de la célula, principalmente a nivel de carbohidratos. Además, permitió demostrar que cuando las células de levadura se someten a las diferentes condiciones del TGI, también experimentan cambios en la composición.

**Capacidad de adsorción / desorción de aflatoxina B<sub>1</sub> por *Saccharomyces cerevisiae* RC016 en tracto gastrointestinal simulado.**

La pared celular de las levaduras es una estructura muy dinámica que responde rápidamente a cambios en el medio ambiente y al estrés (Aguilar-Uscanga y Francois, 2003; Klis y col., 2002). La composición química y la naturaleza física de la pared celular de *S. cerevisiae*, hace razonable pensar que las células presentan innumerables sitios en su superficie para la adsorción física de diferentes moléculas. Yiannikouris y col. (2004) estudiaron la influencia de los componentes de la pared celular de *S. cerevisiae* en la eficacia de la adsorción de micotoxinas. Caridi (2007) observó diferencias en la adsorción de OTA 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).

Estas diferencias que se observan en el grosor y la composición macromolecular de la pared celular de las levaduras podrían afectar la captación de micotoxinas y por esta razón se evaluó la capacidad de adsorción/desorción de AFB<sub>1</sub> de la levadura crecida en medio DDGse optimizado y simulando el pasaje por el TGI.

Cuando se simuló el TGI completo, se introdujo AFB<sub>1</sub> en una solución de saliva que simulaba la primera etapa del proceso de digestión cuando se comen alimentos contaminados. Considerando el tránsito de alimentos en el TGI, las células se pusieron en contacto con las otras soluciones (sin AFB<sub>1</sub>) y luego se recolectaron para determinar los niveles de adsorción que variaban de 8,9% en saliva a 73,9% en jugo gástrico (Tablas 14 y 15).

Cuando se simuló un TGI parcial, se realizaron tres ensayos separados para saber en qué etapa ocurrió el mejor nivel de adsorción (cada etapa contenía AFB<sub>1</sub>). Los niveles de adsorción variaron del 8,8% en el fluido intestinal al 95,3% en el jugo gástrico. Una vez más, la mayor adsorción se produjo a nivel del jugo gástrico.

Se ha demostrado que la pared celular de la levadura es el sitio donde se produce la adsorción de micotoxinas (Yiannikouris y col., 2004). El presente estudio se centró en explicar el comportamiento de adsorción de la AFB<sub>1</sub> frente a los cambios en la morfología

de la pared celular influenciados por la composición del medio de cultivo y los resultados demostraron que el incremento en el grosor de la pared celular permitió que la cepa *S. cerevisiae* RC016 crecida en el medio de cultivo DDGse sea más efectiva en la captación de AFB<sub>1</sub> en comparación con el uso del medio de cultivo comercial YPD que mostró un menor grosor de la pared celular y un menor porcentaje de adsorción de micotoxinas. Otros autores también demostraron que la cantidad de toxina eliminada dependía de la cantidad total de pared celular (Armando y col., 2012), así como de los microorganismos y las concentraciones de micotoxinas utilizadas (González Pereyra y col., 2014). Por otra parte, Yiannikouris y col. (2004) demostraron que el contenido de  $\beta$ -D-glucano y su disposición tridimensional en la pared celular afectaron la adsorción de micotoxinas. De acuerdo con nuestros resultados, Luo y col. (2015) mostraron que el contenido de 1,3- $\beta$ -glucano se correlacionaba con el grosor de la pared celular y la capacidad de adsorción de patulina. La cepa N-10, que tenía el mayor contenido de 1,3- $\beta$ -glucano, tenía la pared celular más gruesa y la mejor capacidad de adsorción de patulina, lo cual indicó que un mayor contenido de 1,3- $\beta$ -glucano formando una red tridimensional más densa y gruesa podría resultar en una mayor captación de micotoxina.

En este trabajo, el proceso de adsorción que simula los procesos completos de digestión en la boca (saliva), estómago (condiciones gástricas) e intestino permitió el estudio de la adsorción de AFB<sub>1</sub> durante el tránsito a través del TGI y la comparación de los porcentajes de adsorción en cada porción del mismo. La etapa con el mayor porcentaje de adsorción fue a nivel del estómago simulado y disminuyó a nivel intestinal. Estos resultados sugirieron que la estructura molecular de la micotoxina se vio afectada ya que el proceso de adsorción fue diferente en las diferentes etapas del TGI, probablemente debido al pH y otros constituyentes del tracto. Trabajos anteriores informaron que *S. cerevisiae* RC016 pudo sobrevivir y eliminar la AFB<sub>1</sub>. Aunque los porcentajes de remoción de micotoxinas variaron de 65,5% a 82%, no realizaron los experimentos en condiciones del TGI (Armando y col., 2011). En contraste con nuestros resultados, Madrigal-Santillán y col. (2006) concluyeron que el proceso de adsorción no cambió la estructura molecular de la micotoxina y especuló que otros factores, como la duración de la incubación, el pH, el método de purificación de la biomasa y los métodos de análisis, también estarían influyendo en este proceso. Yiannikouris y col. (2004), ensayaron la capacidad de adsorción de ZEA por *S. cerevisiae* a diferentes pH (representativos del TGI) y mostraron que en condiciones ácidas la adsorción de micotoxinas fue mayor (64 a 77%), lo que estaría indicando que el mecanismo de bioadsorción es afectado por las condiciones

ambientales. Este hecho refuerza la importancia de evaluar el efecto de las condiciones del TGI en la capacidad de *S. cerevisiae* RC016 para adsorber diferentes micotoxinas.

Estos resultados muestran una correlación entre la composición del medio y la variabilidad morfológica de la pared celular de la levadura que beneficia la captación de micotoxinas. El diseño y la composición del medio de cultivo deben permitir el desarrollo del microorganismo y mantener sus propiedades funcionales y tecnológicas después del escalado. La estructura de los polisacáridos de la pared celular de la levadura permiten la adsorción de micotoxinas principalmente a través de los glucomananos a través de enlaces de hidrógeno (Yiannikouris y col., 2004).

**Tabla 14.** Adsorción de aflatoxina B<sub>1</sub> (ng/mL) por *Saccharomyces cerevisiae* RC016 crecida en medio YPD simulando el pasaje a través del tracto gastrointestinal parcial y completo.

TGI simulado	AFB <sub>1</sub> Control Media (ng/mL) ± D.E.	Adsorción de AFB <sub>1</sub> Media (ng/mL) (%) ± D.E.	
		TGI Completo	TGI Parcial
<b>SS</b>	93,9 ± 5,1	21,5 (22,9) ± 6,5 a	31,6 (33,6) ± 2,4 b
<b>SG</b>	86,6 ± 1,0	17,4 (24,9) ± 0,8 a	7,3 (8,4) ± 1,7 a
<b>SI</b>	78,7 ± 6,6	51,5 (98,1) ± 1,8 b	5,4 (6,9) ± 2,1 a

\* TGI: tracto gastrointestinal. SS: solución salival, SG: solución gástrica, SI: solución intestinal. Las letras diferentes en las columnas indican diferencias significativas, de acuerdo con el test LSD de Fisher ( $p < 0.0001$ ). D.E: desvío estándar.

**Tabla 15.** Adsorción de aflatoxina B<sub>1</sub> (ng/mL) por *Saccharomyces cerevisiae* RC016 crecida en medio DDGse simulando el pasaje a través del tracto gastrointestinal parcial y completo.

TGI simulado	AFB <sub>1</sub> Control Media (ng/mL) ± D.E.	Adsorción de AFB <sub>1</sub> Media (ng/mL) (%) ± D.E.	
		TGI Completo	TGI Parcial
	SS	169,3 ± 10,6	15,6 (9,2) ± 4,1 a
SG	166,8 ± 8,3	101,3 (65,8) ± 0,8 c	20,4 (12,2) ± 2,4 a
SI	158,6 ± 1,6	52,4 (99,8) ± 0,2 b	23,2 (14,6) ± 3,2 a

\* TGI: tracto gastrointestinal. SS: solución salival, SG: solución gástrica, SI: solución intestinal. Las letras diferentes en las columnas indican diferencias significativas, de acuerdo con el test LSD de Fisher ( $p < 0.0001$ ). D.E: desvío estándar.

#### b) Adsorción/desorción/degradación de aflatoxina B<sub>1</sub> por *Lactobacillus rhamnosus* RC007

Las BAL son un grupo heterogéneo de bacterias, que tienen una estructura de la pared celular típica de un Gram-positivo, que es muy diferente de la estructura de la pared celular de *S. cerevisiae*. La pared celular de las BAL consiste en una matriz de peptidoglicano, principal componente estructural, también presenta ácido teicoico y lipoteicoico, la capa S proteinácea y polisacáridos neutros (Axelsson y col., 2004). Estos componentes desempeñan varias funciones incluyendo la adhesión y unión macromolecular, en especial la red fibrilar de ácidos teicoicos y polisacáridos neutros. Varios trabajos sugieren que tanto el peptidoglicano como los polisacáridos son los responsables en la unión de micotoxinas (Delcour y col., 1999; Haskard y col., 2000; Lahtinen y col., 2004).

Por lo tanto, dos procesos específicos como la unión y la inhibición de la biosíntesis pueden estar involucrados en la interacción entre la BAL y la acumulación de algunas micotoxinas. Una vez ingeridos las AFs, se absorben a través del TGI y se activan o desintoxican metabólicamente en las células de la mucosa intestinal y en el hígado, donde se someten a biotransformación por epoxidación, hidroxilación, desmetilación, conjugación u otros procesos espontáneos (Novoa y col., 2006).

### Efecto de las condiciones gastrointestinales simuladas sobre la unión de la aflatoxina B<sub>1</sub>.

La Tabla 16 muestra los niveles (ng) y los porcentajes (%) de adsorción y desorción de AFB<sub>1</sub> (93,89 ng) de *L. rhamnosus* RC007. El proceso de simulación del pasaje por el TGI comenzó con una solución salival artificial contaminada con AFB<sub>1</sub> y las sucesivas etapas continuaron con los niveles de AFB<sub>1</sub> que fueron desorbidos en cada etapa y los resultados se expresaron como niveles (ng) de AFB<sub>1</sub> presentes en cada solución que transitó a través del TGI. Es importante señalar aquí que las soluciones sobrenadantes libres de células que contienen la micotoxina no adsorbida por el pellet de la BAL se eliminaron y no continuaron los pasos subsiguientes del ensayo de acuerdo con la metodología empleada.

El porcentaje relativo de adsorción de AFB<sub>1</sub> en el pasaje a través de la solución salival fue bajo, al igual que el pasaje a través de la solución gástrica; mientras que se permite retener un alto porcentaje de AFB<sub>1</sub> a nivel de la solución intestinal. Estos resultados están directamente relacionados con los porcentajes relativos y totales de desorción que estaban entre 81,20% y 96,11% en las diferentes etapas del TGI.

**Tabla 16.** Capacidad de adsorción y desorción de aflatoxina B<sub>1</sub> de *Lactobacillus rhamnosus* RC007 simulando el pasaje por el tracto gastrointestinal completo.

TGI simulado	AFB <sub>1</sub> Control	Adsorción de aflatoxin B <sub>1</sub>		Desorción de aflatoxin B <sub>1</sub>	
	Media (ng/mL) ± D.E.	Media (ng/mL) ± D.E.	Porcentaje (%)	Media (ng/mL) ± D.E.	Porcentaje (%)
SS	93,89 ± 5,12	17,74 ± 3,88	18,8	76,15 ± 2,34	81,2
SG	17,74 ± 3,88	4,43 ± 2,03	4,71	13,31 ± 1,85	95,28
SI	4,43 ± 2,03	3,65 ± 0,48	3,89	0,78 ± 0,03	96,11

\*TGI: tracto gastrointestinal. SS: solución salival, SG: solución gástrica, SI: solución intestinal.

En un ensayo posterior, el pellet de esta BAL se enfrentó con AFB<sub>1</sub> para cada una de las soluciones que simulaban el TGI de forma independiente (Tabla 17). Este ensayo simuló lo que realmente ocurriría en el TGI ya que, de acuerdo con la metodología utilizada, la totalidad de la AFB<sub>1</sub> estaba presente en cada etapa y, en cada una de ellas, el proceso de adsorción y desorción fue evaluado nuevamente. Se observó que cuando la micotoxina estaba en contacto con la solución salival, el porcentaje de adsorción de AFB<sub>1</sub> era bajo. Sin embargo, esto no ocurrió en las soluciones gástrica e intestinal, ya que los niveles de adsorción fueron significativamente más altos ( $p < 0,0001$ ), superiores al 88%.

**Tabla 17.** Capacidad de adsorción y desorción de aflatoxina B<sub>1</sub> de *Lactobacillus rhamnosus* RC007 en cada porción del tracto gastrointestinal simulando.

TGI simulado	AFB <sub>1</sub> CONTROL	Adsorción de AFB <sub>1</sub>		Desorción de AFB <sub>1</sub>
	MEDIA (ng/mL) ± D.E.	MEDIA (ng/mL) ± D.E.	Porcentaje (%)	Porcentaje (%)
SS	93,89 ± 5,12	17,74 ± 3,88 <sup>a</sup>	18,8	81,2
SG	93,89 ± 5,12	83,49 ± 5,02 <sup>b</sup>	88,92	11,08
SI	93,89 ± 5,12	91,07 ± 5,28 <sup>b</sup>	96,99	3,01

\* TGI: tracto gastrointestinal. SS: solución salival, GS: solución gástrica, SI: solución intestinal.

### Ensayo de degradación de aflatoxina B<sub>1</sub>

En los últimos años, ha habido un interés creciente en la utilización de microorganismos para inhibir la absorción de micotoxinas en el TGI. Varios estudios en animales e *in vitro* han revelado la capacidad de las BAL y las bifidobacterias para unirse a las micotoxinas, reduciendo la biodisponibilidad o toxicidad (desintoxicación) (El-Nezami, y col., 2002; Niderkorn y col., 2007; Gratz y col., 2006; 2007; Turner y col., 2008).

Las bacterias del ácido láctico (LAB) se usan comúnmente en la producción de ensilaje y en productos alimenticios fermentados, éstas inhiben el crecimiento de hongos y por lo tanto prolongan la vida útil del producto (Broberg y col., 2007).

En general, se evalúa el potencial de diferentes cepas de BAL para prevenir el crecimiento de las cepas de hongos formadores de aflatoxinas y su capacidad de unirse a

estas en productos fermentados como leche y yogurt (Megalla y Hafez, 1982; Megalla y Mohran, 1984). Autores como Gourama y Bullerman (1995) y Dalié y col. (2010) sugirieron que el ácido láctico y otros metabolitos producidos por BAL desempeñan un papel importante en la inhibición de la síntesis de aflatoxinas.

Es escasa la literatura que informe la capacidad del sobrenadante libre de células de cepas de BAL de degradar AFB<sub>1</sub>, por lo que en este trabajo se evaluó la capacidad del extracto libre de células de *L. rhamnosus* RC007 de degradar AFB<sub>1</sub> en diferentes tiempos de exposición (Martinez y col., 2017).

La Tabla 18 muestra los porcentajes de degradación de AFB<sub>1</sub> por los extractos libres de células de *L. rhamnosus* RC007. Esta cepa presentó un rango entre 74,43% y 80,40% de la degradación entre 12 y 48 h de exposición, mostrando diferencias significativas a los 12, 24 y 48 h.

**Tabla 18.** Porcentajes de degradación de aflatoxin B<sub>1</sub> por el extracto libre de células de *Lactobacillus rhamnosus* RC007 en diferentes tiempos de exposición.

Tiempo de exposición (h)	Porcentaje de degradación Media (%) ± D.E.
12	74,43 ± 0,1 a
24	75,87 ± 0,3 a
48	80,40 ± 0,3 b

\* Las letras diferentes indican diferencia significativa según el test de la mínima diferencia significativa de Fisher (LSD)  $p < 0,05$ .

D.E: desvío estándar.

Martinez y col. (2017) demostraron que todas las cepas de BAL evaluadas fueron capaces de degradar AFB<sub>1</sub> con porcentajes superiores al 15%, lo que se corresponde con nuestros resultados.

La desintoxicación biológica de alimentos y piensos contaminados con aflatoxinas ha sido ampliamente investigada en los últimos años. Se ha informado la capacidad de degradar AFB<sub>1</sub> por variadas cepas de hongos, *Trametes versicolor* (Zjalic y col., 2006), *Pleurotus ostreatus* (Motomura y col., 2003) y *Armillariella tabescens* (Liu y col., 2001) y bacterias como, *Flavobacterium aurantiacum* (Smiley y Draughon 2000; Teniola y col., 2005; Alberts y col., 2006), *Mycobacterium fluoranthenorans* (Hormisch y col., 2004; Teniola y col.,

2005), *Rhodococcus erythropolis* (Teniola y col., 2005; Alberts y col., 2006), *Bacillus licheniformis* (Petchkongkaew y col., 2008) and *Stenotrophomonas maltophilia* (Guan y col., 2008).

Otros estudios investigan las enzimas capaces de degradar aflatoxina (Liu y col., 2001; Motomura y col., 2003; Alberts y col., 2009). Sin embargo, éstas se aislaron de hongos, y la mayoría de ellas se encontró que eran enzimas intracelulares. La actividad de las enzimas se ve influida por el proceso de trituración de los micelios, que afecta a los estudios adicionales sobre las mismas.

La utilización de *L. rhamnosus* RC007 para la formulación de un aditivo para alimentación animal aporta no sólo sus características probióticas, sino también la capacidad de reducir AFB<sub>1</sub> complementando los procesos de adsorción y/o biodegradación, lo que se puede trasladar en una disminución de la biodisponibilidad de esta micotoxina a nivel del TGI animal.

**CONCLUSIONES PARCIALES**

La pared celular de *S. cerevisiae* RC016 fue modificada tanto en su ultraestructura como en el perfil de macromoléculas por influencia del medio de cultivo y las condiciones del TGI, afectando la capacidad de adsorción de AFB<sub>1</sub>.

La BAL *L. rhamnosus* RC007 demostró su capacidad de adsorber AFB<sub>1</sub> en el pellet bacteriano sometido a las condiciones del TGI y también el extracto libre de células logró disminuir la concentración de AFB<sub>1</sub> por biotransformación.

### ***Capítulo III***

---

**SEGURIDAD Y EFICACIA DE LA APLICACIÓN DE ADITIVOS BIOLÓGICOS  
SIMPLES Y MIXTOS COMO PROBIÓTICOS ANTIMICOTOXINAS.**

## INTRODUCCIÓN

La contaminación de la alimentación animal con micotoxinas ocurre todavía con mucha frecuencia, a pesar de los grandes esfuerzos para prevenirla. Los alimentos para animales están contaminados, en niveles bajos, con varias micotoxinas, particularmente con aquellas producidas por los géneros *Aspergillus* y *Fusarium*, generalmente se encuentran AFB<sub>1</sub>, OTA, ZEA, DON y FB<sub>1</sub> (Vila-Donat y col., 2018).

La industria avícola se ha convertido en una importante actividad económica en Argentina. De acuerdo a las cifras aportadas por la Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca, en los últimos años en Argentina se ha incrementado notablemente el consumo de carne de ave (SAGyP, 2017).

Las aves de corral están expuestas a las micotoxinas al consumir alimentos preparados con materias primas contaminadas. La micotoxicosis producida además de afectar la salud de las aves de corral, reduce la producción y afecta la disponibilidad de ciertos productos y su comercialización (Oğuz, 2011). En Argentina se ha demostrado la incidencia natural de cepas aflatoxigénicas y la presencia de aflatoxina en los alimentos de aves de corral (Barros y col., 2009; Magnoli y col., 2002; 2011).

Las aflatoxinas causan una variedad de efectos en las aves de corral, incluyendo disminución en el aumento de peso, baja eficiencia alimenticia, reducción en la producción de huevos y peso del huevo, aumento de grasa hepática, cambios en el peso de los órganos, reducción en los niveles de proteína sérica, hematomas en la carcasa, pigmentación deficiente, daño hepático en las actividades de varias enzimas involucradas en la digestión de almidón, proteína, lípidos y ácidos nucleicos, e inmunosupresión (Oğuz y Kurtoglu, 2000; Oliveira y col., 2007; Devegowda y Murthy, 2005; Yarru y col., 2009).

Aunque se han desarrollado numerosas estrategias para prevenir el crecimiento de hongos toxicogénicos y eliminar la contaminación por micotoxinas, pocas estrategias cumplen los requisitos debido a su alto costo, riesgo de bioseguridad o capacidad de unión limitada. Es necesario desarrollar métodos apropiados de detoxificación biológica para garantizar la inocuidad de los alimentos para el consumo humano y animal (de Souza Sant'Ana y col., 2008; Pfliegler y col., 2015).

Las técnicas para eliminar, inactivar o reducir la biodisponibilidad de las micotoxinas incluyen métodos físicos, químicos y biológicos (Belajová y col., 2007; Ringot y col.,

2007). Las limitaciones como la pérdida nutricional del producto y de las cualidades sensoriales, así como los altos costos en equipamiento necesario para estas técnicas han alentado la reciente importancia en los métodos biológicos (Teniola y col., 2005).

Una de las estrategias para reducir la bioaccesibilidad de las micotoxinas durante la digestión gastrointestinal es el empleo de microorganismos probióticos que adsorben micotoxinas. Este es un fenómeno físico asociado con la estructura de la pared celular bacteriana que al unirse a las micotoxinas en el tracto gastrointestinal (TGI), reducen así su absorción y toxicidad sistémica (Yiannikouris y col., 2003; Saladino y col., 2018). Se ha sugerido que los peptidoglicanos y los polisacáridos son los dos elementos más importantes responsables de la unión (Kabak y col., 2006).

El uso de probióticos en animales de producción está destinado a mejorar la conversión alimenticia, a promover el crecimiento e inhibir el desarrollo de bacterias patógenas (Rosmini y col., 2004; Blajman y col., 2015; Caly y col., 2015).

En la nutrición de pollos de engorde, las especies probióticas han demostrado variados efectos benéficos, como aumento del rendimiento (Pelicano y col., 2003; Ashayerizadeh y col., 2009; Afsharmanesh y Sadaghi, 2014; Mookiah y col., 2014; Zhang y Kim, 2014; Lei y col., 2015), modulación de la microflora intestinal, inhibición de patógenos, cambios histológicos intestinales, inmunomodulación, ciertos parámetros hematobioquímicos, mejorando características sensoriales de la carne de pollo preparada y promoviendo la calidad microbiológica de la carne de los pollos (Islam y col., 2004; Haghighi y col., 2006; Khaksefidi y Ghoorchi, 2006; Chichlowski y col., 2007; Kabir, 2009; Javadi y col., 2012).

La modulación del sistema inmunológico por los probióticos es un beneficio potencial importante que debe tenerse en cuenta en los sistemas de producción. Las células epiteliales en la mucosa gastrointestinal son la primera línea de defensa contra los microorganismos en el TGI (Baumgart y Dignass, 2002; Peterson y Artis, 2014). Tiene una función de defensa combinada, que incorpora estructuras anatómicas, secreciones inmunológicas que consisten en moco, inmunoglobulinas, péptidos antimicrobianos y el complejo de adhesión de la unión epitelial (Baumgart y Dignass, 2002; Ohland y MacNaughton, 2010). Los probióticos modulan estos componentes del sistema inmunitario a nivel del TGI, protegiendo al huésped de los diferentes tipos de antígenos patógenos. Tanto la inmunidad innata como la adaptativa se ven afectadas por los probióticos.

Para la incorporación de microorganismos probióticos en los productos para alimentación se debe evaluar cuidadosamente su eficacia y seguridad (Salminen y col., 1998).

La seguridad de los probióticos utilizados en la alimentación animal se discute en términos generales y no es específica. Las reglamentaciones de los gobiernos difieren entre países, pero en la actualidad no se ha establecido a nivel internacional la situación de los probióticos como componente de los alimentos. En su mayor parte, los probióticos se presentan en forma de alimentos y suplementos dietéticos, porque en su mayoría se administran oralmente como alimentos. En el caso de los alimentos, los aditivos alimentarios y los suplementos dietéticos sólo pueden hacerse declaraciones de propiedades saludables de carácter general (FAO 2016).

En general, para la evaluación de los posibles riesgos asociados a la incorporación de microorganismos en la alimentación animal éstos deben ser identificados a nivel de cepa. La cepa particular del microorganismo no debe haberse asociado con ninguna infección en humanos o animales; tampoco contener genes de resistencia a antibióticos transferibles y se recomienda evaluar la capacidad de producción de toxinas o de causar hiperestimulación del sistema inmunitario en el huésped. Según Shanahan (2012) la evaluación de la seguridad y la información sobre una cepa probiótica en particular no se pueden generalizar a probióticos similares (incluso con una cepa diferente de la misma especie), ya que cada probiótico requiere una evaluación de la seguridad y el riesgo particular. Los efectos adversos y la gravedad de los efectos de un probiótico podrían ser específicos del contexto y depender de la susceptibilidad (inmunidad) y del estado fisiológico del huésped (animal o humano). Por lo tanto, las cepas probióticas consideradas seguras en ciertas condiciones pueden no ser seguras en otras condiciones.

*Saccharomyces cerevisiae* RC016 y *Lactobacillus rhamnosus* RC007 son microorganismos con propiedades probióticas que han demostrado ser candidatos prometedores para ser incluidos en la formulación de aditivos para mejorar la sanidad y el rendimiento de la producción animal.

## HIPÓTESIS

“La aplicación de levaduras y/o bacterias lácticas como aditivos alimentarios biológicos (autóctonos, inocuos e innovadores), no ejercen efectos cito ni genotóxicos demostrando su seguridad biológica y complementan la acción probiótica y antimicotoxinas en un mismo producto, *in vivo*.”

## OBJETIVOS

1. Demostrar la seguridad biológica de *S. cerevisiae* RC016 y *L. rhamnosus* RC007 a través de ensayos de cito y genotoxicidad.
2. Evaluar la influencia de la mezcla de *S. cerevisiae* RC016 y *L. rhamnosus* RC007 sobre el sistema inmunológico en ratones BALB/c.
3. Demostrar mediante ensayos *in vivo* en pollos parrilleros, las propiedades probióticas y antimicotoxina del aditivo alimentario biológico en una formulación simple y una mixta.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los microorganismos utilizados en este trabajo, *S. cerevisiae* RC016 y *L. rhamnosus* RC007, han demostrado ser candidatos prometedores para ser incluidos en la formulación de aditivos para mejorar la sanidad y el rendimiento de la producción animal. Para complementar estos resultados y obtener datos sobre la seguridad biológica de su uso como probióticos antimicotoxinas, se evaluó la cito y genotoxicidad de los mismos y su efecto frente a parámetros inmunológicos. Además se evaluó sus propiedades funcionales (ya probadas *in vitro*) utilizando pollos parrilleros como modelo animal de producción.

### **a) Estudios de seguridad biológica (cito y genotoxicidad) de *S. cerevisiae* RC016 y *L. rhamnosus* RC007.**

#### **Ensayo de citotoxicidad *in vitro* en cultivos celulares.**

La aprobación de cepas probióticas para su uso en nutrición animal requiere la demostración de la ausencia de citotoxicidad, por ejemplo mediante la evaluación en modelos celulares, como células Vero (Singh y col., 2018; Gaviria Rivera y col., 2000; Fagerlund y col., 2010).

Este ensayo *in vitro* en células Vero proporciona una estimación cuantitativa del número de células viables cuando se encuentra frente a un agente potencialmente tóxico (Borenfreund y Puerner, 1985; Kim y col., 2009). Se basa en la capacidad del colorante rojo neutro (colorante soluble y vital) para cruzar la membrana plasmática e incorporarse en lisosomas de células viables (Borenfreund y col., 1988; Triglia y col., 1991). En condiciones normales, el lisosoma presenta un pH más bajo que el del citoplasma; el colorante atrapado por el lisosoma se carga y es incapaz de abandonar el interior del orgánulo. Los lisosomas dañados disminuyen la cantidad de colorante retenido por el cultivo, por lo tanto, la integridad lisosomal es un indicador altamente sensible de la viabilidad celular (Repetto y col., 2008). Desde su introducción, este ensayo ha demostrado ser técnicamente rápido, simple, barato, sensible y reproducible y es ampliamente utilizado para demostrar toxicidad (Zhang y col., 1990; Figueiró y col., 2016).

En las Tablas 19 y 20 se muestran los porcentajes de viabilidad del cultivo celular luego de 24 h de exposición a los microorganismos y sus sobrenadantes de cultivo.

Los productos que afirman efectos probióticos deben contener un número suficiente de células viables, entre  $10^6$  -  $10^{10}$  UFC/g, para conferir eficacia (Champagne y col., 2011; Simón y col., 2005). Los ensayos realizados en los capítulos previos utilizaron concentraciones celulares de  $10^7$  -  $10^8$  UFC/mL, por lo tanto para demostrar la seguridad de los mismos en este ensayo se probaron tres diluciones de los microorganismos entre  $10^7$  y  $10^5$  UFC/mL y las mismas diluciones se realizaron con los sobrenadantes.

La exposición del cultivo celular a las tres diluciones probadas de la levadura mostró que la viabilidad celular no se vio afectada, los porcentajes de viabilidad fueron similares a los del tratamiento de control celular y no hubo diferencias significativas ( $p < 0,0001$ ) (Tabla 19). En cambio, con la BAL, los porcentajes de viabilidad fueron significativamente menores ( $p < 0,0001$ ). La mezcla de los microorganismos (levadura: BAL, 1:1) mejoró esos porcentajes llegando al 91%. Inclusive los porcentajes de viabilidad fueron mayores con menores concentraciones de la mezcla de levadura-BAL.

La disminución que ocurre cuando sólo está presente la BAL podría deberse a la propia producción de ácido láctico que disminuye el pH, lo que se corroboró al ensayar distintas diluciones de los sobrenadantes (Tabla 20), ya que la monocapa celular observada al microscopio no presentaba desprendimiento y su morfología permanecía normal, comparada con los controles celulares. Al igual que el ensayo con los microorganismos la viabilidad fue significativamente mejor al ensayar las concentraciones  $10^5$  y  $10^6$  cél/mL ( $p < 0,0001$ ).

Si bien en la literatura la metodología de determinación de citotoxicidad es muy variada, en general se utiliza como un método de selección de cepas probióticas. Chimchang y col. (2016) seleccionaron BAL con propiedades probióticas y anticancerígenas, evaluando la capacidad citotóxica de  $1 \times 10^8$  cél/mL frente a células Vero y encontraron que algunas cepas presentan mayor citotoxicidad en los factores solubles producidos en el sobrenadante y no en el sedimento bacteriano en sí, esto concuerda con nuestros resultados. Otros autores, también utilizaron el ensayo de citotoxicidad para seleccionar cepas probióticas con propiedades anticáncer, evaluando el índice de citotoxicidad medio (define el límite superior de la concentración del extracto que no es tóxico para la línea celular) a partir de distintas concentraciones de los extractos celulares libres de sobrenadante (Awaisheh y col., 2016).

**Tabla 19.** Porcentaje de viabilidad de células Vero enfrentadas a diferentes concentraciones de *S. cerevisiae* RC016, *L. rhamnosus* RC007 y en mezcla.

<b>Muestra (microorganismo cél/mL)</b>	<b>% Viabilidad ± D.E.</b>
<i>S. cerevisiae</i> RC016 (2,08x10 <sup>7</sup> )	63,24 ± 0,11 b
<i>S. cerevisiae</i> RC016 (2,08x10 <sup>6</sup> )	90,54 ± 0,12 a
<i>S. cerevisiae</i> RC016 (2,08x10 <sup>5</sup> )	92,38 ± 0,06 a
<i>L. rhamnosus</i> RC007 (8,33x10 <sup>7</sup> )	3,70 ± 0,01 e
<i>L. rhamnosus</i> RC007 (8,33x10 <sup>6</sup> )	17,47 ± 0,07 d
<i>L. rhamnosus</i> RC007 (8,33x10 <sup>5</sup> )	34,88 ± 0,04 c
<i>S. cerevisiae</i> RC016 (2,08x10 <sup>7</sup> ) + <i>L. rhamnosus</i> RC007 (8,33x10 <sup>7</sup> )	42,98 ± 0,06 c
<i>S. cerevisiae</i> RC016 (2,08x10 <sup>6</sup> ) + <i>L. rhamnosus</i> RC007 (8,33x10 <sup>6</sup> )	91,21 ± 0,04 a
<i>S. cerevisiae</i> RC016 (2,08x10 <sup>5</sup> ) + <i>L. rhamnosus</i> RC007 (8,33x10 <sup>5</sup> )	89,33 ± 0,12 a

\*Las letras diferentes en las columnas indican diferencias significativas, de acuerdo con el test LSD de Fisher (p<0.0001).

D.E: desvío estándar.

**Tabla 20.** Porcentaje de viabilidad de células Vero enfrentadas a diferentes concentraciones de sobrenadante de *S. cerevisiae* RC016, *L. rhamnosus* RC007 y en mezcla.

<b>Sobrenadante</b>	<b>% Viabilidad ± D.E.</b>
<i>S. cerevisiae</i> RC016 ( $2,08 \times 10^7$ )	95,82 ± 0,05 a
<i>S. cerevisiae</i> RC016 ( $2,08 \times 10^6$ )	93,74 ± 0,10 a
<i>S. cerevisiae</i> RC016 ( $2,08 \times 10^5$ )	92,85 ± 0,07 a
<i>L. rhamnosus</i> RC007 ( $8,33 \times 10^7$ )	4,05 ± 0,00 b
<i>L. rhamnosus</i> RC007 ( $8,33 \times 10^6$ )	93,45 ± 0,19 a
<i>L. rhamnosus</i> RC007 ( $8,33 \times 10^5$ )	94,02 ± 0,14 a
<i>S. cerevisiae</i> RC016 ( $2,08 \times 10^7$ ) + <i>L. rhamnosus</i> RC007 ( $8,33 \times 10^7$ )	1,18 ± 0,00 b
<i>S. cerevisiae</i> RC016 ( $2,08 \times 10^6$ ) + <i>L. rhamnosus</i> RC007 ( $8,33 \times 10^6$ )	85,61 ± 0,09 a
<i>S. cerevisiae</i> RC016 ( $2,08 \times 10^5$ ) + <i>L. rhamnosus</i> RC007 ( $8,33 \times 10^5$ )	86,67 ± 0,20 a

\*Las letras diferentes en las columnas indican diferencias significativas, de acuerdo con el test LSD de Fisher ( $p < 0.0001$ ).

D.E: desvío estándar.

**Ensayo de genotoxicidad a partir de médula ósea de pollos parrilleros.**

El ensayo de micronúcleos es un método exitoso en la evaluación del daño cromosómico, la genotoxicidad y la citotoxicidad (Escobar y col., 2015). La exposición de las células a sustancias genotóxicas daña los fragmentos cromosómicos y conduce a la formación de micronúcleos (MN). El recuento de MN a partir de médula ósea proporciona una evaluación indirecta del daño potencial de genotoxicidad a nivel cromosómico (Hao y col., 2017; Luzhna y col., 2013; Lin y col., 2018).

El ensayo de micronúcleos de médula ósea se aplicó para garantizar la seguridad de los aspectos de genotoxicidad de las cepas probióticas para uso animal. Para ello, se evaluó la genotoxicidad del formulado mixto administrado a pollos parrilleros tanto para la mezcla (1:1) del polvo liofilizado de ambas cepas (*S. cerevisiae* RC016,  $10^7$  UFC/g y *L. rhamnosus* RC007,  $10^8$  UFC/g al 0,1% (1g/kg, p/p) en el alimento balanceado. Se contaron mil eritrocitos por animal/tratamiento/réplica para determinar el porcentaje de eritrocitos normocromáticos micronucleados (%ENCMN) sobre el total de eritrocitos. Además, se estudió la capacidad de estos microorganismos probióticos para reducir la genotoxicidad causada por aflatoxina B<sub>1</sub>.

Los resultados obtenidos permitieron determinar que la administración del formulado mixto (T3) no presentó diferencias significativas en el % ENCMN en comparación con los animales del tratamiento control (T1), demostrando la ausencia genotoxicidad (Tabla 21).

Como era de esperar, la administración de las cepas probiótica en estudio no causó genotoxicidad, obteniendo tasas normales de ENCMN en animales alimentados con la mezcla de levadura y BAL.

En esta tesis, la ausencia de citotoxicidad y genotoxicidad asociada con *S. cerevisiae* RC016 y *L. rhamnosus* RC007 es consistente con lo esperado para organismos probióticos, así como la ausencia de enfermedad, mortalidad y otros cambios en la salud relacionados con la ingesta de estas cepas. Estos resultados se correlacionan con los contenidos de González Pereyra y col. (2014) quienes observaron la ausencia de genotoxicidad en ratas Wistar alimentadas con *S. cerevisiae* RC016.

**Tabla 21.** Porcentaje de eritrocitos normocromáticos micronucleados (%ENCMN) en pollos parrilleros alimentados con diferentes tratamientos experimentales.

Tratamientos	%MNNCE $\pm$ D.E.
<b>T1</b>	0,77 $\pm$ 0,49 ab
<b>T2</b>	1,27 $\pm$ 0,52 a
<b>T3</b>	0,42 $\pm$ 0,15 b
<b>T4</b>	0,63 $\pm$ 0,23 ab
<b>T5</b>	0,92 $\pm$ 0,43 ab

\*T1: control; T2: toxina; T3: formulado mixto; T4: toxina + formulado mixto y T5: comercial.

Las letras diferentes indican diferencias significativas, de acuerdo con el test LSD de Fisher ( $p < 0.0001$ ).

D.E: desvío estándar.

Otros autores han demostrado la ausencia de genotoxicidad de diferentes lactobacilos en ratas (Lin y col., 2018; Tseng y col., 2015). También estudios genotóxicos en animales experimentales han probado diferentes mezclas probióticas, demostrando la ausencia de genotoxicidad (Chiu y col., 2013).

En conclusión, la notable ausencia de citotoxicidad y genotoxicidad asociada con la exposición a *S. cerevisiae* RC016 y la capacidad de esta cepa para actuar como probiótico y como secuestrante de AF es lo que la convierte en un candidato interesante para la formulación de un nuevo aditivo para mejorar el rendimiento de los animales. El uso de aditivos basados en microorganismos benéficos en lugar de productos químicos es una opción más segura y ecológica para aumentar la productividad animal con un impacto ambiental mínimo.

**b) Diseño de estudio *in vivo* en pollos aplicando un aditivo simple**

Los probióticos son microorganismos vivos que producen beneficios para la salud del huésped cuando se aplican en cantidades suficientes (FAO / OMS 2001; Alagawany y col., 2018). Éstos podrían utilizarse como aditivos para la alimentación animal. Muchos estudios están enfocados en la búsqueda de cepas de levadura con propiedades probióticas (Czerucka y col., 2007; Díaz-Vergara y col., 2017; Pizzolitto y col., 2012). Además, las levaduras tienen un gran potencial para ser utilizadas como una herramienta para resolver el problema de las micotoxinas en la alimentación animal, especialmente los alimentos a base de cereales.

En este trabajo se propuso realizar un ensayo *in vivo* en una especie animal de producción, para evaluar la exposición de niveles de AFB<sub>1</sub> similar a una contaminación natural (50 ug/kg de AFB<sub>1</sub>) en la dieta de pollos parrilleros alimentados con un formulado simple a base de *S. cerevisiae* RC016 liofilizada y determinar su potencialidad para reducir la micotoxicosis causada por AFB<sub>1</sub> al estudiar su influencia en la productividad animal.

Las aflatoxinas son una preocupación importante en la producción de aves de corral. Su toxicidad en los pollos de engorde ha sido ampliamente investigada por sus efectos carcinogénicos, mutagénicos, teratogénicos, y el impacto en el rendimiento del crecimiento. Los efectos bioquímicos, hematológicos, inmunológicos y patológicos de AFB<sub>1</sub> también han sido descritos (Oğuz y col., 2000; Sur y Celik, 2003). Las aflatoxinas también pueden causar importantes cambios microscópicos en diferentes órganos, como el hígado, donde se puede observar hepatomegalia, palidez, degeneración hidrópica y grasa, hiperplasia del conducto biliar y fibrosis periportal (Ortatatli y Oğuz, 2001, Magnoli y col., 2017); también lesiones en riñón y bazo (Raju y Devegowda, 2000); deterioro de la respuesta inmune humoral y celular; y el aumento de la susceptibilidad a algunos agentes ambientales e infecciosos (Oğuz y col., 2003).

Una de las estrategias de prevención más eficaces contra las micotoxicosis en animales es la suplementación de la dieta con levaduras que reducen la biodisponibilidad de las micotoxinas en el TGI y, por lo tanto, sus efectos adversos en la salud (Shetty y Jespersen, 2006).

Los dos principales polisacáridos presentes en las paredes de *S. cerevisiae* son  $\beta$ -D-glucanos y  $\alpha$ -D-mananos. Ellos constituyen hasta el 90% del peso seco de la pared

celular y tienen notables propiedades para interactuar con el sistema inmune del huésped y además constituyen una buena fuente de adsorbente de AFB<sub>1</sub> y ZEA (Shetty y Jespersen, 2006; Kogan y Kocher, 2007).

**Parámetros productivos: ganancia de peso, índice de conversión y peso de la carcasa.**

Se conoce que los alimentos contaminados con micotoxinas conducen a síndromes de toxicidad clínica que incluyen la morbilidad y la mortalidad de las aves de corral, la baja eficiencia de producción y los altos costos de la atención veterinaria (Hussein y Brasel 2001; Bouhet y Oswald, 2007).

Las aves de corral son sensibles a la acción tóxica y carcinogénica de AFB<sub>1</sub>, lo que genera grandes pérdidas económicas para los productores debido a la reducción de la tasa de crecimiento, mayor susceptibilidad a la enfermedad, reducción de la producción y otros efectos adversos (Rawal y col., 2010).

La Tabla 22 muestra la ganancia de peso total de los pollos en los diferentes tratamientos con levadura y AFB<sub>1</sub>. Se pudo observar que recién a los 21 días del ensayo se registraron diferencias significativas entre los diferentes tratamientos ensayados ( $p < 0,0001$ ).

Los animales del tratamiento control (T1) y aquellos tratados con la levadura sola (T2) obtuvieron una mayor ganancia total de peso que aquellos animales alimentados con AFB<sub>1</sub> (T3), mientras que aquellos alimentados con el desafío (AFB<sub>1</sub> + levadura, T4) lograron ganancias de peso semejantes a los animales de los tratamientos control y levadura.

En la Tabla 23 se muestran los resultados obtenidos para el índice de conversión a partir de los datos de consumo. La conversión alimenticia no se vio afectada por los tratamientos dietéticos. Los niveles de contaminación con AFB<sub>1</sub> utilizados en este ensayo fueron similares a una contaminación natural (50 ug/kg de AFB<sub>1</sub>), por lo que no hubo diferencias con respecto a los tratamientos control (T1) y levadura (T2).

**Tabla 22.** Ganancia de peso total de los pollos en los diferentes tratamientos con levadura y AFB<sub>1</sub>.

Tratamientos	Ganancia de peso diaria (kg)			
	Días (Media ± D.E.)			
	0	7	14	21
<b>T1</b>	0,046 ± 0,003 e	0,267 ± 0,029 d	0,610 ± 0,043 c	1,312 ± 0,030 a
<b>T2</b>	0,054 ± 0,001 e	0,272 ± 0,015 d	0,598 ± 0,022 c	1,288 ± 0,071 a
<b>T3</b>	0,055 ± 0,010 e	0,251 ± 0,021 d	0,517 ± 0,066 c	1,048 ± 0,039 b
<b>T4</b>	0,051 ± 0,015 e	0,263 ± 0,054 d	0,547 ± 0,055 c	1,188 ± 0,147 a

\* T1: control; T2: formulado simple (*Saccharomyces cerevisiae RC016*); T3: toxina; T4: formulado simple + toxina. Las letras diferentes indican diferencias significativas, de acuerdo con el test LSD de Fisher ( $p < 0.0001$ ). D.E: desvío estándar.

**Tabla 23.** Índice de conversión de los pollos en los diferentes tratamientos con levadura y AFB<sub>1</sub>.

Tratamientos	Índice de conversión Media (kg:kg) ± D.E.
T1	1,37 ± 0,03
T2	1,41 ± 0,05
T3	1,38 ± 0,08
T4	1,33 ± 0,16

\* T1: control; T2: formulado simple (*Saccharomyces cerevisiae* RC016); T3: toxina; T4: formulado simple + toxina. Las letras diferentes indican diferencia significativa ( $p < 0,1$ ) según el test de la mínima diferencia significativa de Fisher (LSD). D.E: desvío estándar.

En la Tabla 24 se detalla el rendimiento de carcasa para cada uno de los tratamientos. El mayor rendimiento correspondió al tratamiento con levadura (893,8 g), seguido por el tratamiento de levadura + toxina (793,43 g). La presencia de AFB<sub>1</sub> redujo significativamente el rendimiento mientras que la presencia de levadura en la dieta en desafío con AFB<sub>1</sub> (T4) permitió contrarrestar el efecto de la micotoxina, logrando un rendimiento semejante al tratamiento control ( $p < 0,01$ ).

**Tabla 24.** Peso de las carcasas (g) de pollos que recibieron diferentes dietas con levadura y AFB<sub>1</sub>.

Tratamientos	Carcasa Media (g) ± D.E.
T1	904,10 ± 25,96 a
T2	893,80 ± 60,07 a
T3	690,43 ± 41,72 c
T4	793,43 ± 81,58 b

\* T1: control; T2: formulado simple (*Saccharomyces cerevisiae* RC016); T3: toxina; T4: formulado simple + toxina. Las letras diferentes indican diferencia significativa ( $p < 0,01$ ) según el test de la mínima diferencia significativa de Fisher (LSD). D.E: desvío estándar.

La alimentación es un componente importante, que afecta el rendimiento neto de las aves de corral porque el costo de la alimentación representa alrededor del 65 al 70% para la producción de pollos de engorde y es un factor importante que afecta el costo de producción (Srivastava y col., 2013).

Una de las principales preocupaciones de la industria avícola es la calidad alimentaria de los productos finales, que está estrictamente relacionada con la calidad de las materias primas utilizadas para la formulación de los alimentos. Considerando que más del 70% de los cultivos de cereales se utilizan en la producción animal, cualquier factor que afecte la calidad del alimento puede causar pérdidas significativas para los animales (Grenier y Applegate, 2013), y puede afectar la calidad de los productos destinados para el consumo humano.

La contaminación de los ingredientes del alimento por diversas micotoxinas y sus efectos en la salud y el rendimiento de los animales está bien documentada y demuestran la necesidad cada vez mayor de estrategias para mitigar los efectos adversos de las micotoxinas (Aravind y col., 2003; Yegani y col., 2006; Chen y col., 2013; Patience y col., 2014). Existen numerosos informes de que la contaminación con AFB<sub>1</sub> transmitida por los alimentos tiene un gran impacto negativo en la eficiencia de los alimentos, lo que reduce significativamente la productividad en la industria avícola (Bertoluzzi y col., 2016).

La alimentación con dietas de maíz contaminado disminuye el crecimiento y la ingesta de alimento (He y col., 2013). En nuestro trabajo se trató de simular una contaminación natural de la dieta (50 ug/kg de AFB<sub>1</sub>), lo que produjo una disminución del crecimiento a los 21 días. Esto concuerda con lo reportado por otros autores, quienes informaron que la ganancia de peso y la ingesta de alimento disminuyeron con los niveles crecientes de maíz contaminado naturalmente (0, 50 y 100% maíz contaminado) (Feng y col., 2010).

Pandey y Chauhan, (2007) demostraron que la administración de 2,5 mg/kg de AFB<sub>1</sub> en la dieta de las aves de corral redujo significativamente la ingesta de alimento entre 9 y 11% en todos los grupos de edad (7–280 días). Rauber y col. (2007) informaron reducciones significativas en el consumo de alimento debido a las distintas concentraciones ensayadas de AFB<sub>1</sub> en la dieta (100, 200, 500 y 1000 ppb). Otros autores encontraron que AFB<sub>1</sub> redujo significativamente la ganancia de peso, el consumo de alimento y la tasa de conversión alimenticia cuando se indujo aflatoxicosis experimental en pollos parrilleros alimentándolos con 1,2 mg/kg durante 3 semanas (Pizzolitto y col., 2013).

Por el contrario, Magnoli y col. (2008) probaron niveles de AFB<sub>1</sub> entre 30 y 185 µg/kg en pollos parrileros y no observaron diferencias significativas entre los tratamientos. En otro trabajo, encontraron que estos parámetros permanecen sin cambios cuando los niveles de toxinas son relativamente bajos (50 µg/kg de AFB<sub>1</sub> en la dieta), al menos durante un período de producción de pollos de engorde de 46 días (Magnoli y col., 2011).

Otro parámetro de crecimiento afectado por las micotoxinas en este trabajo es el índice de conversión, lo que concuerda con los hallazgos de Andretta y col. (2011) donde mostraron que éste índice se vio afectada por aflatoxinas, la principal micotoxina detectada en el maíz utilizado para ese estudio. También, estudios reportados por Bortoluzzi y col. (2016) informaron que la formulación de alimento con maíz contaminado afectó el índice de conversión a los 42 días de edad.

Otro parámetro productivo de gran importancia a nivel económico para el sistema de producción aviar es la obtención de un alto rendimiento de carcasa, el cual en nuestro trabajo se perjudicó por la presencia de AFB<sub>1</sub>. Magnoli y col. (2017) encontraron que los pollos alimentados con la dieta contaminada con AFB<sub>1</sub> mostraron los valores más bajos de rendimiento de carcasa en comparación con el grupo control, lo que se corresponde con lo encontrado en nuestro trabajo.

Estos efectos negativos de la contaminación por micotoxinas obligan a la industria alimenticia a adoptar diferentes estrategias para mitigar estos efectos. Algunas especies de levaduras pueden actuar como agentes de control biológico que inhiben el crecimiento de hongos productores de micotoxinas en los cultivos, así como en los alimentos y los piensos (Kabak y col., 2006; Palumbo y col., 2008). Además, las paredes celulares de varias especies de levaduras son capaces de adsorber las micotoxinas de los productos agrícolas, descontaminándolas efectivamente (Caridi y col., 2007; McCormick, 2013). Las levaduras probióticas o los productos que contienen pared celular de levadura u otros aditivos también se aplican para contrarrestar la micotoxicosis en el ganado (Pizzolitto y col., 2012).

Tanto las células viables, las células no viables y los productos de la pared celular de las levaduras probióticas con alta capacidad de adsorción son capaces de reducir la biodisponibilidad de las toxinas en los alimentos y piensos. Las especies de levadura son muy diversas en la composición de la pared celular y, como es lógico, en la capacidad de adsorción. Se ha demostrado que los componentes de la pared celular de la levadura β - D -glucanos, glucomanos y manano-oligosacáridos son los responsables de la

adsorción de las micotoxinas (Yiannikouris y col., 2006; Raju y Devegowda, 2002; Oguz y Parlat, 2005).

La inclusión de levaduras en la dieta o en los procedimientos de fermentación del alimento reduce los efectos nocivos de las micotoxinas en animales de granja al disminuir la disponibilidad y la absorción de la AF en el TGI (Śliżewska y Smulikowska, 2011). Se conoce que las cepas probióticas de *S. cerevisiae* se unen efectivamente a AFB<sub>1</sub>, sobreviven las condiciones gastrointestinales e incluso mejoran la fermentación ruminal de la alimentación (Pizzolitto y col., 2012; 2013; Bueno y col., 2007; Dogi y col., 2011).

En nuestro trabajo, la aplicación en la dieta de los pollos parrilleros de un formulado simple a base de *S. cerevisiae* RC016, permitió una ganancia de peso similar al tratamiento control. Pizzolitto y col. (2013) evaluaron la incorporación de una levadura, *S. cerevisiae* CECT 1891, en el agua de bebida y no encontraron diferencias significativas en los parámetros productivos con respecto a los pollos alimentados con la dieta control, indicando que el microorganismo era inerte y no tóxico. Otros autores, mostraron que los pollos alimentados durante 42 días con *S. cerevisiae* al 1,5% tenían mayor ganancia de peso corporal, ingesta de alimento y mejor relación de conversión de alimento (Paryad y Mahmoudi, 2008). Al igual que lo reportado por Ahmed y col. (2015) donde la incorporación de *S. cerevisiae* en la dieta al 1% aumentó significativamente la ganancia de peso a las 6 semanas. Rezaeipour y col. (2012) informaron que la levadura ensayada no tiene un efecto negativo en el rendimiento de crecimiento de los pollos de engorde.

En nuestro caso, cuando la levadura, *S. cerevisiae* RC016, se probó en desafío con AFB<sub>1</sub>, logró revertir los efectos negativos de esta micotoxina y recuperar los parámetros productivos al nivel del tratamiento control. Al igual que lo reportado por Magnoli y col. (2017) donde la adición de levadura *Pichia kudriavzevii* al 0,1% a las dietas contaminadas con 100 µg/kg de AFB<sub>1</sub> mostró efectos de mejora en los parámetros de producción evaluados. Pizzolitto y col. (2013) mostró que solo la presencia de *S. cerevisiae* CECT 1891 en el agua potable devolvió completamente los parámetros de rendimiento de crecimiento a valores normales, mostrando un efecto protector de la cepa de levadura contra la aflatoxicosis. Al igual que lo informado por otros autores que han demostrado que la adición de levaduras a la dieta contaminada con AFB<sub>1</sub> mejora la productividad de los pollos de engorde (Çelýk y col., 2003).

En cuanto al índice de conversión, si bien en nuestro trabajo no hubo diferencias entre los tratamientos ensayados, con la incorporación de la levadura se llegó a los rangos

esperados para este parámetro dentro de los 21 días ensayados. Kumar (2015) informó un rango promedio de 1,757 a 1,945 hasta 6 semanas de edad probando diferentes dietas. Pizzolitto y col. (2013) evaluaron la capacidad de la levadura *S. cerevisiae* CECT 1891 para contrarrestar los efectos nocivos de AFB<sub>1</sub> en pollos de engorde durante 3 semanas y encontraron que sólo el tratamiento de las aves que fueron alimentadas con dietas contaminadas con mayor concentración de AFB<sub>1</sub> (1,2 mg/kg) afectaron significativamente el índice de conversión en comparación con los tratamientos control y con levadura. Magnoli y col. (2017) encontraron que la suplementación de la levadura *Pichia kudriavzevii* en pollos alimentados con dietas que contenían niveles de contaminación natural de AFB<sub>1</sub> durante 21 días, el índice de conversión alimenticia no mostró diferencias significativas entre los tratamientos, al igual que lo encontrado en nuestro estudio.

En nuestro trabajo la inclusión de la levadura contrarrestó el efecto negativo de AFB<sub>1</sub>, en cuanto al rendimiento de la carcasa, pero no logró superar los valores de los tratamientos control y levadura sola. Otros autores también encontraron aumentos en el rendimiento de carcasa, en los pollos que recibieron suplementos de levadura y probióticos multi cepas (Hussein y Selim, 2018) y la inclusión de 1,5 y 2% de *S. cerevisiae* que también mejoró tanto las características como el rendimientos de la carcasa (Paryad y Mahmoudi, 2008)

Vekiru y col. (2015) evaluaron una mayor concentración de AFB<sub>1</sub> (2 mg/kg) para garantizar pérdidas de rendimiento estadísticamente significativas de las aves, lo que requirió un aumento en la concentración de los productos adsorbentes (arcillas) mayores al 0,5%.

Los pollos son la especie animal que menor susceptibilidad presenta a las aflatoxinas y en este ensayo los niveles utilizados de AFB<sub>1</sub> fueron bajos intentando simular una micotoxicosis crónica. Los parámetros productivos ensayados (principalmente la ganancia de peso y el peso de la carcasa) demostraron que el aditivo utilizado fue capaz de ejercer un efecto protector frente al desafío de la micotoxicosis, la cual fue capaz de alterar significativamente los parámetros productivos estudiados a pesar de los bajos niveles de micotoxina presentes en el alimento.

La información en la bibliografía en cuanto a la proporción de levadura utilizada como aditivo alimentario es muy variada, en nuestro trabajo la proporción 0,1% no mostró efectos negativos sobre los parámetros productivos, pero no logró superar los valores del

tratamiento control, por lo que se podrían estar probando otras concentraciones o mejorar el formulado con el agregado de algún otro microorganismo.

#### **Peso de los diferentes órganos.**

Los órganos linfoides son la base para lograr la función inmune. Estos órganos linfoides primarios y secundarios a menudo se pesan como una medida de su papel crítico en el desarrollo y la función del sistema inmunológico (Kwak y col., 1999).

Las micotoxinas pueden afectar el peso relativo de los órganos linfoides, lo que lleva a un efecto perjudicial sobre la respuesta inmune. Esta reducción en el peso de los órganos linfoides puede ser causada por necrosis o agotamiento celular (Hoerr y col., 1981).

En la Tabla 25 se muestra el peso de los diferentes órganos. No hubo diferencias significativas en los diferentes tratamientos cuando se compararon los pesos de los distintos órganos (bazo, timo y bursa de fabricius), sin embargo se observaron diferencias significativas en el peso de los hígados entre los tratamientos. Este resultado es consistente con los encontrados por Santin y col. (2006), que evaluaron posibles beneficios de agregar pared celular de levadura para prevenir los efectos de las micotoxinas en pollos de engorde. En contraste, Mendieta y col. (2017) encontraron diferencias significativas en el peso de los órganos linfoides en los tratamientos con micotoxinas (350 µg/kg AFB<sub>1</sub>, 350 µg/kg OTA y AFB<sub>1</sub> + OTA), aunque sin lograr revertir esto con el tratamiento con pared celular de *S. cerevisiae*.

Otros autores, demostraron que la suplementación con arginina, un aminoácido natural, en la dieta de pollos de engorde (0,53% a 0,73%) aumentó significativamente el peso de los órganos linfoides, demostrando su efecto protector frente a AFB<sub>1</sub> (Xu y col., 2018).

Esto pone en evidencia que las concentraciones de AFB<sub>1</sub> aquí ensayadas no fueron suficientes como para producir efectos negativos significativos en el peso de estos órganos.

**Tabla 25.** Peso de diferentes órganos (g) de pollos que recibieron diferentes dietas con levadura y AFB<sub>1</sub>.

Tratamientos	Hígados (g)	Bazo (g)	Timo (g)	Bolsa de Fabricio (g)
	Media ± DE			
<b>T1</b>	30,13 ± 1,15 a	0,93 ± 0,25	6,87 ± 1,40	3,30 ± 0,40
<b>T2</b>	26,90 ± 1,18 b	1,07 ± 0,29	7,03 ± 2,05	4,37 ± 0,38
<b>T3</b>	25,27 ± 2,83 c	1,20 ± 0,43	5,63 ± 0,40	3,73 ± 0,50
<b>T4</b>	28,47 ± 2,19 ab	1,03 ± 0,47	7,10 ± 2,82	4,20 ± 0,85

\* T1: control; T2: formulado simple (*Saccharomyces cerevisiae* RC016); T3: toxina; T4: formulado simple + toxina. Las letras diferentes indican diferencias significativas, de acuerdo con el test LSD de Fisher ( $p < 0.0001$ ). D.E: desvío estándar.

Es importante destacar que los parámetros productivos determinados en este ensayo se vieron afectados significativamente por la presencia de la AFB<sub>1</sub>, mientras que la adición de levadura permitió contrarrestar este efecto negativo, logrando mejorar significativamente los parámetros productivos. Sin embargo, cuando se evalúa el tratamiento con levadura, no se observan diferencias significativas con respecto al control, por lo que sólo tuvo efecto adsorbente y no probiótico.

**c) Estudios de la influencia de la mezcla de *Saccharomyces cerevisiae* RC016 y *Lactobacillus rhamnosus* RC007 sobre el sistema inmunológico en ratones BALB/c.**

El uso de microorganismos probióticos para mejorar la salud humana y animal se ha investigado desde hace muchos años. Los estudios *in vitro* e *in vivo* con modelos experimentales mostraron que la modulación de la respuesta inmune del huésped es una de las propiedades más importantes atribuidas a los probióticos (Galdeano y col., 2007). Teniendo en cuenta estas consideraciones y la importancia de mantener la salud animal sin el uso de antibióticos; se evaluó el efecto de un formulado líquido mixto compuesto por *S. cerevisiae* RC016 y *L. rhamnosus* RC007 mediante el análisis de citoquinas en los fluidos intestinales de ratones BALB/c. Las citoquinas analizadas fueron IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-10 (Tabla 26). Los resultados obtenidos demostraron que no se obtuvieron diferencias significativas entre los diferentes tratamientos estudiados. Lo mismo ocurrió con la relación entre las citoquinas anti y proinflamatorias en fluido intestinal (IL-10/TNF- $\alpha$ ).

**Tabla 26.** Efecto de un formulado líquido mixto de *S. cerevisiae* RC016 y *L. rhamnosus* RC007 en la producción de citoquinas en fluido intestinal de ratones BALB/c.

Citoquinas	Control	<i>S. cerevisiae</i> RC016 + <i>L. rhamnosus</i> RC007
	Media $\pm$ D.E.	
IL-6	3,10 $\pm$ 2,17 a	3,26 $\pm$ 0,84 a
TNF- $\alpha$	8,25 $\pm$ 3,68 a	10,44 $\pm$ 3,04 a
IL-10	10,84 $\pm$ 3,64 a	13,31 $\pm$ 5,51 a
IL-10/TNF- $\alpha$	1,51 $\pm$ 0,64 a	1,26 $\pm$ 0,25 a

\* Las letras diferentes indican diferencias significativas, de acuerdo con el test LSD de Fisher ( $p < 0.0001$ ). D.E: desvío estándar.

En el presente estudio los animales no estuvieron expuestos a estímulos nocivos, como microorganismos patógenos o agentes causantes de inflamación (químicos o biológicos) que permitieran evidenciar la modulación del sistema inmune; la dosis diaria administrada del formulado mixto por sí solo, no produjo estimulación inmunológica. Dogi y col. (2016)

en estudios previos trabajando con la misma BAL utilizada en este trabajo de tesis (*L. rhamnosus* RC007) en una formulación simple evaluó sus propiedades benéficas también en un modelo murino de inflamación intestinal inducida por ácido sulfónico trinitrobenceno (TNBS). En este trabajo, los animales que recibieron *L. rhamnosus* RC007 mantuvieron su sistema inmune modulado disminuyendo la severidad de la inflamación lo cual se demostró a través del aumento significativo de las concentraciones de MCP-1; IL-10 and TNF, y el ratio entre las citoquinas pro y antiinflamatorias IL-10/TNF $\alpha$  en el fluido intestinal. En otro trabajo realizado por García y col. (2017) se evaluó el efecto protector de *L. rhamnosus* RC007 en explantos de yeyuno utilizando como agente inductor de inflamación a una micotoxina que tiene su principal acción a nivel intestinal, el deoxinivalenol (DON). En este estudio se midió la expresión de varios genes proinflamatorios a través de qPCR y demostraron que *L. rhamnosus* fue capaz de contrarrestar los efectos tóxicos intestinales generados por el DON, ayudando a mantener un tracto gastrointestinal saludable.

Del mismo modo que con la BAL, García y col. (2018) demostraron la capacidad de la misma levadura utilizada en este trabajo de tesis, *S. cerevisiae* RC016, para contrarrestar la inflamación intestinal en un modelo *ex vivo*, luego de la primera semana post-destete. La estimulación inmune fue ensayada a nivel intestinal midiendo los niveles de la IgA además del perfil de citoquinas luminales y evaluando la actividad de los macrófagos peritoneales. La administración oral de *S. cerevisiae* RC016 no indujo la translocación microbiana al hígado. Los ratones que recibieron levadura aumentaron la IgA y el número de células caliciformes en sus intestinos, la actividad fagocítica de los macrófagos peritoneales y disminuyeron los niveles de TNF- $\alpha$  en el intestino delgado con aumentos de la proporción de IL-10 / TNF- $\alpha$ . La administración de *S. cerevisiae* RC016 provocó la disminución de una unidad logarítmica para los recuentos de *Enterobacteriaceae* en comparación con el control.

El efecto benéfico de los probióticos también se asocia con la regulación negativa de la respuesta inflamatoria excesiva; por lo tanto, es importante señalar que la administración de *S. cerevisiae* RC016 + *L. rhamnosus* RC007 a ratones sanos no indujo aumentos de las citoquinas proinflamatorias. La sobreproducción de algunas citoquinas puede causar una respuesta inflamatoria patológica y también es deseable que la administración de probióticos pueda modular la producción de esas citoquinas solo en condiciones patológicas y no en condiciones normales (FAO, 2016).

La administración de un formulado mixto en ratones sanos amplía el conocimiento acerca de los efectos benéficos de utilizar estos microorganismos probióticos en mezcla para el desarrollo de un aditivo alimentario para producción animal.

En la selección de un microorganismo probiótico es necesario evaluar la seguridad de cada cepa. En el presente trabajo se demostró que la administración de *S. cerevisiae* RC016 + *L. rhamnosus* RC007 a ratones sanos no indujo efectos secundarios negativos.

Este resultado no descarta que el uso del aditivo mixto afecte significativa y positivamente el peso corporal de animales luego de períodos más extensos de administración.

Para esto, finalmente se realizó un estudio *in vivo* en pollos parrilleros para demostrar la seguridad y la aplicación de la mezcla de estudio.

**d) Diseño de estudio *in vivo* en pollos aplicando un aditivo mixto**

Debido a la presencia de micotoxinas en los alimentos, hay un aumento en la demanda de procedimientos prácticos de descontaminación. En 2009, se agregó un nuevo grupo funcional en la categoría de aditivos tecnológicos para piensos. Este grupo está definido por el Reglamento de la Comisión (CE) N° 386/2009 como «sustancias para reducir la contaminación de los piensos por micotoxinas: sustancias que pueden suprimir o reducir la absorción, promover la excreción de micotoxinas o modificar su modo de acción» (EC, 2009). Estas sustancias se conocen como agentes desintoxicantes.

Los aditivos se agregan a la dieta de los animales (principalmente de cerdos, aves de corral y ganado) con el fin de reducir la absorción de micotoxinas del TGI y su distribución a la sangre y los órganos diana. Dependiendo de su modo de acción, actúan ya sea uniéndose a micotoxinas a su superficie (adsorción), degradándolas o transformándolas en metabolitos menos tóxicos (biotransformación), (Kolossova y Stroka, 2011).

Las aves de corral son extremadamente sensibles a los efectos tóxicos de AFB<sub>1</sub> (Rawal y col., 2010). Dado que la contaminación de AFB<sub>1</sub> en la alimentación es prácticamente inevitable (Coulombe y col., 2005), las estrategias dirigidas a reducir la toxicidad de AFB<sub>1</sub> en aves de corral y en otros animales han sido objeto de numerosos estudios (Pizzolitto y col., 2013; Chen y col., 2013; Magnoli y col., 2008; Hussein y Selim, 2018). Se han evaluado varios productos en aves de corral para reducir los síntomas de la aflatoxicosis y debido a su sensibilidad, son utilizadas como modelos para el descubrimiento de nuevas estrategias para prevenir la absorción de AFB<sub>1</sub> a nivel del TGI.

*Saccharomyces cerevisiae* RC016 y *Lactobacillus rhamnosus* RC007 son cepas que demostraron ser escalables industrialmente y que complementan la acción probiótica y antimicotoxina, además de ser seguros para su uso como suplemento en alimentos para animales, que pueden ejercer efectos beneficiosos para mejorar la sanidad y la productividad animal (Fochesato y col., 2018; 2019).

La aplicación final de este formulado mixto en una especie animal de producción se logró llevar a cabo en un ensayo *in vivo* con pollos parrilleros, los cuales fueron alimentados con dietas experimentales, para evaluar su inocuidad para las aves y la potencialidad probiótica y antimicotoxina de esta mezcla de microorganismos en desafío con AFB<sub>1</sub>.

Los 5 tratamientos propuestos incluyeron dietas control (T1), dietas con el formulado mixto (T3), dietas contaminadas experimentalmente con AFB<sub>1</sub> (T2) y en mezcla con el formulado mixto (T4) y una dieta comercial que posee aditivos adsorbentes y antibióticos promotores del crecimiento (T5).

Entre los factores que pueden influir en la respuesta a las micotoxinas, uno de los más importantes es el sexo. Tradicionalmente, los machos se utilizan preferentemente en la investigación, ya que son más sensibles a las micotoxinas y su respuesta no depende de los niveles hormonales, por lo tanto, es menos variable. Sin embargo, las diferencias intrínsecas y hormonales entre los sexos hacen que los resultados obtenidos en los machos a menudo no sean directamente transferibles a las hembras. Esto se debe principalmente a las diferencias en los niveles hormonales y las diferencias en farmacocinética y farmacodinámica, aunque también parecen estar involucrados otros factores, como la influencia de las hormonas en la expresión de las enzimas desintoxicantes hepáticas o las diferencias intrínsecas en la composición y estructura celular (Mennecozi y col., 2015; Waxman y Holloway, 2009; Shah y col., 2013).

**Parámetros productivos: ganancia de peso, índice de conversión y rendimiento de carcasa.**

La determinación de los parámetros productivos constituyen los indicadores técnicos para medir la eficiencia de crecimiento de los pollos.

En este experimento se monitorearon diariamente los signos de mortalidad y el estado de salud de los animales. Se registraron semanalmente los parámetros productivos como peso, consumo e índice de conversión alimenticia, en cada grupo de tratamiento.

A nivel de los parámetros productivos, los datos de los machos y de las hembras fueron procesados por separado, obteniendo mayor ganancia de peso las hembras en comparación con los machos, además el consumo de alimento ( $p < 0,05$ ) y el índice de conversión en las hembras no mostraron diferencias significativas entre los distintos tratamientos ensayados (datos no mostrados). Trabajos realizados por Novel y col., (2009) donde determinaron el efecto de diferentes regímenes de restricción de alimentación durante la etapa inicial (14-21 días) sobre la productividad y las características de la carcasa de pollos machos y hembras, encontraron que los pollos machos obtuvieron mayores pesos que las hembras a los 42 días de edad, que podrían explicarse en términos de mayor ingesta, tasa de crecimiento y mejor relación de conversión alimenticia. Además, los pollos machos tenían intestinos más largos. Contrario a lo que obtuvimos en nuestro trabajo debido probablemente a que los machos son más sensibles que las hembras a  $AFB_1$ , predisponiéndolos metabólicamente en desventaja. Esto concuerda con Pandey y Chauhan (2007) quienes realizaron un experimento sólo en pollos hembras para evaluar el efecto de  $AFB_1$  en el aumento de peso, ingesta de alimento, relación de ganancia de alimento, edad en la madurez sexual, producción y calidad de huevos, retención de nutrientes, estudios patoanatómicos y parámetros histopatológicos y también residuos de  $AFB_1$  en huevos y músculos, encontrando que estos parámetros fueron significativamente menores en todos los grupos alimentados con  $AFB_1$  en comparación con el control, pero no hubo diferencias significativas entre los tratamientos con toxina trabajando con hembras. Por esta razón, los datos mostrados a continuación corresponden solo a pollos machos.

La ganancia de peso total para cada uno de los tratamientos ensayados se muestra en la Tabla 27.

Al comienzo del experimento se pesaron todos los pollos y fueron distribuidos en lotes de promedio y varianza homogénea ( $\pm 10\%$ ), con un peso inicial promedio de  $0,084 \pm 0,02$  kg. Para identificar cada animal al momento del pesaje se tiñeron las patas con colores diferenciales utilizando colorantes de grado alimenticio.

La ganancia de peso en los pollos alimentados con el tratamiento comercial (T5) o con el formulado mixto (T3) fue significativamente mayor que los pollos que recibieron la dieta control (T1). Los pollos que recibieron sólo AFB<sub>1</sub> en su dieta (T2) redujeron significativamente su ganancia de peso (25%), mientras que los que recibieron la toxina y el formulado mixto (T4) lograron aumentar la ganancia de peso en un 7,5% con respecto al tratamiento comercial (T5) que contiene antibióticos y promotores de crecimiento. He y col. (2013) determinaron los efectos de una suplementación combinada de vitamina E y levadura de selenio sobre el rendimiento de crecimiento en aves de corral alimentadas con dietas que contenían maíz naturalmente contaminado con una variedad de micotoxinas, principalmente AFB<sub>1</sub>, y lograron contrarrestar parcialmente los efectos negativos de AFB<sub>1</sub> sobre el crecimiento. Estos resultados se correlacionan con los obtenidos en nuestro experimento, y nos permite inferir que el agregado de aditivos a base de levadura y BAL en a la alimentación animal le proporciona mayor protección frente a la contaminación con micotoxinas, y que además aportan características benéficas como probióticos.

**Tabla 27.** Ganancia de peso total (kg) de los pollos parrilleros en los distintos tratamientos.

Tratamientos	Ganancia de peso total				
	Media (kg) $\pm$ D.E				
	0-7*	17**	24***	28****	34*****
T1	0,133 $\pm$ 0,02 a	0,543 $\pm$ 0,06 ab	0,894 $\pm$ 0,11 ab	1,182 $\pm$ 0,15 ab	1,591 $\pm$ 0,15 b
T2	0,128 $\pm$ 0,02 a	0,445 $\pm$ 0,11 a	0,833 $\pm$ 0,18 a	1,083 $\pm$ 0,23 a	1,410 $\pm$ 0,27 a
T3	0,176 $\pm$ 0,03 b	0,618 $\pm$ 0,08 b	1,008 $\pm$ 0,11 ab	1,324 $\pm$ 0,13 b	1,580 $\pm$ 0,15 b
T4	0,164 $\pm$ 0,02 ab	0,600 $\pm$ 0,06 ab	1,009 $\pm$ 0,07 ab	1,317 $\pm$ 0,12 b	1,737 $\pm$ 0,11 bc
T5	0,177 $\pm$ 0,04 b	0,633 $\pm$ 0,08 b	1,085 $\pm$ 0,10 b	1,387 $\pm$ 0,12 b	1,882 $\pm$ 0,15 c

T1: control; T2: toxina; T3: formulado mixto (*Saccharomyces cerevisiae* RC016 + *Lactobacillus rhamnosus* RC007); T4: formulado mixto + toxina; T5: comercial. Las letras diferentes indican diferencia significativa según el test de la mínima diferencia significativa de Fisher (LSD).

\* p= 0,0095; \*\* p= 0,0021; \*\*\*p= 0,0094; \*\*\*\*p= 0,0143; \*\*\*\*\*p= 0,1. La estadística debe ser leída en forma vertical para cada día de ensayo seleccionado.

El índice de conversión es un valor que expresa los kg de alimento necesarios para producir 1 kg de peso vivo. En la Tabla 29 se muestran los resultados obtenidos a partir de los datos de consumo de alimento (Tabla 28) en los que se puede observar que los tratamientos con mejor índice de conversión fueron el comercial (T5), el formulado mixto (T3) e inclusive el tratamiento de toxina más el formulado mixto (T4), es decir en estos casos se requirió menor cantidad de alimento para la producción de un kilo de peso vivo, con respecto al control (T1). En el tratamiento 2, todos los parámetros productivos probados en este ensayo se vieron afectados significativamente por la presencia de AFB<sub>1</sub>. Contrario a esto, Magnoli y col. (2011) realizaron un ensayo *in vivo* con pollos parrilleros al que le administraron monensina y bentonita de sodio frente a una dieta contaminada naturalmente con AFB<sub>1</sub>, donde los parámetros productivos no mostraron diferencias significativas.

**Tabla 28.** Consumo diario de los pollos parrilleros en los distintos tratamientos.

Tratamientos	Consumo de alimento (kg)				
	Media $\pm$ D.E				
	7	17	24	28	34
T1	0,83 $\pm$ 0,13 a	3,49 $\pm$ 0,06 b	4,29 $\pm$ 0,07 a	3,74 $\pm$ 0,21 b	3,07 $\pm$ 0,16 c
T2	0,80 $\pm$ 0,07 a	2,73 $\pm$ 0,2 a	4,1 $\pm$ 0,13 a	3,15 $\pm$ 0,35 a	2,42 $\pm$ 0,07 a
T3	0,99 $\pm$ 0,03 ab	3,28 $\pm$ 0,07 b	4,2 $\pm$ 0,23 a	3,50 $\pm$ 0,17 ab	2,86 $\pm$ 0,21 bc
T4	0,95 $\pm$ 0,04 ab	3,18 $\pm$ 0,14 b	4,2 $\pm$ 0,15 a	3,44 $\pm$ 0,13 ab	2,66 $\pm$ 0,08 ab
T5	1,03 $\pm$ 0,04 b	3,26 $\pm$ 0,09 b	4,33 $\pm$ 0,34 a	3,95 $\pm$ 0,02 b	3,02 $\pm$ 0,09 c

\* T1: control; T2: toxina; T3: formulado mixto (*Saccharomyces cerevisiae* RC016 + *Lactobacillus rhamnosus* RC007); T4: formulado mixto + toxina; T5: comercial. Las letras diferentes indican diferencia significativa ( $p < 0,01$ ) según el test de la mínima diferencia significativa de Fisher (LSD). La estadística debe ser leída en forma vertical para cada día de ensayo seleccionado.

**Tabla 29.** Índice de conversión por día de los pollos parrilleros en los distintos tratamientos.

Tratamientos	Índice de conversión (kg / kg)				
	Media:1 $\pm$ D.E				
	7*	17**	24***	28****	34****
T1	1,22 $\pm$ 0,15 c	1,60 $\pm$ 0,15 ab	1,94 $\pm$ 0,21 ab	2,12 $\pm$ 0,23 ab	1,96 $\pm$ 0,14 a
T2	1,30 $\pm$ 0,27 d	1,81 $\pm$ 0,48 b	2,07 $\pm$ 0,51 b	2,22 $\pm$ 0,43 b	2,06 $\pm$ 0,28 b
T3	1,15 $\pm$ 0,21 a	1,40 $\pm$ 0,18 a	1,69 $\pm$ 0,18 a	1,82 $\pm$ 0,16 a	1,89 $\pm$ 0,19 a
T4	1,18 $\pm$ 0,16 b	1,39 $\pm$ 0,12 a	1,66 $\pm$ 0,11 a	1,80 $\pm$ 0,13 a	1,67 $\pm$ 0,10 a
T5	1,22 $\pm$ 0,29 c	1,38 $\pm$ 0,20 a	1,60 $\pm$ 0,20 a	1,83 $\pm$ 0,19 a	1,67 $\pm$ 0,14 a

\* T1: control; T2: toxina; T3: formulado mixto (*Saccharomyces cerevisiae* RC016 + *Lactobacillus rhamnosus* RC007); T4: formulado mixto + toxina; T5: comercial. Las letras diferentes indican diferencia significativa según el test de la mínima diferencia significativa de Fisher (LSD). \*  $p = 0,8108$ ; \*\*  $p = 0,0334$ ; \*\*\*  $p = 0,0256$ ; \*\*\*\*  $p = 0,0165$ ; \*\*\*\*\*  $p = 0,05$ . La estadística debe ser leída en forma vertical para cada día de ensayo seleccionado.

En la Tabla 30 se detalla el rendimiento de carcasa para cada uno de los tratamientos ensayados. El mayor rendimiento correspondió al tratamiento con el formulado mixto (T3), seguido por el tratamiento comercial (T5) y la combinación de toxina y formulado mixto

(T4) que logró contrarrestar el efecto de la micotoxina. La presencia de AFB<sub>1</sub> (T2) redujo significativamente el rendimiento.

La obtención de un alto rendimiento de carcasa en el tratamiento con formulado mixto, es de gran importancia a nivel económico para el sistema de producción aviar.

Resultados similares al presente trabajo fueron observados por Bortoluzzi y col. (2016) donde probaron un aditivo alimentario combinando un adsorbente (glucomanano derivado de levadura) y un antioxidante (a base de algas) en pollos parrilleros alimentados con maíz naturalmente contaminado. En este caso el rendimiento de la carcasa disminuyó en los pollos alimentados con maíz naturalmente contaminado y se observó un mejor rendimiento en los pollos alimentados con dietas suplementadas con el aditivo combinado (adsorbente y antioxidante).

Otros autores encontraron que el rendimiento de la carcasa comercial en el día 42 se incrementó simultáneamente con una mayor tasa de crecimiento y una mayor eficiencia en el uso de alimento con el uso del probiótico comercial Anta Pro EF que contiene *E. faecium* DSM 10663 NCIMB 10415 (en agua potable) y Super-CyC, una mezcla de la bacteria formadora de esporas *B. subtilis* y una levadura *S. cerevisiae* KCTC 7193 (en alimento) (Abdel-Rahman y col., 2013). Anta Pro EF (*E. faecium*) en agua potable a razón de 2 g por 100 aves por día aumentó el peso de las carcasas listas para cocinar y el aumento de peso corporal total en el día 42 (Abdel-Rahman y col., 2013). En contraste, Afsharmanesh y Sadaghi (2014) no encontraron diferencias en el rendimiento de la carcasa, la tasa de crecimiento y la eficiencia de uso de alimento de las aves en el día 42 tratadas con un probiótico comercial (GalliPro) que contenía *B. subtilis*.

**Tabla 30.** Porcentaje en peso de las carcasas (g) de los pollos parrilleros en los distintos tratamientos.

Tratamientos	Carcasa (%)
	Media $\pm$ D.E
T1	66,53 $\pm$ 1,98 ab
T2	63,99 $\pm$ 3,96 a
T3	71,60 $\pm$ 2,73 c
T4	68,12 $\pm$ 0,86 abc
T5	68,87 $\pm$ 10,48 bc

\* T1: control; T2: toxina; T3: formulado mixto (*Saccharomyces cerevisiae* RC016 + *Lactobacillus rhamnosus* RC007); T4: formulado mixto + toxina; T5: comercial. Las letras diferentes indican diferencia significativa ( $p < 0,1743$ ) según el test de la mínima diferencia significativa de Fisher (LSD).

### Parámetros bioquímicos.

Para evaluar la salud general de los pollos parrilleros alimentados con los distintos tratamientos se realizó un examen de sangre el día previo al sacrificio (34 días de edad). En el suero se determinó la concentración de proteínas totales y albúmina, se calculó la fracción total de globulina y la relación Albúmina/Globulina (Tabla 31). También se determinaron los niveles de diferentes enzimas: aspartato aminotransferasa (AST), alanino aminotransferasa (ALT), gamma glutamiltransferasa (GGT) y lactato deshidrogenasa (LDH) (Tabla 32).

Comparado con el tratamiento control (T1), el tratamiento con toxina (T2), disminuyó el nivel de proteínas totales, pero no fue así con el tratamiento 3 y 5. Esta determinación se utiliza para evaluar el estado nutricional, que puede estar disminuido en casos de gastroenteropatías (por pérdida) y malnutrición (Hasan y col., 2015).

El hígado tiene un papel esencial en el metabolismo de los nutrientes, en la desintoxicación y excreción de metabolitos hidrófobos y xenobióticos, en la síntesis de la mayoría de las proteínas plasmáticas y en la digestión a través de la síntesis, la secreción y la conservación de los ácidos biliares que son esenciales para la absorción intestinal de grasas y lípidos, incluidas las vitaminas liposolubles. Por lo que la presencia de

enfermedad hepática a menudo se reconoce en base a actividades séricas elevadas de enzimas de origen hepático, (AST, ALT, LDH y GGT) (Tennant y Center, 2008; Gowda y col., 2009). Al encontrar los valores normales frente a los tratamientos realizados, se pudo concluir que los pollos no presentaron ningún tipo de patología o efecto sistémico que pudiera evidenciarse en el suero. La administración con probióticos en el presente ensayo demostró su inocuidad para las aves.

**Tabla 31.** Parámetros bioquímicos a partir de sueros de pollos parrilleros en los distintos tratamientos.

Tratamientos	PT (g/dL)	ALB (g/dL)	GLOB	ALB/GLOB
	Media ± D.E.			
T1	1,10 ± 0,44 ab	1,0 ± 0,2 a	0,1223	8,00
T2	0,96 ± 0,10 a	1,1 ± 0,2 ab	0,0266	35,14
T3	1,39 ± 0,44 b	1,3 ± 0,3 b	0,0463	28,96
T4	1,14 ± 0,34 ab	1,1 ± 0,2 ab	0,0488	22,39
T5	0,99 ± 0,27 ab	1,3 ± 0,4 b	0,0543	17,22

\* T1: control; T2: toxina; T3: formulado mixto (*Saccharomyces cerevisiae* RC016 + *Lactobacillus rhamnosus* RC007); T4: formulado mixto + toxina; T5: comercial. PT: proteínas totales; ALB: albúmina; GLOB: globulina; ALB/GLOB: relación albúmina/globulina. Las letras diferentes indican diferencia significativa ( $p < 0,11$ ) según el test de la mínima diferencia significativa de Fisher (LSD).

**Tabla 32.** Parámetros bioquímicos a partir de sueros de pollos parrilleros en los distintos tratamientos.

Tratamientos	ALT	AST	LDH	GGT
	Media (U/l) ± D.E.			
T1	1,27 ± 0,03	1,3 ± 0,18	1,93 ± 2,03	0,14 ± 0,07
T2	1,43 ± 0,20	1,25 ± 0,05	1,25 ± 0,51	0,15 ± 0,06
T3	1,47 ± 0,20	1,40 ± 0,18	0,89 ± 0,39	0,13 ± 0,05
T4	1,43 ± 0,15	1,32 ± 0,13	1,27 ± 0,28	0,11 ± 0,06
T5	1,35 ± 0,13	1,26 ± 0,03	2,59 ± 2,71	0,09 ± 0,05

\*T1: control; T2: toxina; T3: formulado mixto (*Saccharomyces cerevisiae* RC016 + *Lactobacillus rhamnosus* RC007); T4: formulado mixto + toxina; T5: comercial. AST: aspartatoaminotransferasa; ALT: alanino-aminotransferasa; LDH: lactato deshidrogenasa y GGT: gamma-glutamilttransferasa.

Pizzolitto y col. (2013) coinciden con nuestros resultados demostrando que los parámetros bioquímicos serológicos estudiados fueron mejorados por la aplicación de *S. cerevisiae* CECT 1891 a dosis de  $5 \times 10^9$  cél/L agregados en el agua de bebida destinada a animales alimentados con una dieta conteniendo 1,2 mg AFB<sub>1</sub>/kg. Además, la AFB<sub>1</sub> redujo significativamente la ganancia de peso, la ingesta del alimento y la tasa de conversión alimenticia, aumentando el daño hepático. La adición de la cepa de *S. cerevisiae* al agua potable, a las dietas contaminadas con AFB<sub>1</sub>, mostró un efecto de protección positivo sobre el peso relativo del hígado, la histopatología y los parámetros bioquímicos.

### **Peso relativo de los órganos inmunes como marcador de inocuidad para los probióticos.**

Las bacterias probióticas, especialmente las BAL y los productos de la fermentación, originan cambios en la población microbiana intestinal y a su vez, estimulan el sistema inmune (Higgins y col., 2007). Estos estímulos de tipo inmunológico pueden verse reflejados en el aumento del peso de órganos relacionados con el sistema inmune. Por lo tanto se evaluó el peso de la bolsa de Fabricio, del timo y del bazo. Los datos obtenidos se presentan en la Tabla 33. Estos órganos son tejidos linfoides primarios (bolsa de Fabricio y timo) y secundarios (bazo) (Oláh y col., 2013), representan un marcador de

inocuidad de los microorganismos usados; en el presente ensayo no se observaron diferencias significativas entre los diferentes tratamientos analizados ( $p < 0,01$ ), ya que no generaron un estímulo inmunológico que se vea representado en el aumento de peso de dichos órganos. Estos resultados concuerdan con los encontrados por Salarmoini y Fooladi (2010) quienes administraron *Lactobacillus acidophilus* ( $2 \times 10^8$  UFC/g) a pollos parrilleros durante 3 semanas y no presentaron aumentos de estos órganos.

En el caso del tratamiento con toxina puede observarse que el peso relativo de los órganos fue menor que en el grupo control, lo que estuvo de acuerdo con investigaciones de Chen y col., (2013) y Manafi y col., (2012), donde la presencia de AFB<sub>1</sub> resultó en la disminución del peso relativo de estos órganos y además redujo su funcionalidad deprimiendo el desarrollo e induciendo lesiones patológicas en los mismos.

**Tabla 33.** Porcentaje en peso de los órganos inmunes de pollos parrilleros en los distintos tratamientos.

Tratamientos	Bazo	Timo	Bolsa de Fabricio
	Media (%) ± D.E.		
T1	0,099 ± 0,036	0,353 ± 0,147	0,236 ± 0,066
T2	0,082 ± 0,017	0,339 ± 0,256	0,160 ± 0,049
T3	0,090 ± 0,025	0,418 ± 0,177	0,234 ± 0,096
T4	0,088 ± 0,026	0,433 ± 0,096	0,257 ± 0,084
T5	0,101 ± 0,024	0,426 ± 0,149	0,255 ± 0,089

\* T1: control; T2: toxina; T3: formulado mixto (*Saccharomyces cerevisiae* RC016 + *Lactobacillus rhamnosus* RC007); T4: formulado mixto + toxina; T5: comercial.

### Peso del hígado y análisis de lesiones macroscópicas.

El hígado es el principal órgano para AFB<sub>1</sub> (Dafalla y col., 1987; Ortatatlí y col., 2005), por lo que en este estudio se examinaron los hígados de los pollos para detectar cambios patológicos. En la tabla 34 se observan los pesos relativos de los hígados de los distintos tratamientos, donde puede observarse un aumento significativo ( $p < 0,0131$ ) en el tratamiento con AFB<sub>1</sub>, en comparación con el resto de los tratamientos. La adición de la mezcla de microorganismos a la dieta con toxina disminuyó el efecto tóxico de AFB<sub>1</sub> sobre el peso relativo de los hígados.

La Figura 19 muestra las apariencias macroscópicas de los hígados de pollos que se habían alimentado con las diferentes dietas experimentales. Los hígados de los pollos del tratamiento que contenía AFB<sub>1</sub> en el alimento eran friables y de apariencia pálida (Figura 19 T2) mientras que los hígados de los pollos del resto de los tratamientos tenían una apariencia normal (Figura 19 T1, T3, T4 y T5).

**Tabla 34.** Porcentaje de peso relativo de los hígados de pollos parrilleros en los distintos tratamientos.

<b>Tratamientos</b>	<b>Peso relativo Media (%) ± D.E.</b>
<b>T1</b>	1,977 ± 0,129 a
<b>T2</b>	2,423 ± 0,520 b
<b>T3</b>	1,847 ± 0,092 a
<b>T4</b>	1,991 ± 0,151 ab
<b>T5</b>	1,982 ± 0,227 a

\* T1: control; T2: toxina; T3: formulado mixto (*Saccharomyces cerevisiae* RC016 + *Lactobacillus rhamnosus* RC007); T4: formulado mixto + toxina; T5: comercial. Las letras diferentes indican diferencia significativa ( $p < 0,0131$ ) según el test de la mínima diferencia significativa de Fisher (LSD).

El hígado es el principal órgano de desintoxicación de AFB<sub>1</sub> y el principal órgano diana (Miazzo y col., 2005). En nuestro estudio, se observó un aumento pronunciado en el peso del hígado en pollos tratados con AFB<sub>1</sub>. A partir del examen macroscópico del hígado, se puede estar produciendo un efecto beneficioso de la utilización de *S. cerevisiae* RC016 y *L. rhamnosus* RC007 porque se puede apreciar un color pardo ligeramente más oscuro (Figura 12 T3 y T4), lo que sugiere un efecto protector contra la aflatoxicosis.



**Figura 19.** Hígados representativos de pollos parrilleros en los distintos tratamientos. T1: control; T2: toxina; T3: formulado mixto (*Saccharomyces cerevisiae* RC016 + *Lactobacillus rhamnosus* RC007); T4: formulado mixto + toxina; T5: comercial.

En relación con los cambios macroscópicos del hígado (Figura 19), en T1, T3 y T5 (considerados hígados normales) se observó una congestión sinusoidal leve, presentando bordes lobulares más agudos en T1 y T5 y bordes lobulares más redondeados en T3; Se observaron bordes capsulares hepáticos agudos en T2. El tratamiento 4 (T4) es similar al T1. En relación con el color, se observó una coloración más clara en los hígados de los animales alimentados con una dieta contaminada con AFB<sub>1</sub> (T2) y (T4) en comparación con los controles (T1, T3 y T5). La dieta que solo contenía levadura mostró el mismo color que el control, mientras que la que contenía la combinación de toxina y levadura mostró

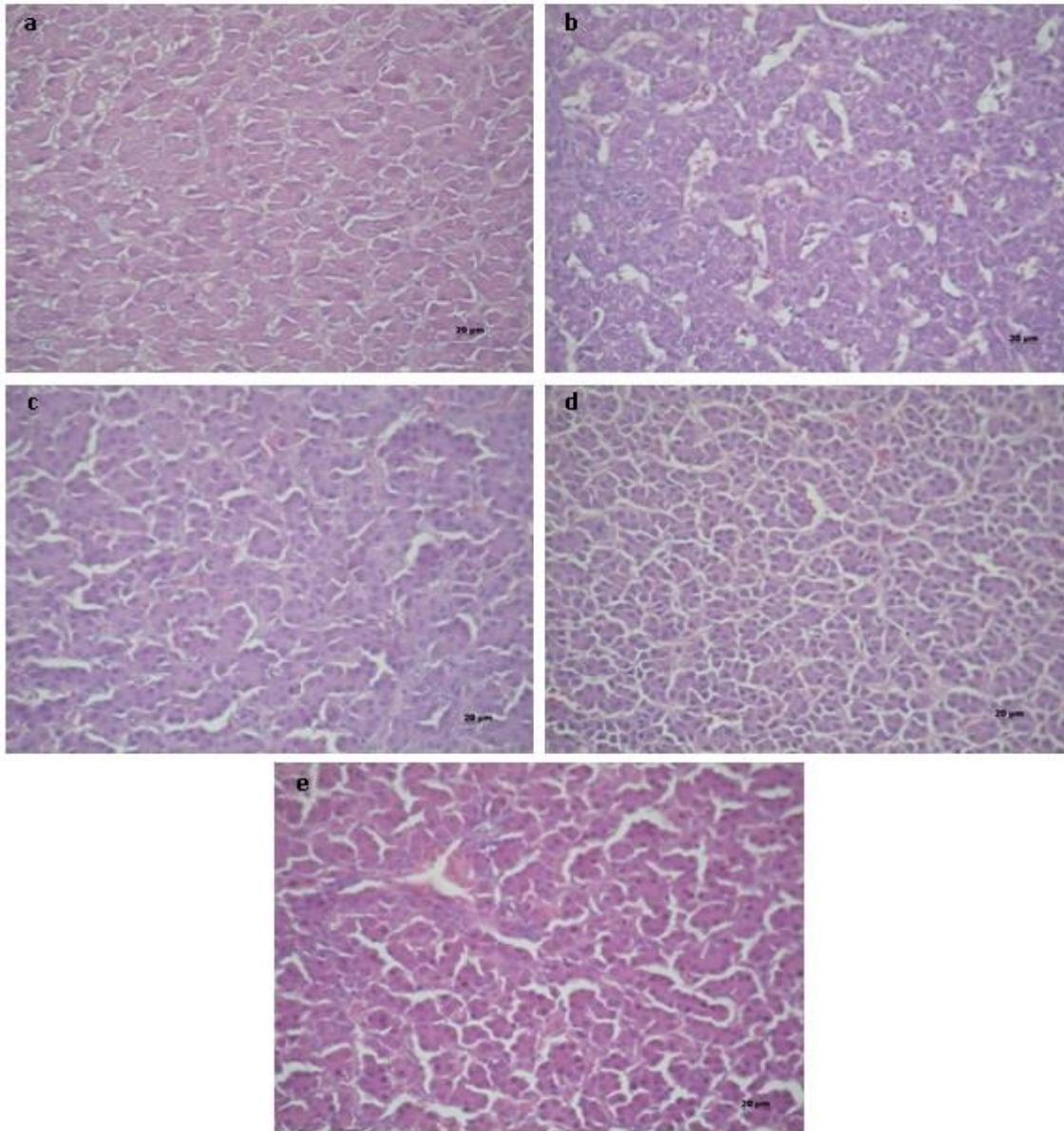
una mejora en el color que demostró el efecto preventivo de la levadura en presencia de la toxina.

### **Histopatología de los hígados.**

La Figura 20 muestra las microfotografías de los hígados teñidos con hematoxilina y eosina. En T1 y en T4, el aspecto lobular (hepático) periférico se observa levemente vacuolar (degeneración hidrópica). El hígado de T1 (control) muestra un tono rosado uniforme en todo el cuerpo e hiperplasia de los conductos biliares. Los hepatocitos (de cuatro secciones histopatológicas contiguas) muestran un citoplasma vacío con núcleos basófilos y contraídos de diferente diámetro. El espacio interlobular muestra 2-3 conductos biliares en el espacio portal y vasos sin sangre. Podría considerarse un cuadro típico de micotoxicosis crónica (estos animales recibieron una dieta naturalmente contaminada) (Figura 20, T1 y T5). Los hígados de la dieta que contienen el formulado mixto (*S. cerevisiae* RC016 + *L. rhamnosus* RC007) mostraron hepatocitos con ligera degeneración hidrópica (vacuolar), considerada una apariencia microscópica normal (Figura 20, T3) (la levadura se agregó a una dieta contaminada naturalmente). En el nivel intersticial lobular periférico, se ven dos conductos biliares y la vena interlobular. En la Figura 20 (T2) se muestra el hígado de los pollos alimentados con la dieta contaminada con AFB<sub>1</sub>, éstos presentan una ligera degeneración grasa microvacuolar de los hepatocitos. El corte coronal lobular de hepatocitos presenta pocos espacios sinusoidales y escasa congestión. Los núcleos son de tamaño y forma regulares. La Figura 20, T4 muestra hígados de pollos alimentados con la dieta contaminada con AFB<sub>1</sub> + el formulado mixto donde puede observarse un aspecto normal y no hubo proliferación de los conductos biliares. No se observó degeneración grasa microvacuolar, lo que demostró el efecto protector de la mezcla de probióticos en la aflatoxicosis hepática.

Los resultados obtenidos en este ensayo permitieron demostrar que las alteraciones macroscópicas y microscópicas de los hígados en presencia de AFB<sub>1</sub> pudieron ser prevenidos por la adición del formulado mixto. La ligera degeneración hidrópica mostrada en T3 se debió a que el formulado mixto se agregó a una dieta naturalmente contaminada. La histopatología de los hígados de los pollos alimentados con AFB<sub>1</sub> mostró una proliferación del conducto biliar y degeneración hepatocelular como patrón típico de aflatoxicosis (T2). Nuestros resultados coinciden parcialmente con Magnoli y col. (2011) quienes utilizaron un adsorbente comercial de bentonita de sodio (no biológico) para

prevenir el efecto de la 50  $\mu\text{g}$  de  $\text{AFB}_1/\text{kg}$  de alimento, en cuyo tratamiento todos los hígados mostraron alteraciones histopatológicas. Otros autores, suplementaron con 4 mg  $\text{AFB}_1/\text{kg}$  la dieta de pollos de engorde y además incluyeron en el agua de bebida una mezcla de protexina (probiótico) e inulina (prebiótico), donde los hallazgos patológicos revelaron que el hígado presentó cambios degenerativos y necróticos (80%) debido a la aflatoxicosis y que la adición simultánea de ambos protexina e inulina (simbióticos) lograron aliviar estas lesiones asociadas a las AFs logrando llevar los valores cercanos a los niveles del control (Hashem y Mohamed 2009).



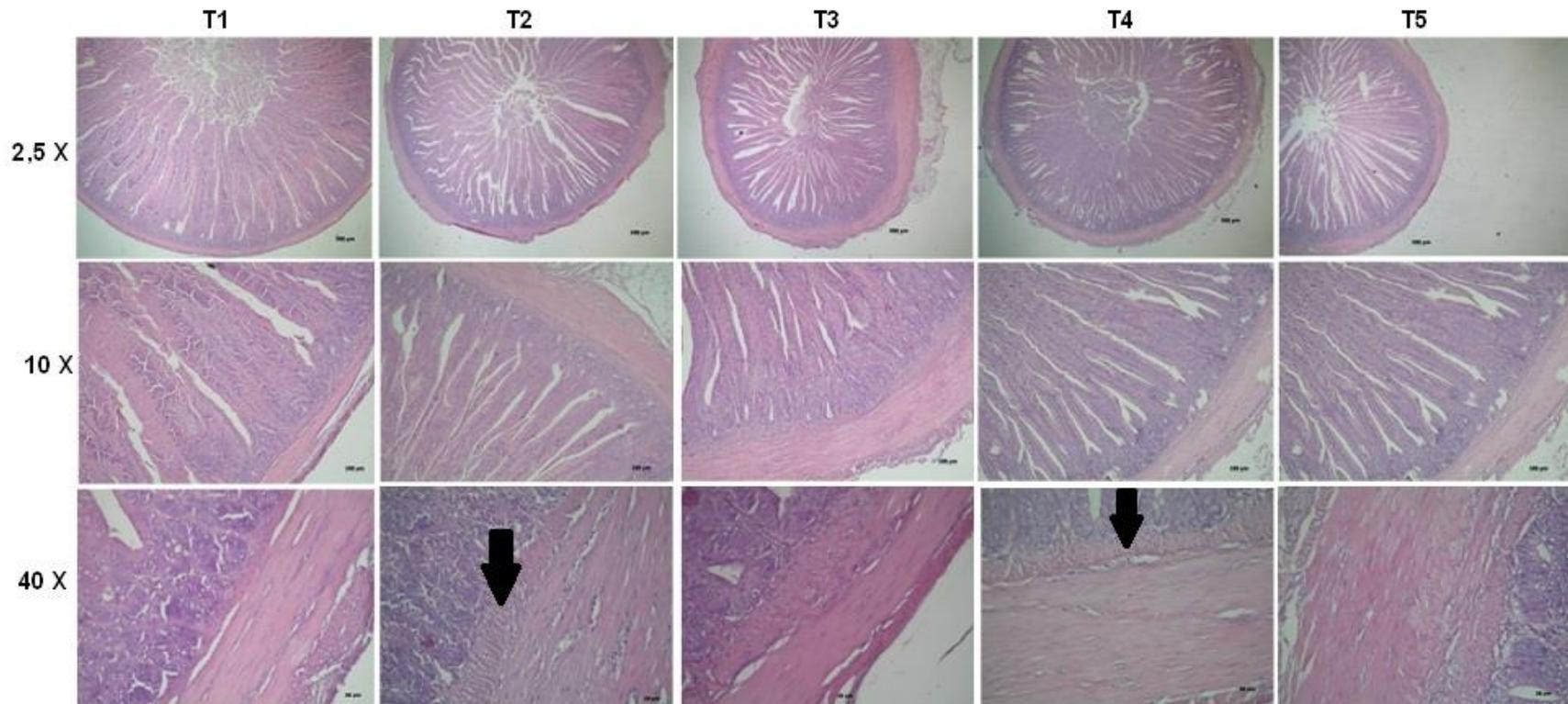
**Figura 20.** Histopatología de los hígados de pollos parrilleros sometidos a diferentes tratamientos. a) T1: control; b) T2: toxina; c) T3: formulado mixto (*Saccharomyces cerevisiae* RC016 + *Lactobacillus rhamnosus* RC007); d) T4: formulado mixto + toxina; e) T5: comercial. Aumento 40X.

**Análisis histológico del intestino delgado de pollos alimentados con aflatoxina B<sub>1</sub> y el formulado mixto de probióticos.**

La conversión y la absorción de los alimentos tienen lugar principalmente en el TGI. El suministro normal de nutrientes se produce debido a diferentes factores, incluidos las superficies de absorción, los microorganismos residentes y los procesos fisiológicos derivados del huésped (Yunus y col., 2011). Por otro lado, la mucosa intestinal está continuamente expuesta a una serie de antígenos, especialmente los antígenos bacterianos. Las células epiteliales intestinales (CEI) actúan como un sistema de defensa entre la luz intestinal y la lámina propia (de Kivit y col., 2014). La estructura y función completas de las CEI, que poseen células de unión estrecha y células caliciformes que producen moco, evitan que los antígenos luminales se trasladen al tejido subepitelial. La literatura relacionada con la inmunotoxicidad de la AFB<sub>1</sub> en el intestino es escasa y controvertida en cuanto a los efectos de la AFB<sub>1</sub> en la morfología e histopatología del intestino.

En esta tesis se realizó el estudio de los daños histológicos en el intestino delgado causados por la incorporación dietaria de AFB<sub>1</sub> a través de la tinción de hematoxilina-eosina y análisis microscópico de los mismos. La extensión del daño y la inflamación del intestino se evaluaron mediante un sistema de clasificación histopatológica estándar. La Figura 21 muestra las microfotografías representativas del intestino delgado de cada grupo de tratamientos a 2,5x, 10x y 40x. Los tratamientos T1, T3, T4 y T5 presentaron grado 0 de acuerdo a la denominación establecida por Del Carmen y col. (2013); mientras que el T2 con micotoxina presentó un grado 1 con engrosamiento de la submucosa del intestino delgado. Los pollos que recibieron el formulado mixto demostraron una mejora en los parámetros productivos analizados. Este hallazgo se relacionó con menores daños histológicos en el intestino delgado de pollos del T4 (formulado mixto + AFB<sub>1</sub>) en comparación con el T2. El engrosamiento de la submucosa del tratamiento con AFB<sub>1</sub> presentó una proliferación de las glándulas de Brünner (indicadas con ↓ en la Figura 21 T2 40x) las cuales constituyen acinos glandulares secretores de mucina y están situadas en la capa mucosa profunda y submucosa del duodeno, secretan mucus, pepsinógeno y urogastrona en respuesta a la estimulación ácida. Su secreción viscosa y alcalina, protege la mucosa intestinal del contenido gástrico y proporciona un medio adecuado para la actividad de las enzimas pancreáticas (Engelhart y Breves, 2005). Probablemente la

proliferación de estas glándulas se estimule en el tratamiento con AFB<sub>1</sub> como una respuesta de defensa frente a la presencia de la micotoxina a fin de proteger la función de las enzimas intestinales.



**Figura 21.** Microfotografías representativas del intestino delgado de cada grupo de tratamientos. T1: control; T2: toxina; T3: formulado mixto (*Saccharomyces cerevisiae* RC016 + *Lactobacillus rhamnosus* RC007); T4: formulado mixto + toxina; T5: comercial. ↓ Indica la presencia de glándulas Brünner. Aumento 500x y 1000x.

## CONCLUSIONES PARCIALES

El formulado mixto de *S. cerevisiae* RC016 + *L. rhamnosus* RC007 en las concentraciones  $10^5$  y  $10^6$  cél/ mL y sus extractos no demostraron toxicidad en células Vero.

La genotoxicidad causada por AFB<sub>1</sub> en la dieta fue prevenida por la administración del formulado mixto. Además, este formulado demostró su inocuidad ya que no presentó signos de genotoxicidad al ser administrado a la dieta de pollos parrilleros.

La administración del formulado mixto en ratones BALB/c sanos no produjo sobreestimulación del sistema inmune manteniendoo la normalidad de los parámetros inmunológicos determinados.

En el ensayo *in vivo* en pollos parrilleros, tanto los formulados simples como el mixto demostraron ser inocuos y poseer propiedades benéficas, mejorando la performance de los animales a través del aumento de algunos parámetros productivos como la ganancia de peso y el índice de conversión. La presencia de AFB<sub>1</sub> en la dieta experimental mostró daños típicos de una aflatoxicosis, los cuales fueron prevenidos por la aplicación de los formulados.

***Conclusiones finales***

---

## CONCLUSIONES FINALES

La realización de esta tesis doctoral permitió desarrollar una estrategia tecnológica rentable para la producción de altas densidades de biomasa seca de *S. crevisiae* RC016 y *L. rhamnosus* RC007.

La captación de micotoxinas se da a nivel de la pared celular y ésta se ve afectada por las condiciones del medio de cultivo y del TGI, por lo que se destaca la utilización de herramientas como la microscopia electrónica de alta resolución y la espectroscopía IR para revelar estas modificaciones en la ultraestructura y la composición macromolecular de la pared celular.

Ambos microorganismos poseen la capacidad de prevenir la acción tóxica de AFB<sub>1</sub> a través estrategias complementarias de adsorción de AFB<sub>1</sub> de la levadura y la biotransformación de AFB<sub>1</sub> de la BAL.

La aplicación de estos formulados simples y mixtos en la alimentación animal es segura e inocua y mejoró la sanidad y productividad animal ya que complementan las propiedades probióticas y antimicotoxinas en un mismo producto.

***Perspectivas futuras***

---

**PERSEPECTIVAS FUTURAS**

Las perspectivas futuras que se desprenden del presente trabajo de tesis estarán orientadas a:

- \* Aplicar estrategias de ingeniería bioquímica a fin de optimizar la viabilidad y funcionalidad de aditivos probióticos/adsorbentes de micotoxinas luego del procesamiento tecnológico.
- \* Exponer las células al estrés ambiental apropiado para conducir a un aumento de la viabilidad probiótica.
- \* Mejorar eficientemente la robustez y la viabilidad de las células de los formulados para mejorar la performance de los animales de producción a los cuales están destinados.

## ***Bibliografia***

---

**BIBLIOGRAFÍA**

- Abdel-Rahman H., Shawky S., Ouda H., Nafeaa A. y Orabi S. (2013) Effect of two probiotics and bioflavonoids supplementation to the broilers diet and drinking water on the growth performance and hepatic antioxidant parameters. *Global Veterinaria*, 10(6): 734–741.
- Adebo O. A., Njobeh P. B., Gbashi S., Nwinyi O. C. y Mavumengwana V. (2017) Review on microbial degradation of aflatoxins. *Critical reviews in food science and nutrition*, 57(15), 3208-3217.
- Adt I., Toubas D., Pinon J. M., Manfait M. y Sockalingum G. D. (2006) FTIR spectroscopy as a potential tool to analyse structural modifications during morphogenesis of *Candida albicans*. *Archives of microbiology*, 185(4), 277-285.
- Afsharmanesh M. y Sadaghi B. (2014) Effects of dietary alternatives (probiotic, green tea powder, and Kombucha tea) as antimicrobial growth promoters on growth, ileal nutrient digestibility, blood parameters, and immune response of broiler chickens. *Comparative Clinical Pathology*, 23(3), 717-724.
- 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.
- Agyei D., y Danquah M. K. (2011) Industrial-scale manufacturing of pharmaceutical-grade bioactive peptides. *Biotechnology advances*, 29(3), 272-277.
- Ahlberg S. H., Joutsjoki V. y Korhonen H. J. (2015) Potential of lactic acid bacteria in aflatoxin risk mitigation. *International journal of food microbiology*, 207, 87-102.
- Ahmed M. E., Abbas T. E., Abdhag M. A. y Mukhtar D. E. (2015) Effect of Dietary Yeast *Saccharomyces cerevisiae* Supplementation on Performance, Carcass Characteristics and Some Metabolic Responses of Broilers. *Anim. and Vet. Sci*, 3(5-1), 5-10.
- Alagawany M., El-Hack M. E. A., Farag M. R., Sachan S., Karthik K. y Dhama K. (2018) The use of probiotics as eco-friendly alternatives for antibiotics in poultry nutrition. *Environmental Science and Pollution Research*, 1-8.
- Alberts J. F., Engelbrecht Y., Steyn P. S., Holzapfel W. H. y van Zyl W. H. (2006) Biological degradation of aflatoxin B<sub>1</sub> by *Rhodococcus erythropolis* cultures. *Int J Food Microbiol* 109, 121–126.
- Alonso V.A; Monge M.P; Dalcero A M; Keller K M; Rosa CAR; Cavaglieri L.R; Chiacchiera S.M. (2009) Contribution of raw materials on dairy cattle feedstuff aflatoxin contamination in central Argentina. *Revista Brasileira de Medicina Veterinaria*; Lugar: Seropédica, RJ 23890-000, Brasil; vol. 31 p. 92 – 99.
- Altaf M., Naveena B., Venkateshwar M., Kumar E. V. y Reddy G. (2006) Single step fermentation of starch to L(+) lactic acid by *Lactobacillus amylophilus* GV6 in SSF using inexpensive nitrogen sources to replace peptone and yeast extract—optimization by RSM. *Process Biochemistry*, 41(2): 465–472.
- Ananta E., Birkeland S.-E., Corcoran B. y 21 others. (2004) Processing effects on the nutritional advancement of probiotics and prebiotics. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 16(2-3): 113–124.
- Andretta I., Kipper M., Lehnen C. R., Hauschild L., Vale M. M., Lovatto P. A. (2011) Meta-analytical study of productive and nutritional interactions of mycotoxins in broilers. *Poult. Sci.* 90, 1934–1940.
- AOAC. (1995) Official methods of analysis. 16th ed., Association of Official Analytical Chemists. Gaithersburg, MD.
- Armando M. R., Dogi C. A., Rosa C. A., Dalcero A. M. y Cavaglieri L. R. (2012) *Saccharomyces cerevisiae* strains and the reduction of *Aspergillus parasiticus* growth and aflatoxin B<sub>1</sub> production at different interacting environmental conditions, in vitro. *Food Additives and Contaminants: Part A*, 29(9), 1443-1449.
- Armando M.R., Dogi C.A., Pizzolitto R.P., Escobar F., Peirano M.S., Salvano M.A., Sabini L.I., Combina M. (2011) *Saccharomyces cerevisiae* strains from animal environmental with aflatoxin B<sub>1</sub> binding ability and antipathogenic bacteria influence in vitro. *World Mycotoxin J* 1, 59–68.
- Ashayerizadeh O., Dastar B., Shargh M. S., Ashayerizadeh A., Mamooee M. (2009) Influence of antibiotic, prebiotic and probiotic supplementation to diets on carcass characteristics:

- hematological indices and internal organ size of young broiler chickens. *J. Anim. Vet. Adv.* 8, 1772–1776.
- Awad W. A., Aschenbach J. R. y Zentek J. (2012) Cytotoxicity and metabolic stress induced by deoxynivalenol in the porcine intestinal IPEC-J2 cell line. *Journal of animal physiology and animal nutrition*, 96(4), 709-716.
- Awaisheh S. S., Obeidat M. M., Al-Tamimi H. J., Assaf A. M., EL-Qudah J. M. y Al-khazaleh J. M. (2016) In vitro cytotoxic activity of probiotic bacterial cell extracts against Caco-2 and HRT-18 colorectal cancer cells. *Milk Sci Int*, 69, 27e31.
- Axelsson I. (2004) Lactic acid bacteria: classification and physiology. En: Salminen s.; von wright, a. y ouwehand, a. *Lactic acid bacteria: microbiology and functional aspects*. 3 ed. Marcel-Dekker, Nueva York.
- Barros G., Magnoli C., Reynoso M., Ramirez M., Farnochi M., Torres A., Dalcero M., Sequeira J., Rubinstein C. y Chulze S. (2009) Fungal and mycotoxin contamination in Bt maize and non-Bt maize grown in Argentina, *World Mycotoxin Journal*, 2(1), pp. 53–60.
- Baumgart D. C. y Dignass A. U. (2002) Intestinal barrier function. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 5(6): 685–694.
- Baurhoo B., Ferket P. R. y Zhao X. (2009) Effects of diets containing different concentrations of mannanoligosaccharide or antibiotics on growth performance, intestinal development, cecal and litter microbial populations, and carcass parameters of broilers. *Poultry Science*, 88(11), 2262-2272.
- Belajová E., Rauová D. y Dasko L. (2007) Retention of ochratoxin A and fumonisin B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> from beer on solid surfaces: comparison of efficiency of adsorbents with different origin. *Eur Food Res Technol* 224, 301–308.
- Blajman J. E., Zbrun M. V., Astesana D. M., Berisvil A. P., Romero Scharpen A., Fusari M. L., Soto, L. P., Signorini M. L., Rosmini M. R. y Frizzo L. S. (2015) Probiotics in broilers' rearing: A strategy for intensive production models. *Revista Argentina de Microbiología*, 47(4), pp. 360–367.
- Bond, C. (2007) Freeze-drying of yeast cultures. pp. 99–107, in: *Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols. Methods in Molecular Biology No. 368*. Humana Press, New York, USA.
- Borenfreund E., Babich H., Martin-Alguacil N. (1988) Comparisons of two *in vitro* cytotoxicity assays- the neutral red (nr) and tetrazolium MTT tests. *Toxicol In Vitro*, 2, 1-6.
- Borenfreund E., Puerner J. A. (1985) Toxicity determined *in vitro* by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicol Lett*, 24, 119-24.
- Bortoluzzi C., Schmidt J. M., Bordignon H. L. F., Fülber L. M., Layter J. R. y Fernandes J. I. M. (2016) Efficacy of yeast derived glucomannan or algae-based antioxidant or both as feed additives to ameliorate mycotoxicosis in heat stressed and unstressed broiler chickens. *Livestock Science*, 193, 20-25.
- Bouhet S. y Oswald I. P. (2007) The intestine as a possible target for fumonisin toxicity. *Mol Nutr Food Res* 51(8):925 – 931.
- Box G. E. P. y N. R. Draper. (1987) *Empirical Model-Building and Response Surfaces*. Wiley, New York.
- Braykov NP, Eisenberg JN, Grossman M., Zhang L., Vasco K., Cevallos W. y Foxman B. (2016) Antibiotic resistance in animal and environmental samples associated with small-scale poultry farming in northwestern Ecuador. *Msphere*, 1(1), e00021-15.
- Broberg A., Jacobsson K., Ström K. y Schnürer J. (2007) Perfiles de metabolitos de bacterias del ácido láctico en ensilaje de gramíneas. *Microbiología aplicada y ambiental*.
- Bueno D. J., Casale C. H., Pizzolitto R. P., Salano M. A. y Olivier G. (2007) Physical Adsorption of Aflatoxin B<sub>1</sub> by lactic acid bacteria and *Saccharomyces cerevisiae*: A theoretical model. *Journal of Food Protection*, 70, 2148–2154.
- Burattini E., Cavagna M., Dell'Anna R., Campeggi F. M., Monti F., Rossi F. y Torriani. (2008) A FTIR microspectroscopy study of autolysis in cells of the wine yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Vibrational Spectroscopy* 47: 139–147.
- Calderone R. A. y Braun P. C. (1991) Adherence and receptor relationships of *Candida albicans*. *Microbiol Rev* 55:1–20.
- Caloni F., Spotti M., Pompa G., Zucco F., Stammati A. y De Angelis I. (2002). Evaluation of fumonisin B<sub>1</sub> and its metabolites absorption and toxicity on intestinal cells line Caco-2. *Toxicol*, 40(8), 1181-1188.

- Caly DL, D'Inca R., Auclair E., y Drider D. (2015) Alternatives to Antibiotics to Prevent Necrotic Enteritis in Broiler Chickens: A Microbiologists Perspective, *Frontiers in Microbiology*, 6, pp. 1–12.
- Caridi A. (2007) New perspectives in safety and quality enhancement of wine through selection of yeasts based on the parietal adsorption activity. *Int. J. Food Microbiol.* 120 , 167 – 172.
- Carro M.D., Ranilla M.J. Giráldez F. J. y Mantecón A.R. (2006) Effects of malate on diet digestibility, microbial protein synthesis, plasma metabolites and performance of growing lambs fed a high-concentrate diet. *J. Anim. Sci.* 84: 405-410.
- Carvalho A. S., Silva J., Ho P., Teixeira P., Malcata F. X. y Gibbs P. (2004) Relevant factors for the preparation of freeze-dried lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, 14(10), 835-847.
- CAST. (2003) Mycotoxins. Risks in plant, animal, and human systems. Ames, Iowa: Council for Agricultural Science and Technology. (Task Force Report 139).
- Cavaglieri L. R., Keller K. M., Pereyra C. M., Pereyra M. G., Alonso V. A., Rojo F. G. y Rosa C. A. R. (2009) Fungi and natural incidence of selected mycotoxins in barley rootlets. *Journal of Stored Products Research*, 45(3), 147-150.
- Celik K., M. Denly y T. Savas. (2003) Reduction of effects of aflatoxin B1 by using baker yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) in growing broiler chick diets. *R. Bras. Zootec.* 32:615–619.
- Černá M., Barros A. S., Nunes A., Rocha S. M., Delgadillo I., Čopíková J. y Coimbra M. A. (2003) Use of FT-IR spectroscopy as a tool for the analysis of polysaccharide food additives. *Carbohydrate Polymers*, 51(4), 383-389.
- Champagne C. P., Gardner N. J. y Lacroix C. (2007) Fermentation technologies for the production of exopolysaccharide-synthesizing *Lactobacillus rhamnosus* concentrated cultures. *Electronic Journal of Biotechnology*, 10(2): 211–220.
- Champagne C. P., Ross R. P., Saarela M., Hansen K. F. y Charalampopoulos D. (2011) Recommendations for the viability assessment of probiotics as concentrated cultures and in food matrices. *International journal of food microbiology*, 149(3), 185-193.
- Chauhan N., Li D., Singh P., Calderone R. A., Kruppa M. (2002) The cell wall of *Candida* spp. In: Calderone RA (ed) *Candida and candidiasis*. ASM, Washington pp 159–175.
- Chen K., Shu G., Peng X., Fang J., Cui H., Chen J. y Geng Y. (2013) Protective role of sodium selenite on histopathological lesions, decreased T-cell subsets and increased apoptosis of thymus in broilers intoxicated with aflatoxin B1. *Food and chemical toxicology*, 59, 446-454.
- Cheng G, Hao H, Xie S, Wang X, dai M, Huang L y Yuan Z. (2014) Antibiotic alternatives: the substitution of antibiotics in animal husbandry? *Frontiers in Microbiology* 5 : 217.
- Chiarini L., Mara L. y Tabacchioni S. (1992) Influence of growth supplements on lactic acid production in whey ultrafiltrate by *Lactobacillus helveticus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 36(4): 461-464.
- Chichlowski M., Croom J., McBride B. W., Havenstein G. B. y Koci M. D. (2007) Metabolic and physiological impact of probiotics or direct-fed-microbials on poultry: a brief review of current knowledge. *Int J Poult Sci*, 6(10), 694-704.
- Chimchang J., Theparee T., Wongein S., Trivirod T., Tanasupawa S., Taweechotipatr M. y Wongsatayanon B. (2016) Screening of Potential Probiotic Lactic Acid Bacteria with Anticancer Properties. *Journal of the Medical Association of Thailand Chotmaihet thangphaet*, 99, S70-S78.
- Chiu Y. J., Nam M. K., Tsai Y. T., Huang C. C., Tsai C. C. (2013) Genotoxicity assessment of multispecies probiotics using reverse mutation, mammalian chromosomal aberration, and rodent micronucleus tests. *The Scientific World Journal*: 7. <https://doi.org/10.1155/2013/254239> PMID: 24250262.
- Collado M.C. y Sanz Y. (2006) Method for direct selection of potentially probiotic *Bifidobacterium* strains from human feces based on their acid-adaptation ability. *Journal of Microbiological Methods*, 66(3): 560-563.
- Commission Regulation (EC) No 386/2009 of 12 May 2009 amending Regulation (EC) No 1831/2003 of the European Parliament and of the Council as regards the establishment of a new functional group of feed additives.
- Coulombe Jr., R. A., Guarisco J. A., Klein P. J., Hall J. O. (2005) Chemoprevention of aflatoxicosis in poultry by dietary butylated hydroxytoluene. *Animal Feed Science and Technology* 121, 217–225.

- Cowieson A. J., Hruby M., y Pierson E. M. (2006) Evolving enzyme technology: impact on commercial poultry nutrition. *Nutrition research reviews*, 19(1), 90-103.
- CSCRA. (2016) Systeme canadien de surveillance de la resistance aux antimicrobiens e rapport De 2016. Gouvernement du Canada.
- Czerucka D., Piche T. y Rampal P. (2007) Yeast as probiotics–*Saccharomyces boulardii*. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 26(6), 767-778.
- Dafalla R., Yagi A.I. y Adam S. E. I. (1987) Experimental aflatoxicosis in hybro-type chicks: sequential changes in growth and serum constituents and histopathological changes. *Veterinary and Human Toxicology*, 29: 222–226.
- Dalié D., Deschamps A., Richard-Forget F. (2010) Lactic acid bacteria – Potential for control of mold growth and mycotoxins: A review. *Food Control* 21, 370–380.
- Daşkıran M., Öno A., Cengiz Ö., Ünsal H., Türkyılmaz S., Tatlı O. y Sevim O. (2012) Influence of dietary probiotic inclusion on growth performance, blood parameters, and intestinal microflora of male broiler chickens exposed to posthatch holding time. *Journal of Applied Poultry Research*, 21(3), pp. 612–622.
- de Kivit S.; Tobin M. C.; Forsyth C. B.; Keshavarzian A.; Landay A. L. (2014) Regulation of intestinal immune responses through TLR activation: Implications for pro- and prebiotics. *Front. Immunol*, 5, 60.
- de Man Rogosa & Sharpe (1960) J.C. De Man, M. Rogosa, M.E. Sharpe. A medium for the cultivation of lactobacilli. *Journal of Applied Bacteriology*, 23 (1960), pp. 130-135.
- de Souza Sant'Ana A., Rosenthal A., y de Massaguer P. R. (2008) The fate of patulin in apple juice processing: A review. *Food Research International*, 41(5), 441-453.
- de Vos P., Faas M. M., Spasojevic M. y Sikkema J. (2010) Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. *International dairy journal*, 20(4), 292-302.
- Del Carmen S., Zurita-Turk M., Lima F. A, Dos Santos J. C, Leclercq S. Y, Chatel J. M. y LeBlanc J. G. (2013) A novel interleukin-10 DNA mucosal delivery system attenuates intestinal inflammation in a mouse model. *European Journal of Inflammation*, 11(3), 641-654.
- Delcour J., Ferain T., Deghorain M., Palumbo E., Hols P. (1999) The biosynthesis and functionality of the cell-wall of lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 76, 159–184.
- Desmazeaud M. y De Roissart H. (1994) *Métabolisme général des bactéries lactiques*. Bactéries lactiques, 1, 200.
- Devegowda G., y Murthy T. N. K. (2005) Mycotoxins: Their effects in poultry and some practical solutions. Pages 25–56 in *The Mycotoxin Blue Book*. DE Diaz, ed. Nottingham University Press, Nottingham, UK.
- Di Rienzo J. A., Casanoves F., Balzarini M. G., Gonzalez L., Tablada M., Robledo C. W. (2015) InfoStat versión. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Díaz-Vergara L., Pereyra C. M., Montenegro M., Pena G. A., Aminahuel C. A. y Cavaglieri L. R. (2017) Encapsulated whey-native yeast *Kluyveromyces marxianus* as a feed additive for animal production. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 34(5), 750-759.
- Dogi C. A., Armando R., Ludueña R., de Moreno de Leblanc A., Dalcero A. y Cavaglieri L., (2011) *Saccharomyces cerevisiae* strains retain their viability and AFB1 binding ability under gastrointestinal conditions and improve ruminal fermentation. *Food Add Contam* 28, 1705–1711.
- Dogi C., García G., De Moreno de LeBlanc A., Greco C., y Cavaglieri L. (2016) *Lactobacillus rhamnosus* RC007 intended for feed additive: immune-stimulatory properties and ameliorating effects on TNBS-induced colitis. *Beneficial microbes*, 7(4), 539-547.
- Dogi C.A., Fochesato A., Armando R., Pribull B., Souza M.M.S., da Silva Coelho I. y Cavaglieri L. (2013) Selection of lactic acid bacteria to promote an efficient silage fermentation capable of inhibiting the activity of *Aspergillus parasiticus* and *Fusarium graminearum* and mycotoxin production. *Journal of applied microbiology*, 114 (6), 1650-1660.
- Dogi C.A., Weill F., y Perdígón G. (2010) Immune response of non-pathogenic Gram (+) and Gram (–) bacteria in inductive sites of the intestinal mucosa: Study of the pathway of signaling involved. *Immunobiology*, 215(1), 60-69.
- Ducatelle R., Eeckhaut V., Haesebrouck F., Van Immerseel F. (2015) A review on prebiotics and probiotics for the control of dysbiosis: present status and future perspectives. *Animal* 9, 43-48.

- El-Nezami H. S., Chrevatidis A., Auriola S., Salminen S. y Mykkänen H. (2002) Removal of common *Fusarium* toxins in vitro by strains of *Lactobacillus* and *Propionibacterium*. *Food Additives & Contaminants*, 19(7), 680-686.
- Engelhart W. V. y Breves G. (2005) *Fisiología digestiva*. Ed. Acribia, España, 985 p.
- Escobar F. M., Sabini M. C., Cariddi L. N., Sabini L. I., Mañas F., Cristofolini A., y Cavaglieri L. R. (2015) Safety assessment of essential oil from *Minthostachys verticillata* (Griseb.) Epling (peperina): 90-Days oral subchronic toxicity study in rats. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 71(1), 1-7.
- Escobar J.C., Rojas C.A., Giraldo G.G.A., y Padilla-Sanabria L. (2010) Evaluación del crecimiento de *Lactobacillus casei* y producción de ácido láctico usando como sustrato el suero de leche vacuno. En: *Rev. Invest. Univ. Quindío*. 20: 42-49.
- European Union Register of Feed Additives pursuant to Regulation (EC) No 1831/2003. 2016. Edition 245. [https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/animal-feed-eu-reg-comm\\_register\\_feed\\_additives\\_1831-03.pdf](https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/animal-feed-eu-reg-comm_register_feed_additives_1831-03.pdf)
- Fagerlund A., Lindbäck T. y Granum P. E. (2010) *Bacillus cereus* cytotoxins Hbl, Nhe and CytK are secreted via the Sec translocation pathway. *BMC microbiology*, 10(1), 304.
- Fajardo Castillo E. E., y Sarmiento Forero S. C. (2007). Evaluación de melaza de caña como sustrato para la producción de *Saccharomyces cerevisiae*. Tesis, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, D.C., pp. 48-49.
- FAO. (2016) Probiotics in animal nutrition – Production, impact and regulation by Yadav S. Bajagai, Athol V. Klieve, Peter J. Dart and Wayne L. Bryden. Editor Harinder P.S. Makkar. FAO Animal Production and Health Paper No. 179. Rome.
- FAO/WHO (2001). Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria; FAO/WHO: Córdoba, Argentina, pp. 1 – 34.
- Feng G. D., Zhang K. Y., He J., Liu Y. F., Yin H. T. (2010) Effects of naturally moldy corn on growth-curve of ducks. *Feed Ind.* 31, 42–44.
- Fernández Juri M. G., Bressán F., Astoreca A. L., Barberis C. L., Campos G. S., Cavaglieri L. R., Dalcerro A. M. y Magnoli C. E. (2009). Aflatoxins, fumonisins and toxigenic fungi in raw materials and ready dry dog food in Argentina. *Rev Bras Med Vet* 31, 109-117. Ferreira S. C., Bruns R. E., Ferreira H. S., Matos G. D., David J. M.,
- Figueiró L. R., Comerlato L. C., Da Silva M. V., Zuanazzi J. Â. S., Von Poser G. L. y Ziulkoski A. L. (2016) Toxicity of *Glandularia selloi* (Spreng.) Tronc. leave extract by MTT and neutral red assays: influence of the test medium procedure. *Interdisciplinary toxicology*, 9(1), 25-29.
- Fochesato A. S., Cuello D., Poloni V., Galvagno M. A., Dogi C. A. y Cavaglieri L. R. (2019) Dinámica de adsorción / desorción de la aflatoxina B1 en presencia de *Lactobacillus rhamnosus* RC 007 en un modelo simulado del tracto gastrointestinal. *Revista de microbiología aplicada*, 126 (1), 223-229.
- Fochesato A. S., Galvagno M. A., Cerrutti P. C., Gonzalez Pereyra M. L. (2018) Optimization and Production of Probiotic and Antimycotoxin Yeast Biomass Using Bioethanol Industry Waste via Response Surface Methodology. *Adv Biotech & Micro*. 2018; 8(1): 555727.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations. (FAO) 2009. The world state of agriculture and food 2009. Rome. Italy: Subdivision of Policies and Support in the Field of Electronic Publishing, 2009. 0251-1371.
- Frizzo L., Zbrun M., Soto L. y Signorini M. (2011) Effects of probiotics on growth performance in young calves: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Animal Feed Science and Technology*, 169(3): 147–156.
- Gadde U., Kim W. H., Oh S. T. y Lillehoj H. S. (2017) Alternatives to antibiotics for maximizing growth performance and feed efficiency in poultry: a review. *Animal health research reviews*, 18(1), 26-45.
- Galdeano C. M., De Moreno de LeBlanc A., Vinderola G., Bonet M. E. y Perdígón G., (2007) Proposed model: mechanisms of immunomodulation induced by probiotic bacteria. *Clinical and Vaccine Immunology* 14: 485-492.

- Galichet A., Sockalingum G. D., Belarbi A. y Manfait M. (2001) FTIR spectroscopic analysis of *Saccharomyces cerevisiae* cell walls: study of an anomalous strain exhibiting a pink-colored cell phenotype. *FEMS microbiology letters*, 197(2), 179-186.
- Gamar - Nourani L., Blondeau K. y Simonet J.M. (1998) Influence of culture conditions on exopolysaccharide production by *Lactobacillus rhamnosus* strain C83. *Journal of Applied Microbiology*, 85(4), 664-672.
- García G. R., Dogi C. A., Poloni V. L., Fochesato A. S., De Moreno de Leblanc A., Cossalter A. M. y Cavaglieri L. R. (2018) Beneficial effects of *Saccharomyces cerevisiae* RC016 in weaned piglets: *in vivo* and *ex vivo* analysis. *Beneficial microbes*, 1-10.
- García G. R., Payros D., Pinton P., Dogi C. A., Laffitte J., Neves M. y Oswald I. P. (2017) Intestinal toxicity of deoxynivalenol is limited by *Lactobacillus rhamnosus* RC007 in pig jejunum explants. *Archives of toxicology*, 92(2), 983-993.
- Garrido C. E., Hernández Pezzani C. y Pacin A. (2012) Mycotoxins occurrence in Argentina maize (*Zea mays* L.), from 1999 to 2010., *Food Control*. 25(2), pp. 660–665.
- Gaviria Rivera A. M., Granum P. E. y Priest F. G. (2000) Common occurrence of enterotoxin genes and enterotoxicity in *Bacillus thuringiensis*. *FEMS Microbiology Letters*, 190(1), 151-155.
- Ghasemi H. A., Kasani N. y Taherpour K. (2014) Effects of black cumin seed (*Nigella sativa* L.), a probiotic, a prebiotic and a synbiotic on growth performance, immune response and blood characteristics of male broilers. *Livestock Science*, 164, 128-134.
- Giannenas I., Papadopoulos E., Tsalie E., Triantafyllou E. L., Henikl S., Teichmann K., y Tontis D. (2012) Assessment of dietary supplementation with probiotics on performance, intestinal morphology and microflora of chickens infected with *Eimeria tenella*. *Veterinary parasitology*, 188(1-2), 31-40.
- Göksungur Y. y Güvenç U. (1997) Batch and continuous production of lactic acid from beet molasses by *Lactobacillus delbrueckii* IFO 3202. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 69(4): 399–404.
- González Pereyra M. L., Alonso V. A., Sager R., Morlaco M. B., Magnoli C. E., Astoreca A. L. y Cavaglieri L. R. (2008) Fungi and selected mycotoxins from pre-and postfermented corn silage. *Journal of applied microbiology*, 104(4), 1034-1041.
- González Pereyra M. L., Dogi C., Torres Lisa A., Wittouck P., Ortíz M., Escobar F. y Dalcero A. M. (2014) Genotoxicity and cytotoxicity evaluation of probiotic *Saccharomyces cerevisiae* RC016: a 60-day subchronic oral toxicity study in rats. *Journal of applied microbiology*, 117 (3), 824 - 833.
- González Pereyra M. L., Martínez M. P., Petroselli G., Balsells R. E. y Cavaglieri L. R. (2018) Antifungal and aflatoxin-reducing activity of extracellular compounds produced by soil *Bacillus* strains with potential application in agriculture. *Food Control*, 85, 392-399.
- 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.
- Gourama H. y Bullerman L. B. (1995) Inhibition of growth and aflatoxin production of *Aspergillus flavus* by *Lactobacillus* species. *Journal of Food Protection*, 58, 1249–1256.
- Gowda S., Desai P. B., Hull V. V, Math A. a K., Vernekar S. N. y Kulkarni S. S. (2009) A review on laboratory liver function tests., *The Pan African medical journal*, 3(November), p. 17.
- Gratz S., Täubel M., Juvonen R. O., Viluksela M., Turner P. C., Mykkänen H. y El-Nezami H. (2006) *Lactobacillus rhamnosus* strain GG modulates intestinal absorption, fecal excretion, and toxicity of aflatoxin B1 in rats. *Applied and environmental microbiology*, 72(11), 7398-7400.
- Gratz, S., Wu, Q. K., El-Nezami, H., Juvonen, R. O., Mykkänen, H., & Turner, P. C. (2007). *Lactobacillus rhamnosus* strain GG reduces aflatoxin B1 transport, metabolism, and toxicity in Caco-2 cells. *Applied and environmental microbiology*, 73(12), 3958-3964.
- Grenier B. y Applegate T. J. (2013) Modulation of intestinal functions following mycotoxin ingestion: meta-analysis of published experiment in animals. *Toxins* 5, 396–430.
- Guan S., Ji C., Zhou T., Li J., Ma Q. y Niu T. (2008) Aflatoxin B<sub>1</sub> degradation by *Stenotrophomonas maltophilia* and other microbes selected using coumarin medium. *Int J Mol Sci* 9, 1489–1503.
- Haghighi H. R., Gong J., Gyles C. L., Hayes M. A., Zhou H., Sanei B. y Sharif S. (2006) Probiotics stimulate production of natural antibodies in chickens. *Clinical and Vaccine Immunology*, 13(9), 975-980.

- Hahn-Hägerdal, B., Karhumaa, K., Larsson, C. U., Gorwa-Grauslund, M., Görgens, J. y Van Zyl, W. H. (2005) Role of cultivation media in the development of yeast strains for large scale industrial use. *Microbial cell factories*, 4(1), 31.
- Hao X., Sun H., Liu W., Li L., Zhao H., Li Y. (2017) Safety evaluation of soybean protein isolate oxidized by a hydroxyl radical-generating system. *Food Chem Toxicol* 103:102–10.
- Hashem M. A. y Mohamed M. H. (2009) Haemato-biochemical and pathological studies on aflatoxicosis and treatment of broiler chicks in Egypt. *Veterinaria Italiana*, 45(2), 323-337.
- Haskard C., Binnion C., Ahokas J. (2000) Factors affecting the sequestration of aflatoxin by *Lactobacillus rhamnosus* strain GG. *Chemico-Biological Interactions* 128, 39–49.
- Hathout A. S., Mohamed S. R., El-Nekeety A. A., Hassan N. S. Aly, S. E. y Abdel-Wahhab M. A. (2011) Ability of *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus reuteri* to protect against oxidative stress in rats fed aflatoxins-contaminated diet. *Toxicol*, 58(2), 179-186.
- He, J., Zhang, K. Y., Chen, D. W., Ding, X. M., Feng, G. D., & Ao, X. (2013). Effects of vitamin E and selenium yeast on growth performance and immune function in ducks fed maize naturally contaminated with aflatoxin B1. *Livestock Science*, 152(2-3), 200-207.
- Heo J. M., Opapeju F. O., Pluske J. R., Kim J. C., Hampson D. J., Nyachoti C. M. (2013) Gastrointestinal health and function in weaned pigs: a review of feeding strategies to control post-weaning diarrhoea without using in-feed antimicrobial compounds. *Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 97, 207-237.
- Higgins S. E., Erf G. F., Higgins J. P., Henderson S. N., Wolfenden A. D., Gaona-Ramirez G y Hargis B. M. (2007) Effect of probiotic treatment in broiler chicks on intestinal macrophage numbers and phagocytosis of *Salmonella enteritidis* by abdominal exudate cells, *Poultry Science*, 86(11), pp. 2315–2321.
- Hoerr F. J., Carlton W. W. y Yagen B. (1981) Mycotoxicosis caused by a single dose of T-2 toxin or diacetoxyscirpenol in broiler chickens. *Veterinary Pathology*, 18: 652-664.
- Hofvendahl K. y Hahn-Hägerdal B. (2000) Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources 1. *Enzyme and Microbial Technology*, 26(2-4): 87–107.
- Honig P. (1974) Principios de Tecnología Azucarera. Segunda Edición. Compañía Editorial Continental. México. 23- 54p.
- Hormisch D., Brost I., Kohring G. W., Giffhorn F., Kroppenstedt R. M., Stackebrandt E., Farber P. y Holzapfel W. H. (2004) *Mycobacterium fluoranthenorans* sp. nov., a fluoranthene and aflatoxin B 1 degrading bacterium from contaminated soil of a former coal gas plant. *Syst Appl Microbiol* 27, 653–660.
- Hussein E. y Selim S. (2018) Efficacy of yeast and multi-strain probiotic alone or in combination on growth performance, carcass traits, blood biochemical constituents, and meat quality of broiler chickens. *Livestock Science*, 216, 153-159.
- Hussein H. S., Brasel J. M. (2001) Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicology* 167(2):101 – 134.
- Huyghebaert G, Ducatelle R, and Van Immerseel F. (2011) An update on alternatives to antimicrobial growth promoters for broilers. *The Veterinary Journal* 187 : 182 – 188.
- Islam M. W., Rahman M. M., Kabir S. M. L., Kamruzzaman S. M. y Islam M. N. (2004) Effects of probiotics supplementation on growth performance and certain haemato-biochemical parameters in broiler chickens. *Bangladesh journal of veterinary medicine*, 2(1), 39-43.
- 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.
- Javadi A., Mirzaei H., Safarmashaei S. y Vahdatpour S. (2012) Effects of probiotic (live and inactive *Saccharomyces cerevisiae*) on meat and intestinal microbial properties of Japanese quails. *African Journal of Biotechnology*, 11(57), 12083-12087.
- Javanainen P. y Linko Y.Y. (1995) Lactic acid fermentation on barley flour without additional nutrients. *Biotechnology Techniques*, 9(8): 543–548.
- Jin B., Yin P., Ma Y. y Zhao L. (2005) Production of lactic acid and fungal biomass by *Rhizopus* fungi from food processing waste streams. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 32(11-12), 678-686.
- John R. P., Nampoothiri K. M. y Pandey A. (2007) Fermentative production of lactic acid from biomass: an overview on process developments and future perspectives. *Applied microbiology and biotechnology*, 74(3), 524-534.

- Józefiak D., Kaczmarek S. y Rutkowski A. (2008) A note on the effects of selected prebiotics on the performance and ileal microbiota of broiler chickens. *Journal of Animal and Feed Sciences* 17 : 392–397.
- Kabak B., Dobson A. D. y Var I. I. L. (2006) Strategies to prevent mycotoxin contamination of food and animal feed: a review. *Critical reviews in food science and nutrition*, 46(8), 593-619.
- Kabir S. M. (2009) The role of probiotics in the poultry industry. *International Journal of Molecular Sciences*, 10(8), 3531-3546.
- Kana J. R., Gbemenou B., Gnonlonfin J., Harvey J., Wainaina J., Wanjuki I., Skilton R. A. y Teguia A. (2013) Mycobiota and toxigenicity profile of *Aspergillus flavus* recovered from food and poultry feed mixtures in Cameroon. *Journal of Animal and Poultry Sciences*, 2(4), pp. 98–107.
- Kaur P. y Satyanarayana T. (2005) Production of cell-bound phytase by *Pichia anomala* in an economical cane molasses medium: optimization using statistical tools. *ProcBiochem* 40: 3095-3102 doi: 10.1016/j.procbio.2005.03.059.
- Khaksefidi A. y Ghoorchi T. (2006) Effect of probiotic on performance and immunocompetence in broiler chicks. *The Journal of Poultry Science*, 43(3), 296-300.
- Kim H., Yoon S. C., Lee T. y Jeong D. (2009) Discriminative cytotoxicity assessment based on various cellular damages. *Toxicol Lett*, 184, 13-7.
- Klich M.A. (2007) *Aspergillus flavus*: The major producer of aflatoxina *Molecular Plant Pathology*, 8 (6) pp. 713-722.
- Klis F., Mol P., Hellingwerf K. y Brul S. (2002) Dynamic of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Reviews* 26: 239–256.
- Kogan G. y Kocher A. (2007) Role of yeast cell wall polysaccharides in pig nutrition and health protection. *Livestock Sci* 109 , 161 – 165.
- Kolossova A, y Stroka J. (2011) Substances for reduction of the contamination of feed by mycotoxins: a review. *World Mycotoxin Journal*, 4(3), 225-256.
- Kumar P., Ali N., Rajkumar, Kumar J., Bansala M. K. y Kumar P. (2015) Effect of different dietary protein level on the growth performance of broiler chickens. *Progressive Research An. Int. J.* 10 (2): 157-15.
- Kwak H., Austic R. E. y Dietert R. R. (1999) Influence of dietary arginine concentration on lymphoid organ growth in chickens. *Poultry Science*, 78(11), 1536-1541.
- Lahtinen S.J., Haskard C.A., Ouwehand A.C., Salminen S.J., Ahokas J.T. (2004) Binding of aflatoxin B1 to cell wall components of *Lactobacillus rhamnosus* strain GG. *Food Additives & Contaminants* 21, 158–164.
- Lawlor P. G. y Lynch P. B. (2001) Mycotoxins in pig feeds-1: Source of toxins, prevention and management of mycotoxicosis. *Irish Veterinary Journal*, 54(3), 117-120.
- Laxminarayan R., Van Boeckel T. y Teillant A. (2015) The economic costs of withdrawing antimicrobial growth promoters from the livestock sector. *OECD. Food, Agriculture and Fisheries Papers*, No. 78, OECD Publishing, Paris.
- Lee K. (2005) A media design program for lactic acid production coupled with extraction by electro dialysis. *Bioresource Technology*. 96:1505-1510.
- Lei X., Piao X., Ru Y., Zhang H., Péron A. y Zhang H. (2015) Effect of *Bacillus amyloliquefaciens*-based direct-fed microbial on performance, nutrient utilization, intestinal morphology and cecal microflora in broiler chickens. *Asian-Australasian Journal of Animal Science*, 28(2): 239–246.
- Li H. L., Zhao P. Y., Lei Y., Hossain M. M. Y Kim I. H. (2015) Phytoncide, phytogetic feed additive as an alternative to conventional antibiotics, improved growth performance and decreased excreta gas emission without adverse effect on meat quality in broiler chickens. *Livestock Science*, 181, 1-6.
- Li X. Y., Liu Z. Q., Chi Z. M. (2008b) Production of phytase by a marine yeast *Kodamaea ohmeri* BG3 in an oats medium: optimization by response surface methodology. *BioresTechnol* 99: 6386–6390.
- Li X., Xu T., Ma X., Guo K., Kai L., Zhao Y., Jia X., Ma Y. (2008a) Optimization of culture conditions for production of cis-epoxysuccinic acid hydrolase using response surface methodology. *BioresTechnol* 99: 5391–5396.
- Lillehoj H., Liu Y., Calsamiglia S., Fernandez-Miyakawa M. E., Chi F., Cravens R. L. y Gay C. G. (2018) Phytochemicals as antibiotic alternatives to promote growth and enhance host health. *Veterinary research*, 49(1), 76.

- Lin Y. C, Chen Y. T, Chen M. J (2018) Lack of mutagenicity, genotoxicity and developmental toxicity in safety assessment tests of *Lactobacillus mali* APS1. PLoS ONE 13(12): e0208881.
- Liu D.L., Yao D.S., Liang Y.Q., Zhou T.H., Song Y.P., Zhao L. y Ma L. (2001) Production, purification, and characterization of an intracellular aflatoxin-detoxifying enzyme from *Armillariella tabescens* (E-20). Food Chem Toxicol 39, 461–466.
- Luo Y., Wang J., Liu B., Wang Z., Yuan Y. y Yue T. (2015) Effect of yeast cell morphology, cell wall physical structure and chemical composition on patulin adsorption. PloS one, 10(8), e0136045.
- Luzhna L., Kathiria P., Kovalchuk O. (2013) Micronuclei in genotoxicity assessment: from genetics to epigenetics and beyond. Front Genet; 4(131).
- Madrigal-Santillán E., Madrigal-Bujaidar E., Márquez-Márquez R. y Reyes A. (2006) Antigenotoxic effect of *Saccharomyces cerevisiae* on the damage produced in mice fed with aflatoxin B<sub>1</sub> contaminated corn. Food and Chemical Toxicology, 44(12), 2058-2063.
- Magnoli A. P., Monge M. P., Miazzo R. D., Cavaglieri L. R., Magnoli C. E., Merkis C. I., Cristofolini A. L., Dalcerro A. M. y Chiacchiera S. M. (2011) Effect of low levels of aflatoxin B<sub>1</sub> on performance, biochemical parameters, and aflatoxin B<sub>1</sub> in broiler liver tissues in the presence of monensin and sodium bentonite. Poultry Science. 90(1), pp. 48–58.
- Magnoli A. P., Rodriguez M. C., Pereyra M. G., Poloni V. L., Peralta M. F., Nilson A. J. y Cavaglieri, L. R. (2017) Use of yeast (*Pichia kudriavzevii*) as a novel feed additive to ameliorate the effects of aflatoxin b1 on broiler chicken performance. Mycotoxin research, 33(4), 273-283.
- Magnoli A., Cavaglieri L., Magnoli C., Monge J., Miazzo R., Peralta M. y Maris Chiacchiera S. (2008) Bentonite performance on broiler chickens fed with diets containing natural levels of aflatoxin B<sub>1</sub>. Revista Brasileira De Medicina Veterinaria, 30(1), 55-60.
- Magnoli C., Chiacchiera S., Miazzo R., Palacio G., Angeletti A., Hallak C. y Dalcerro A. (2002). The mycoflora and toxicity of feedstuffs from a production plant in Córdoba, Argentina. Mycotoxin Research, 18:7–22.
- Manafi M., Umakantha M., Ali M. N. y Swamy H. N. (2012) Study of the combination effects of aflatoxin and T-2 toxin on performance parameters and internal organs of commercial broilers. Global Veterinaria, 8(4), 393-396.
- Marin S., Ramos A.J., Cano-Sancho C., Sanchis V. (2013) Mycotoxins: Occurrence, toxicology, and exposure assessment. Food Chem. Toxicol. 60, 218-237.
- McCormick S. P. (2013) Microbial detoxification of mycotoxins. J. Chem. Ecol., 39, 907 – 918.
- Megalla S. E. y Hafez A. H. (1982) Detoxification of aflatoxin B<sub>1</sub> by acidogenous yoghurt. Mycopathologia 77:89–91.
- Megalla S. E. y Mohran M. A. (1984) Fate of aflatoxin B<sub>1</sub> in fermented dairy products. Mycopathologia 88:27–29.
- Mendieta C. R., Gómez G. V., Del Río J. C. G., Cuevas A. C., Arce J. M. y Ávila E. G. (2017) Effect of the addition of *Saccharomyces cerevisiae* yeast cell walls to diets with mycotoxins on the performance and immune responses of broilers. The Journal of Poultry Science, 0170019.
- Meng X., Stanton C., Fitzgerald G., Daly C. y Ross R. (2008) Anhydrobiotics: The challenges of drying probiotic cultures. Food Chemistry, 106(4): 1406–1416.
- Mennecozzi M., Landesmann B., Palosaari T., Harris G. y Whelan M. (2015) Sex differences in liver toxicity—do female and male human primary hepatocytes react differently to toxicants in vitro?. PLoS one, 10(4), e0122786.
- Meyer B. N., Ferrigni N. R., Putnam J. E., Jacobsen L. B., Nichols D. J. y McLaughlin J. L. (1982) Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. Planta medica, 45(05), 31-34.
- Miazzo R., Peralta M. F., Magnoli C., Salvano M., Ferrero S., Chiacchiera S. M., Carvalho E. C. Q., Rosa C. A. R. y Dalcerro A (2005) Efficacy of sodium bentonite as a detoxifier of broiler feed contaminated with aflatoxin and fumonisin. Poultry Science, 84(1), pp. 1–8.
- Michell A. J. y Scurfield G. (1970) An assessment of infrared spectra as indicators of fungal cell wall composition. Aust J Biol Sci 23:345–360.
- Mishra V. y Prasad D. (2005) Application of in vitro methods for selection of *Lactobacillus casei* strains as potential probiotics. International Journal of Food Microbiology, 103(1): 109–115.
- Mohammadgheri N., Najafi R. y Najafi G. (2016) Effects of dietary supplementation of organic acids and phytase on performance and intestinal histomorphology of broilers. In Veterinary Research Forum (Vol. 7, No. 3, p. 189). Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran.

- Monge M. del P., Magnoli C. E. y Chiacchiera S. M. (2012) Survey of *Aspergillus* and *Fusarium* species and their mycotoxins in raw materials and poultry feeds from Córdoba, Argentina., *Mycotoxin Research*. 28(2), pp. 111–122.
- Montelongo J.L., Chassy B.M. y Mccord J.D. (1993) *Lactobacillus salivarius* for conversion of soy molasses into lactic acid. *Journal of Food Science*, 58(4): 863–866.
- Montgomery D. C. (2001) Design and analysis of experiments. Marcel Dekker, New York.
- Mookiah S., Sieo C. C., Ramasamy K., Abdullah N. y Ho Y. W. (2014) Effects of dietary prebiotics, probiotic and synbiotics on performance, caecal bacterial populations and caecal fermentation concentrations of broiler chickens. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(2), 341-348.
- Morales-López R., Auclair E., Garcia F., Esteve-Garcia E., y Brufau J. (2009) Use of yeast cell walls;  $\beta$ -1, 3/1, 6-glucans; and mannoproteins in broiler chicken diets. *Poultry science*, 88(3), 601-607.
- Morgan C., Herman N., White P., Vesey G. (2006) Preservation of micro-organisms by drying: A review. *Journal of Microbiological Methods*, 66: 183-193.
- Motomura M., Toyomasu T., Mizuno K. y Shinozawa T. (2003) Purification and characterization of an aflatoxin degradation enzyme from *Pleurotus ostreatus*. *Microbiol Res* 158, 237–242.
- Muller J.A., Ross R.P., Fitzgerald G.F. y Stanton C. (2009) Manufacture of probiotic bacteria. pp. 725–759, in: D. Charalampopoulos and R.A. Rastall (eds.). *Prebiotics and probiotics science and technology*. Vol. 2. Springer Science + Business Media.
- Naruemon M., Romanee S., Cheunjit P., Xiao H., McLandsborough L. A. y Pawadee M. (2013) Influence of additives on *Saccharomyces cerevisiae*  $\beta$ -glucan production. *International Food Research Journal*, 20(4).
- National Research Council - NRC. (1994) Nutrient requirements of chickens. In: *Nutrient Requirements of Poultry*. 9 th rev. ed., National Academy Press, Washington.
- Niderkorn V., Morgavi D. P., Pujos E., Tissandier A. y Boudra H. (2007) Screening of fermentative bacteria for their ability to bind and biotransform deoxynivalenol, zearalenone and fumonisins in an in vitro simulated corn silage model. *Food additives and contaminants*, 24(4), 406-415.
- Novel D. J., Ng'Ambi J. W., Norris D. y Mbajjorgu C. A. (2009) Effect of different feed restriction regimes during the starter stage on productivity and carcass characteristics of male and female Ross 308 broiler chickens. *International Journal of Poultry Science*, 8(1), 35-39.
- Novoa U., José R., Díaz G. J. (2006) Aflatoxinas: mecanismo de toxicidad en la etiología de cáncer hepático celular. *Rev Fac Med Univ Nac Colombia*. 54:2.
- Oğuz H, Hadimli HH, Kurtoglu V, Ergani Ş O (2003) Evaluation of humoral immunity of broilers during chronic aflatoxin (50 and 100 ppb) and clinoptilolite exposure. *Rev Med Vet B Aires* 154:483 – 486.
- Oğuz H, Kececi T, Birdane YO, Onder F, Kurtoglu V (2000) Effect of clinoptilolite on serum biochemical and haematological characters of broiler chickens during experimental aflatoxicosis. *Res Vet Sci* 69:89 – 93.
- Oğuz H. (2011) A review from experimental trials on detoxification of aflatoxin in poultry feed. *Eurasian J. Vet. Sci.* 27:1–12.
- Oguz H. y Parlat, S., 2005. Effects of dietary mannanoli-gosaccharide on performance of Japanese quail affected by a fl atoxicosis. *S. Afr. J. Anim. Sci.*, 34 , 144 – 148.
- Oğuz H., y Kurtoglu V. (2000) Effect of clinoptilolite on fattening performance of broiler chickens during experimental aflatoxicosis. *Br. Poult. Sci.* 41:512–517.
- Ohland C. L. y MacNaughton W. K. (2010) Probiotic bacteria and intestinal epithelial barrier function. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 298(6): G807–G819.
- Oláh I, Nagy N. y Vervelde L. (2013) Structure of the avian lymphoid system. *Avian Immunology: Second Edition*, pp. 11–44.
- Oliveira C. A. F., Ogido R. R. D., Ledoux E., George B. C., Rottinghaus T. A., Reis y Edlayne G. (2007) The quality of eggs Japanese quail, *Coturnix japonica*, fed rations containing aflatoxin B1 and fumonisin B1. *Poult. Sci.* 44:29–33.
- Ortatatli M. y Oğuz H. (2001) Ameliorative effects of dietary clinoptilolite on pathological changes in broiler chickens during aflatoxicosis. *Res Vet Sci* 71:59 – 66.
- Ortatatli M., Oguz H., Hatipoglu F. y Karaman M. (2005) Evaluation of pathological changes in broilers during chronic aflatoxin (50 and 100 ppb) and clinoptilolite exposure. *Research in Veterinary Science*, 78: 61–68.

- Oyaas J., Storrø I. y Levine D. (1996) Uptake of lactose and continuous lactic acid fermentation by entrapped non-growing *Lactobacillus helveticus* in whey permeate. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 46(3): 240–249.
- Page S. y Gautier P. (2012) Use of antimicrobial agents in livestock. *Rev. Sci. Tech. Int. Off. Epizoot.* 31, 145–188.
- Palumbo J. D., Keeffe T. L. y Abbas H. K. (2008) Microbial interactions with mycotoxigenic fungi and mycotoxins. *Toxin Rev.*, 27, 261 – 285.
- Pandey I. y Chauhan S. S. (2007) Studies on production performance and toxin residues in tissues and eggs of layer chickens fed on diets with various concentrations of aflatoxin AFB<sub>1</sub>. *British Poultry Science* 48, 713–723.
- Paryad A. y Mahmoudi M. (2008) Effect of different levels of supplemental yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) on performance, blood constituents and carcass characteristics of broiler chicks. *African Journal of Agricultural Research*, 3(12), 835-842.
- Pedersen M. B., Gaudu P., Lechardeur D., Petit M. A. y Gruss A. (2012) Aerobic respiration metabolism in lactic acid bacteria and uses in biotechnology. *Annual review of food science and technology*, 3, 37-58.
- Pelicano E. R. L., Souza P. A., Souza H. B. A., Oba A., Nokus E. A., Kodawara L. M., Lima T. M. A. (2003) Effect of difference probiotics on broiler carcass and meat quality. *Rev. Bras. Cienc. Avic.* 5, 1–13.
- Perrone G. y Gallo A. (2017) *Aspergillus* species and their associated mycotoxins. In *Mycotoxigenic Fungi* (pp. 33-49). Humana Press, New York, NY.
- Petchkongkaew A., Taillandier P., Gasaluck P. y Lebrihi A. (2008) Isolation of *Bacillus* spp. from Thai fermented soybean (Thua-nao): screening for aflatoxin B<sub>1</sub> and ochratoxin A detoxification. *J Appl Microbiol* 104, 1495–1502.
- Peterson L.W. y Artis D. (2014) Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis. *Nature Reviews in Immunology*, 14(3): 141–153.
- Pfliegler W. P., Pusztahelyi T. y Pócsi I. (2015) Mycotoxins prevention and decontamination by yeasts. *Journal of basic microbiology*, 55(7), 805-818.
- Pizzolitto R. P., Armando M. R., Combina M., Cavaglieri L. R. (2012) Evaluation of *Saccharomyces cerevisiae* strains as probiotic agent with a aflatoxin B<sub>1</sub> adsorption ability for use in poultry feedstuffs. *J. Environ. Sci. Health B*, 47, 933 – 941.
- Pizzolitto R. P., Armando M. R., Salvano M. A., Dalcerro A. M. y Rosa C. A. (2013) Evaluation of *Saccharomyces cerevisiae* as an antiaflatoxicogenic agent in broiler feedstuffs. *Poultry science*, 92(6), 1655-1663.
- Plackett R. L. y Burman J. P. (1946) The design of optimum multifactorial experiments. *Biometrika* 305-325.
- Raju M. V. L. N. y Devegowda G. (2002) Esterified gluco-mannan in broiler chicken diets-contaminated with aflatoxin, ochratoxin and T-2 toxin: evaluation of its binding ability (*in vitro*) and efficacy as immunomodulator. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.*, 15, 1051 – 1056.
- Raju, M. V. L. N. y Devegowda G. (2000). Influence of esterified-glucomannan on performance and organ morphology, serum biochemistry and haematology in broilers exposed to individual and combined mycotoxicosis (aflatoxin, ochratoxin and T-2 toxin). *British poultry science*, 41(5), 640-650.
- Rao R. S., Prakasham R. S., Prasad K. K., Rajesham S. S. P. N., Sarma P. N. y Rao L. V. (2004) Xylitol production by *Candida* sp.: parameter optimization using Taguchi approach. *ProcBiochem* 39: 951-956.
- Rauber R. H., Dilkin P., Giacomini L. Z., de Almeida C. A. y Mallmann C. A. (2007) Performance of turkey poult fed different doses of aflatoxins in the diet. *Poultry Science*, 86(8), 1620-1624.
- Rawal S., Kim J. E. y Coulombe Jr. R. (2010) Aflatoxin B<sub>1</sub> in poultry: toxicology, metabolism and prevention. *Research in Veterinary Science* 89: 325-331.
- Rearte D. (2011) Situación actual y prospectiva de la ganadería argentina, un enfoque regional. INTA, Argentina. ISSN 1022-1301. Asociación Latinoamericana de Producción Animal. Vol 19, número 3-4: 46-49
- Ren J., Lin W. T., Shen Y. J., Wang J. F., Luo X. C. y Xie M. Q. (2008) Optimization of fermentation media for nitrite oxidizing bacteria using sequential statistical design. *Bioresource Technology*, 99(17), 7923-7927.

- Repetto G., del Peso A. y Zurita J. L. (2008) Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nat Protoc*, 3, 1125-31.
- Rezaei-pour V., Fononi H., Irani M. (2012) Effects of dietary L-threonine and *Saccharomyces cerevisiae* on performance, intestinal morphology and immune response of broiler chickens. *SA J Anim Sci*; 42: 266-273.
- Rezaiki L., Cesselin B., Yamamoto Y., Vido K., Van West E., Gaudu P. y Gruss A. (2004) Respiration metabolism reduces oxidative and acid stress to improve long - term survival of *Lactococcus lactis*. *Molecular microbiology*, 53(5), 1331-1342.
- Ringot D., Benoit L., Chaplain K., Bonhoure J., Auclair E. y Larondelle Y. (2007) In vitro biosorption of ochratoxin A on the yeast industry by-products: comparison of isotherm models. *Biores Technol* 98, 1812–1821.
- Rivas B, Moldes AB, Dominguez JM, Parajo JC. (2004) Development of culture medium containing spent yeast cells of *Debaromyces hansenii* and corn steep liquor for lactic acid production with *Lactobacillus rhamnosus*. *Int J Food Microbiol*, 97:93-98.
- Rodrigues L., Teixeira J. y Oliveira R. (2006) Low-cost fermentative medium for biosurfactant production by probiotic bacteria. *Biochemical Engineering Journal*, 32(3): 135–142.
- Ronquillo M. G. y Hernandez J. C. A. (2017) Antibiotic and synthetic growth promoters in animal diets: review of impact and analytical methods. *Food Control*, 72, 255-267.
- Rosmini M. R., Sequeira G. J. y Frizzo L. (2004) Probiotic production for meat animals: importance of using indigenous intestinal microbiota. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 3, 181-191.
- Saladino F., Posarelli E., Luz C., Luciano F. B., Rodriguez-Estrada M. T., Mañes J. y Meca G. (2018) Influence of probiotic microorganisms on aflatoxins B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> bioaccessibility evaluated with a simulated gastrointestinal digestion. *Journal of Food Composition and Analysis*, 68, 128-132.
- Salarmoini M. y Fooladi M. H. (2010) Efficacy of *Lactobacillus acidophilus* as probiotic to improve broiler chick's performance. *Journal of Agricultural Science & Technology*, 13, 165-172.
- Salminen S., von Wright A., Morelli L., Marteau P., Brassarte D., de Vos W. M., Fondeng R., Saxelin M. (1998) Demonstration of safety of probiotics — a review. *Int J Food Microbiol* 44, 93 – 106.
- Samli H. E., Senkoylu N., Koc F., Kanter M. y Agma A. (2007) Effects of *Enterococcus faecium* and dried whey on broiler performance, gut histomorphology and intestinal microbiota. *Archives of animal nutrition*, 61(1), 42-49.
- Santin E., Paulillo A., Nakagui L., Alessi A. y Maiorka A. (2006) Evaluation of yeast cell wall on the performance of broilers fed diets with or without mycotoxins. *Revista Brasileira de Ciência Avícola*, 8: 221-225.
- Shah K., McCormack C. E. y Bradbury N. A. (2013) Do you know the sex of your cells?. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 306(1), C3-C18.
- Shanahan F. (2012) A commentary on the safety of probiotics. *Gastroenterology Clinics of North America*, 41(4): 869.
- Sharma D. C. y Satyanarayana T. (2006) A marked enhancement in the production of a highly alkaline and thermostable pectinase by *Bacillus pumilus* dcsr1 in submerged fermentation by using statistical methods. *Biores Technol* 97: 727-33.
- 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.
- Simon O., Vahjen W. y Scharek L. (2005) Microorganisms as feed additives-probiotics. *Advances in pork Production*, 16, 161-167.
- Singh P., Medronho B., dos Santos T., Nunes-Correia I., Granja P., Miguel M. G. y Lindman B. (2018) On the viability, cytotoxicity and stability of probiotic bacteria entrapped in cellulose-based particles. *Food Hydrocolloids*, 82, 457-465.
- Śliżewska K. y Smulikowska S. (2011) Detoxification of aflatoxin B<sub>1</sub> and change in microbiota pattern by probiotic *in vitro* fermentation of broiler feed. *J. Anim. Feed Sci.*, 20, 300 – 309.
- Smiley R. D. y Draughon F. A. (2000) Preliminary evidence that degradation of aflatoxin B<sub>1</sub> *Flavobacterium aurantiacum* is enzymatic. *J Food Prot* 63, 415–418.
- Srivastava S. B., Niwas R., Singh D. P. y Bisen B. (2013) Impact of herbal based diets on production efficiency of broiler. *The Bioscan*. 8(1): 119-122.
- Sur E. y Celik I. (2003) Effects of aflatoxin B<sub>1</sub> on the development of the bursa of Fabricius and blood lymphocyte acid phosphatase of the chicken. *Br Poult Sci* 44:558 – 566.

- Taylor W. J. y Draughon F. A. (2001) *Nannocystis exedens*: A potential biocompetitive agent against *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. *Journal of food protection*, 64(7), 1030-1034.
- Teniola O.D., Addo P.A., Brost I.M., Färber P., Jany K.D., Alberts J.F. y Holzapfel W.H. (2005) Degradation of aflatoxin B<sub>1</sub> by cell-free extracts of *Rhodococcus erythropolis* and *Mycobacterium fluoranthenivorans* sp. nov. DSM44556 T. *International journal of food microbiology*, 105(2), 111-117.
- Tennant B. C. y Center S. A. (2008) Hepatic Function. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*, pp. 379–412.
- Thacker P.A. (2013) Alternatives to antibiotics as growth promoters for use in swine production: a review *Journal of Animal Science and Biotechnology* 4, 35-46.
- Timmer J. y Kromkamp J. (1994) Efficiency of lactic acid production by *Lactobacillus helveticus* in a membrane cell recycle reactor. *FEMS Microbiology Reviews*, 14(1): 29–38.
- Toghyani M., Gheisari A., Ghalamkari G. y Eghbalsaied S. (2011) Evaluation of cinnamon and garlic as antibiotic growth promoter substitutions on performance, immune responses, serum biochemical and haematological parameters in broiler chicks. *Livestock Science*, 138(1-3), 167-173.
- Triglia D., Sherard Braa S., Yonan C., Naughton G. K. (1991) Cytotoxicity testing using neutral red and mtt assays on a three- dimensional human skin substrate. *Toxicol In Vitro*, 5, 573-8.
- Trucksess M. W., Stack M. E., Nesheim S., Albert, R. y Romer T. (1994) Multifunctional column coupled with liquid chromatography for determination of aflatoxins B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> and G<sub>2</sub> in corn, almonds, Brazil nuts, peanuts, and pistachio nuts: Collaborative study. *J AOAC Int*, 77, 1512-1521.
- Tseng W. T., Shih T. W., Liu S. H., Pan T. M. (2015) Safety and mutagenicity evaluation of Vigiis 101 powder made from *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* NTU 101. *Regul Toxicol Pharmacol*: 71(2):148–57.
- Turner J.L., Dritz P.S.S. y Minton J.E. (2001) Review: Alternatives to conventional antimicrobials in swine diets. *Prof. Anim. Sci.* 17:217-226.
- Turner P. C., Wu Q. K., Piekkola S., Gratz S., Mykkänen H. y El-Nezami H. (2008) *Lactobacillus rhamnosus* strain GG restores alkaline phosphatase activity in differentiating Caco-2 cells dosed with the potent mycotoxin deoxynivalenol. *Food and chemical toxicology*, 46(6), 2118-2123.
- Vanhoutte I., Audenaert K. y De Gelder L. (2016) Biodegradation of mycotoxins: Tales from known and unexplored worlds. *Frontiers in microbiology*, 7, 561.
- Vekiru E., Fruhauf S., Rodrigues I., Ottner F., Krska R., Schatzmayr G. y Bermudez A. J. (2015) *In vitro* binding assessment and *in vivo* efficacy of several adsorbents against aflatoxin B<sub>1</sub>. *World Mycotoxin Journal*, 8(4), 477-488.
- Vila-Donat P., Marín S., Sanchis V., y Ramos A. J. (2018) A review of the mycotoxin adsorbing agents, with an emphasis on their multi-binding capacity, for animal feed decontamination. *Food and chemical toxicology*.
- Wang X., Yin M., Xiao Z., Ma C., Lin Z., Wang P. G., Xu P. (2007) Production of uridine 50 monophosphate by *Corynebacterium ammoniagenes* ATCC 6872 using a statistically improved biocatalytic process. *Appl Microbiol Biotechnol* 76: 321–328 doi: 10.1007/s00253-007-1013-x.
- Wasewar K. L., Yawalkar A. A., Moulijn J. A. y Pangarkar V. G. (2004) Fermentation of glucose to lactic acid coupled with reactive extraction: a review. *Industrial & engineering chemistry research*, 43(19), 5969-5982.
- Watanabe M., van der Veen S., Nakajima H. y Abee T. (2012) Effect of respiration and manganese on oxidative stress resistance of *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *Microbiology*, 158(1), 293-300.
- Waxman D. J. y Holloway M. G. (2009) Centennial perspective: sex differences in the expression of hepatic drug metabolizing enzymes. *Molecular pharmacology*.
- Wee Y., Kim J. y Ryu H. (2006) Biotechnological production of lactic acid and its recent applications. *Food Technology and Biotechnology* 44(2): 163-172.
- WHO (2011). WHO list of Critically Important Antimicrobials (CIA).
- WHO (2014a). Draft global action plan on antimicrobial resistance ([www.who.int/drugresistance/es](http://www.who.int/drugresistance/es)).
- WHO (2014b). Ministerial Conference on Antibiotic Resistance - Joining Forces for Future Health. In WHO, (The Hague, The Netherlands).

- Xiaodong W., Xuan G. y Rakshit S. (1997) Direct fermentative production of lactic acid on cassava and other starch substrates. *Biotechnology Letters*, 19(9): 841–843.
- Xu C. P., Kim S. W., Hwang H. J., Yun J. W. (2002) Application of statistically based experimental designs for the optimization of exo-polysaccharide production by *Cordyceps militaris* NG3. *BiotechnolApplBiochem* 36: 127-131doi: 10.1111/j.1472-765X.2010.02987.x.
- Xu Y. Q., Guo Y. W., Shi B. L., Yan S. M. y Guo X. Y. (2018) Dietary arginine supplementation enhances the growth performance and immune status of broiler chickens. *Livestock Science*, 209, 8-13.
- Yarru L. P., Settivari R. S., Gowda N. K. S., Antoniou E., Ledoux D. R., Rottinghaus G. E. (2009) Effects of turmeric (*Curcuma longa*) on the expression of hepatic genes associated with biotransformation, antioxidante, and immune system in broiler chicks fed aflatoxin. *Poult. Sci.* 88, 2620–2627.
- Yiannikouris A., André G., Poughon L., François J. (2006) Chemical and conformational study of the interactions involved in mycotoxin complexation with beta- D -glucans. *Biomacromolecules*, 7, 1147 – 1155.
- Yiannikouris A., Poughon L., Cameleyre X., Dussap C. G., François J., Bertin G. y Jouany J. P. (2003) A novel technique to evaluate interactions between *Saccharomyces cerevisiae* cell wall and mycotoxins: application to zearalenone. *Biotechnology letters*, 25 (10), 783-789.
- 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 -D-Glucans with Zearalenone. *Journal of Food Protection*, 67: 2741-2746.
- Yulistiani R., Praseptiangga D., Raharjo D. y Shirakawa T. (2017) Prevalence of Antibiotic-resistance Enterobacteriaceae strains Isolated from Chicken Meat at Traditional Markets in Surabaya, Indonesia. In *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering* (Vol. 193, No. 1, p. 012007). IOP Publishing.
- Yunus A. W.; Razzazi-Fazeli E.; Bohm J. (2011) Aflatoxin B<sub>1</sub> in affecting broiler's performance, immunity, and gastrointestinal tract: A review of history and contemporary issues. *Toxins*, 3, 566–590.
- Zhang S. Z, Lipsky M. M, Trump B. F, Hsu I. C. (1990) Neutral red (NR) assay for cell viability and xenobiotic-induced cytotoxicity in primary cultures of human and rat hepatocytes. *Cell Biology and Toxicology*, 6, 219-34.
- Zhang Z. y Kim I. (2014) Effects of multistrain probiotics on growth performance, apparent ileal nutrient digestibility, blood characteristics, cecal microbial shedding, and excreta odor contents in broilers. *Poultry Science*, 93(2): 364–370.
- Zjalic S., Reverberi M., Ricelli A., Mario Granito V., Fanelli C. y Adele Fabbri A. (2006) *Trametes versicolor*: a possible tool for aflatoxin control. *Int J Food Microbiol* 107, 243–249.

***Anexo***

---

## ANEXO

**81/12**

Por la presente se deja expresa constancia que **Lilia Cavaglieri**, de la Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales, UNRC, ha presentado ante este Comité de Ética de la Investigación en animales de la UNRC, para su evaluación, el Proyecto de Investigación denominado **“Producción biotecnológica de aditivos alimentarios decontaminantes de micotoxinas/ probióticos y su aplicación innovadora en la alimentación animal”**

**Directora de Proyecto: Dra. Lilia Cavaglieri**

expediente **81/12**, con el siguiente **Resultado** de la Evaluación del Comité:

**Aprobado**

Se expide la presente constancia a los fines que hubiere lugar en Río Cuarto a los 29 días del mes de Marzo de 2013.

**Coordinador CoEdI**  
**Dr. Héctor Fernando Gauna**

**Secretario CoEdI**  
**Dr. Fernando Mañas**

Comité de Ética de la Investigación – Rectorado UNRC

Enlace rutas 8 y 36 Km 601 – Río Cuarto – Pcia. de Córdoba - Argentina

(<http://www.unrc.edu.ar/unrc/coedi.html>)

Research Article

Volume 8 Issue 1 - January 2018  
DOI: 10.19080/AIBM.2018.08.555727

Adv Biotech & Micro  
Copyright © All rights are reserved by Lilia Cavaglieri

# Optimization and Production of Probiotic and Antimycotoxin Yeast Biomass Using Bioethanol Industry Waste *via* Response Surface Methodology



**Analia S Fochesato<sup>1,2</sup>, Miguel A Galvagno<sup>3</sup>, Cecilia Dog<sup>1,2</sup>, Patricia Cerrutti<sup>3</sup>, María L González Pereyra<sup>1,2</sup>, Marcelo Flores<sup>4</sup> and Cavaglieri L<sup>1,2\*</sup>**

<sup>1</sup>Department of Microbiology and Immunology, National University of Río Cuarto, Argentina

<sup>2</sup>National Council of Scientific and Technical Research (CONICET), Argentina

<sup>3</sup>University of Buenos Aires, Argentina

<sup>4</sup>Department of Industries, National University of Río Cuarto, Argentina

**Submission:** December 12, 2017; **Published:** January 19, 2018

**\*Corresponding author:** Lilia Cavaglieri, Department of Microbiology and Immunology, National University of Río Cuarto, Route 36km 601, 5800 Río Cuarto, Córdoba, Argentina, Fax: 54-358-4676231; Tel: 54-358-4676231; Email: [lcavaglieri@exa.unrc.edu.ar](mailto:lcavaglieri@exa.unrc.edu.ar)

## Abstract

*Saccharomyces cerevisiae* RC016 presents probiotic and mycotoxin adsorbent properties for use as feed additive. The improvement of *S. cerevisiae* RC016 biomass production using an agro-industrial waste such as Dried Distillers' Grains and Solubles (DDGs) that pollute the environment can contribute to sustainable development of the process and reduce the costs of large-scale production. In order to avoid the obstruction of the fermentor's stirring mechanism with solid particles a novel pretreatment of DDGs was conducted to concentrate carbon sources levels. The design of experiments were performed using four factor-three-level Box-Behnken design (carbon source concentration, nitrogen source concentration, yeast extract concentration and incubation time) coupled with response surface methodology to evaluate the interaction between two factors in order to determine the optimum process conditions. A quadratic model was suggested for the prediction of biomass production. The F-value and p-value of the model indicated that it was statistically significant at 95 percent confidence interval. In addition, R<sup>2</sup> value of the model indicated an acceptable accuracy. The results were validated at bioreactor level showing that the specific growth rate on the optimized medium (0.34h<sup>-1</sup>) increased 112.5% compared to the initial non-optimized medium (0.16h<sup>-1</sup>), the duplication time showed a decrease of 52.9%. Optimization enabled productivity (0.451gL<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup>) nine times higher than the initial one (0.062gL<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup>), thus 65% more biomass was obtained (5.20gL<sup>-1</sup>). The use of biomass DDGse derived from bioethanol production promotes the sustainable and green way of biomass production.

**Keywords:** Biomass production; Bioethanol industry waste; distillers' grains and solubles; *Saccharomyces cerevisiae*

## Introduction

Distillers dried grains with solubles (DDGs) is the main co-product of ethanol production. It is a waste product from this industry, commonly used as a low-cost animal feed. After conversion of grain starch to ethanol during fermentation, there is an increase of all nutrients than about three times more protein, fat, vitamins, minerals and fibre. Its utilization as a feed ingredient is well documented as both, energy and a protein supplement (U.S. Grains Council).

Application of agro-industrial waste and co-products in bioprocesses provides an alternative way to replace the refined and costly raw materials. In addition, the bulk use of agro-industrial waste residues will help to solve environmental issues. Microbial biomass production by using DDGs is an

alternative of great interest for reuse of this industrial by-product. It can serve as a protein concentrate as well as energy source for microbial growth. Energy provided by DDGs is obtained from oil since starch is removed from grains in the ethanol production process. One of the main obstructions in the large-scale production of yeasts and their products is the cost of the raw materials. Therefore, efficient and profitable factory-scale processes need to obtain the highest biomass yield with the minimal cost. Economic evaluation of the yeast production process has suggested that the major contributor to the overall cost is the cost of carbon source. Thus, it is desirable to produce yeast biomass from alternative low-cost carbon sources derived from other industries [1].

Probiotics are live microorganisms which when administered in adequate amounts confer a health benefit on the host [2]. They exert beneficial effects on the host by providing nutrients and enzymes that contribute to digestion, inhibiting pathogenic microorganisms, enhancing growth and immune responses [3,4]. *Saccharomyces cerevisiae* RC016 is a probiotic strain isolated from pig intestine that is able to adsorb several mycotoxins such as aflatoxin B1, zearalenone, fumonisin B1 and ochratoxin A, survive under gastrointestinal conditions, enhance animal weight gain and performance and promote beneficial properties to the host. It is also considered a generally regarded as safe (GRAS) microorganism and has shown absence of genotoxicity and cytotoxicity *in vivo* [5-7]. Therefore, its application as a feed additive intended for production animals is very promising and entails minimal risk.

Feed additives' industry requires standardized processes to produce large amounts of the selected yeasts to obtain high quality reproducible products to ensure biological effect. To achieve high yeast yields, it is a prerequisite to design a proper production medium in an efficient fermentation process. Therefore, the viability of a biotechnological process includes the strategic optimization of a culture medium using low cost raw materials. It is important to select key parameters from a large number of factors and also their interactions. Several statistical experimental designs have been used for optimizing fermentation variables [8,9]. Plackett- Burman design [10] is a well-established and widely used statistical model for screening and selecting critical culture variables, while response surface methodology (RSM) provides important information regarding the optimum level of each variable along with its interactions with other variables and their effects on product yield [11,12]. The aim of the present work was to study the culture conditions for probiotic-mycotoxin adsorbent *S. cerevisiae* RC0016 biomass production using DDGs as low-cost agro-industrial waste.

### Materials and Methods

#### Yeast strain and cultural conditions

*Saccharomyces cerevisiae* RC016 was isolated from pig intestine and deposited in collection centre of the Universidad Nacional de Río Cuarto, Argentina. Stock cultures were maintained at -80 °C in 30% (v/v) glycerol. Working cultures were prepared from frozen stocks by two transfers in yeast extract-peptone-dextrose (YPD) broth (5g yeast extract, 5g peptone, 40g dextrose, 1000ml water) and incubation at 28 °C for 24h on an orbital shaker (180rpm). Morphological and molecular characteristics of this strain were informed by Armando et al. [11].

#### Bioethanol industry waste composition and pretreatment

The DDGs (used as carbon source) centesimal composition is informed in Table 1. DDGs was obtained from a local bioethanol

producing plant. In order to avoid the obstruction of the fermentor's stirring mechanism with solid DDGs particles and concentrate the level of carbon sources, a DDGs' extract (DDGse) was prepared by adding water (300ml+75g DDGS) to obtain a 25% DDGse that was left at fluent steam for 20min and then filtered. The extract was then autoclaved at 121 °C, 1atm for 15min. Adequate volumes of this extract were used to formulate culture media at 14, 21 and 28% (Plackett-Burman design) and at 10, 20 and 30% (Box-Behnken design).

**Table 1:** Dried distillers' grains and solubles (DDGs) centesimal composition.

Dried Distillers' Grains And Solubles (Ddgs)	
Components	Percentage
Dry matter	35.97
Water	64.03
Total protein	10.52
Total fats	4
Total fibre	3.08
Neutral detergent fibre (NDF)	3.76
Acid detergent fibre (ADF)	8.98
Starch	1.79
Sulfur	0.23
Phosphorus	0.32
Ashes	2.28

#### Culture conditions and experimental designs for biomass production

Culture medium was designed using the following factors: DDGse as carbon source, urea as nitrogen source, and YE as vitamin supply. *Saccharomyces cerevisiae* biomass production was performed in shaken Erlenmeyer flasks and then validated in an aerated-agitated fermentor. For Erlenmeyer flasks' inoculation, a loopful of a *S. cerevisiae* RC016 culture maintained at 4 °C on an YPD agar slant was transferred to 10ml YPD broth (pH 4.5-5.5) contained in 100ml Erlenmeyer flasks (flask volume to medium volume ratio was 10:1) and incubated at 28±1 °C for 24h at 180rpm in an orbital shaker.

For the fermentor assay, the culture media optimized in Erlenmeyer flasks was validated by carrying out batch fermentations in an aerated-mechanically stirred 5L BioFlo™ 2000 fermenter (New Brunswick Scientific Co., Inc, Enfield, CT, USA) equipped with pH, temperature and dissolved oxygen concentration sensors. The pH was maintained between 4.5 and 5.5 units by adding 18N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> or 20% w,v-1 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Dissolved oxygen concentration at the beginning of the experiment was 100% saturation. Foam production was controlled by the addition of Antifoam 289 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) defoamer. For both, flasks and fermentor assays, aliquots of 3mL culture were withdrawn for kinetic and productive parameter determinations and growth curves were constructed.

**Table 2:** Levels of factors tested by Plackett-Burman Design for the screening of significant variables affecting *Saccharomyces cerevisiae* RC016 biomass production.

Factors	Levels		
	-1	0	1
DDGse* (%)	14	21	28
Urea (%)	0	0.25	0.5
YE** (%)	0.5	0.75	1
Time (h)	1	7	13

\*DDGse: Dried distillers' grains and solubles extract, \*\*YE: yeast extract.

A Plackett-Burman screening design was used to select the main medium constituents influencing *S. cerevisiae* RC016 biomass production according to Plackett & Burman [10]. The model was set up for four previously mentioned factors for the culture media, with two coded levels (-1 and +1) and a centre point (0), and was run to evaluate the linear effects of carbon source concentration (DDGse) (b1), nitrogen source concentration (urea) (b2), YE concentration (b3) and incubation time (b4) (Table 2).

The results were fitted with the first-order model

$$Y = b_0 + \sum b_i x_i$$

Where Y is the predicted response, b0 and bi are constant coefficients and xi is the coded independent factor.

**Table 3:** Levels of factors tested by Box-Behnken designs for the optimization of *Saccharomyces cerevisiae* RC016 biomass production.

Factors	Levels		
	-1	0	1
DDGse* (%)	10	20	30
Urea (%)	0	0.5	1
Time (h)	12	18	24

\*DDGse: Dried distillers' grains and solubles extract.

A Box-Behnken design (BBD) [13] of Response Surface Methodology (RSM) was used to optimize the three most

**Table 4:** Statistical analysis (ANOVA) of the model applied for *Saccharomyces cerevisiae* RC016 biomass production in a DDGs extract (DDGse) based medium.

Summary	
R	0.886
R2	0.785
R2 adjusted	0.699
Standard Error	0.182
# Points	15
PRESS	0.56
R2 for Prediction	0.635
Durbin-Watson d	2.138
First Order Autocorrelation	-0.092
Coefficient of Variation	2.352

significant factors (carbon source, nitrogen source, YE) for enhancing biomass of *S. cerevisiae* RC016, screened by Plackett-Burman design. Three settings for each of three factor levels were used to evaluate the quadratic effects and two-way interactions among the variables DDGse, urea concentration and time (Table 3).

A second-degree model was used to fit the response to the independent variables according to the equation:

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

Where Y is the predicted response, xixj are the input variables that influence the response variable y, β0 is the intercept, βi is the ith lineal coefficient, βii is the ith quadratic coefficient and βij is the ijth interaction coefficient. Statistical and numerical analyses were carried out by means of the analysis of variance (ANOVA) and multiple regressions using Essential Experimental Design v. 2.214 software.

### Analytical determinations

Biomass production was monitored evaluating CFU ml-1 by the standard plate count method on YPD agar and then, multiplied by an adequate factor to transform these values into biomass values in grams.

### Results

#### Screening of essential culture conditions for biomass production

Fifteen trials were conducted to examine the effect of four variables for the production of yeast biomass using the Plackett-Burman design, a powerful method for detecting significant variables. The coefficient R2 of the first-order model for the DDGse based medium was 0.785, indicating that only 21.5% of the variability in the response could not be explained by the model. The adjusted R2 was 0.699, indicating the linear model fits properly. The F value demonstrated a high significance for the regression. ANOVA was used to identify the effect of four factors on yeast biomass production.

Precision Index				8.582			
ANOVA							
Source	SS	SS%	MS	F	F Signif	df	
Regression	1.205	78	0.301	9.123	0.00227	4	
Residual	0.33	22	0.03301			10	
LOF Error	0.275	18 (83)	0.03929	2.1382	0.286	7	
Pure Error	0.05512	4 (17)	0.01837			3	
Total	1.535	100				14	
		P value	Std Error	-95%	95%	t Stat	VIF
b0	7.346	3.40E-11	0.241	6.809	7.884	30.45	
DDGse*	7048611	0.00448	1932153	3.00E+06	1.00E+07	3.648	1
UREA	-2.5E+07	0.14	15457227	-6.00E+07	1.00E+07	-1.603	1
YE**	0.0401	0.852	0.21	-0.427	0.508	0.191	1
Time	0.05277	0.000126	0.00874	0.03329	0.07225	6.036	1

\*DDGse: Dried distillers' grains and solubles extract; \*\*YE: yeast extract.

Table 4 shows that DDGse and urea concentrations were the most significant factors (P<0.05) that were selected for further optimization to obtain a maximum response. The equation obtained for cell growth was:

$$Y \text{ (CFU/mL)} = 7.346 + 7048611.111*DDGSE - 24777777.78*UREA + 0.05277*Time$$

(\*The P-values for regression coefficients in bold characters were significant at P<0.05)

### Selected culture conditions optimization of for biomass production

Based on the results obtained from the Plackett-Burman design, the major factors that influenced *S. cerevisiae* RC016

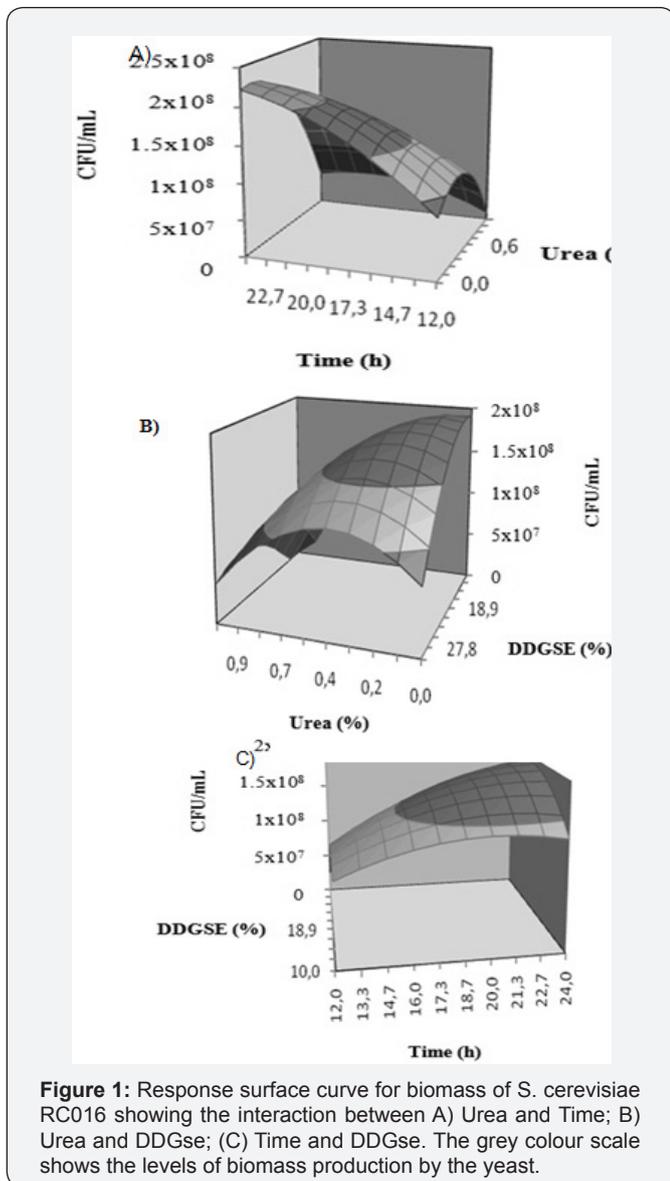
biomass production were selected. The BBD was applied to study the interaction of the selected variables, to estimate the quadratic effects and to determine the optimal quantitative values of the studied parameters in order to maximize the response.

The coefficient of determination R<sup>2</sup> (0.898) for the DDGse based medium indicated that only 10.2% of the variability in the response could not be explained by the model. The statistical significance of the equation model was evaluated by ANOVA F test (Table 5). Values 'Prob>F less than 0.05 indicated that the terms of the model were significant. The unadjusted F-value of 0.317 (not significant) may occur due to noise. The RSM was fitted with the second-order polynomial equation:

**Table 5:** Statistical analysis (ANOVA) of the model applied for *Saccharomyces cerevisiae* RC016 biomass production in a DDGs extract (DDGse) based medium.

Summary							
R							0.948
R <sup>2</sup>							0.898
R <sup>2</sup> adjusted							0.715
Standard Error							0.248
# Points							15
PRESS							3.96
R <sup>2</sup> for Prediction							-0.313
Durbin-Watson d							2.504
First Order Autocorrelation							-0.354
Collinearity							0
Coefficient of Variation							3.174
Precision Index							9.242
ANOVA							
Source	SS	SS%	MS	F	F Signif	df	
Regression	2.713	90	0.301	4.91	0.04725	9	
Residual	0.307	10	0.0614			5	

LOF Error	0.238	8 (78)	0.07936	2.3023	0.317	3	
Pure Error	0.06894	2 (22)	0.03447			2	
Total	3.02	100				14	
		<b>P value</b>	<b>Std Error</b>	<b>-95%</b>	<b>95%</b>	<b>t Stat</b>	<b>VIF</b>
b0	7.298	0.00505	1.533	3.358	11.24	4.762	
DDGse	0.01889	0.784	0.06537	-0.149	0.187	0.289	55.67
Urea	0.4	0.718	1.046	-2.29	3.09	0.382	35.67
Time	0.07075	0.629	0.138	-0.283	0.425	0.514	89
DDGse* DDGse	-0.00209	0.166	0.00129	-0.00541	0.00122	-1.623	35.68
Urea*Urea	-1.794	0.01769	0.516	-3.12	-0.468	-3.478	9.678
Time*Time	-0.00185	0.628	0.00358	-0.01105	0.00736	-0.515	79.01
DDGse*Urea	0.05604	0.0732	0.02478	-0.00765	0.12	2.262	11
DDGse*Time	0.00175	0.436	0.00206	-0.00356	0.00705	0.846	27
Urea*Time	-0.02906	0.513	0.0413	-0.135	0.0771	-0.704	21



$$Y \text{ (CFU/mL)} = 7.298 + 0.01889 \cdot \text{DDGse} + 0.400 \cdot \text{Urea} +$$

$$0.07075 \cdot \text{Time} - 0.00209 \cdot \text{DDGse} \cdot \text{DDGse} - 1.794 \cdot \text{Urea} \cdot \text{Urea} - 0.00185 \cdot \text{Time} \cdot \text{Time} + 0.05604 \cdot \text{DDGse} \cdot \text{Urea} + 0.00175 \cdot \text{DDGse} \cdot \text{Time} - 0.02906 \cdot \text{Urea} \cdot \text{Time}$$

The model predicts that the optimal values of the three most significant variables were DDGse = 18.9% (m/v); Urea = 0% (m/v); YE = 1% (m/v) and incubation time = 21.3h. The response surface curves are shown in Figure 1.

**Validation of the selected culture conditions in bioreactors**

**Table 6:** Comparison of kinetic parameters (specific growth rate ( $\mu_x$ ) and duplication time (td) and productive parameters (maximum productivity (gl-1h-1) and maximum production (gl-1) of *Saccharomyces cerevisiae* RC016 in shaken flasks and bioreactor using initial and optimized media.

Kinetic and Productive Parameters	Initial Media	Optimized Media
	Shaken Flasks	Bioreactor
$\mu_{\text{m\acute{a}x}}$ (h <sup>-1</sup> )	0.16	0.34
Td (h)	4.33	2.04
Productivity <sub>max</sub> (g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	0.062	0.451 ± 0.065 (11h)
Biomass <sub>max</sub> (g L <sup>-1</sup> )	1.83 (48h)	5.20 (11h)

Once the most significant variables and their optimum values were obtained, validation in bioreactor was performed in order to confirm the optimized culture conditions. Mechanical stirring to produce yeast biomass in bioreactor allows a greater homogenization of the cells in contact with the medium thereby increasing oxygen transfer and mass. Kinetic and productive parameters are shown in Table 6, the biomass production of *S. cerevisiae* RC016 improved significantly in the optimized media and in bioreactor compared with initial media in Erlenmeyers. The growth rate significantly increased (112.5%) whereas duplication time was reduced 53.2%.

**Discussion**

The viability of a biotechnological process includes a strategic analysis for reducing production costs in optimizing biomass production. The design of the culture medium is one

of the most important tasks in biological technology. Winkler et al. [14] stated that within the total cost of biotech products, raw materials can represent between 30 and 80%. The composition of the culture medium also has to meet all the nutritional requirements of the microorganism. Economic evaluation of the production process of yeast suggests that the main contributor to the overall cost is the carbon source. For the formulation of an industrial culture medium it is necessary that it meets all nutritional characteristic requirements, allowing good growth of microorganisms. They have to be available on the market or otherwise be obtained as by product of some industrial process, in order to be inexpensive to manufacture. YPD medium is widely used as a substrate to obtain *S. cerevisiae* biomass; it is a synthetic, commercial, processed and enriched medium with glucose as carbon sources and nitrogen sources as yeast extract and peptone [15]. However, it is a highly expensive culture medium when large-scale biomass is needed to obtain. Therefore, it is desirable to produce yeast biomass from cheap carbon sources or waste products, such as cane molasses or sugar residues of bioethanol production. In this work, with the purpose of minimize large-scale production costs and promote sustainable biomass development the use inexpensive substrates such a waste obtained from the bioethanol production was used. This substrate, DDGse has nutritional and economic advantages due to its high protein content as nitrogen sources, yeasts, minerals, group B vitamins.

When a response or set of responses of interest are influenced by several variables, the levels of these variables must be optimized simultaneously to achieve the best system performance [16]. The use of statistical experimental designs methodology in shaken flasks allowed reaching the best nutritional conditions for the culture medium for increasing biomass production. Li et al. [17] used the same methodology we used, for the production of the yeast *C. utilis* in bamboo wastewater that resulted in an overall 1.7-fold increase compared with that using the original conditions in shake-flask cultivation. In the present work, in DDGse optimized conditions the biomass production increased nine fold.

The most significant variables and their optimal ranges were 18.9% DDGse and YE 1%. In the present work, these conditions were evaluated at bioreactor level and significant improvements were obtained for the biomass production of *S. cerevisiae* RC0016 [18]. Other authors have shown the use of different waste substrates for biomass production. Choi and Park (2003) investigated Chinese cabbage waste as a substrate for microbial biomass production of four species of yeast included *S. cerevisiae* and suggested that juice from waste Chinese cabbages could be used to produce microbial biomass proteins. Other researchers, Marova et al. [19] evaluated the influence of several wastes substrates such as non-processed whey and potato extract on the production of carotenoids by yeast strains and biomass. They demonstrated these substrates were adequate for yeast biomass production that could be directly used in feed industry

as nutrition supplement [20]. Bioreactor validation showed good production growth and kinetic parameters. The highest growth rate ( $0.34\text{h}^{-1}$ ) showed a 2.04h duplication time and a high productivity ( $0.45\text{gL}^{-1}\text{h}^{-1}$ ).

### Conclusion

Waste substrates can be used as medium component, which can in particular strains and conditions induce biomass production. Thus, low cost waste substrates could be used industrially biomass production. This study suggest that the large amount of waste DDGs, produced during bioethanol production, and overproduction can be used to generate *S. cerevisiae* RC0016 biomass to be applied in feed additive formulations reducing production costs of the final products. The use of this agro-industrial waste that pollutes the environment can contribute to sustainable development of the process and reduce the costs of large-scale production.

### Acknowledgement

This work was supported by Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCYT-PICT), Consejo Nacional de Promoción Científica y Técnica (CONICET) and Universidad Nacional de Río Cuarto (SECYT-UNRC).

### References

1. Kent JA (2007) Handbook of Industrial Chemistry and Biotechnology. In: Chotani G, Dodge T, Gaertner A, Arbig M (Eds.), Chapter 30: Industrial Biotechnology: Discovery to Delivery. (11<sup>th</sup> edn), Springer, Berlin, Germany.
2. 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.
3. Balcázar JL, De Blas I, Ruiz-Zarzuola I, Cunningham D, Vendrell D, et al. (2006) The role of probiotics in aquaculture. *Vet Microbiol* 114(3-4): 173-186.
4. Verschuere L, Rombaut G, Sorgeloos P, Verstraete W (2000) Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiol Mol Biol Rev* 64(4): 655-671.
5. Armando MR, Pizzolitto RP, Dogi CA, Cristofolini A, Merkis C (2012) Adsorption of ochratoxin A and zearalenone by potential probiotic *Saccharomyces cerevisiae* strains and its relation with cell wall thickness. *J Appl Microbiol* 113(2): 256-264.
6. Dogi CA, Armando R, Ludueña R, Moreno de LeBlanc A, Rosa CA, et al. (2011) *Saccharomyces cerevisiae* strains retain their viability and aflatoxin B<sub>1</sub> binding ability under gastrointestinal conditions and improve ruminal fermentation. *Food Addit Contam* 28(12): 1705-1711.
7. González Pereyra ML, Dogi C, Torres Lisa A, Wittouck P, Ortíz M, et al. (2014) Genotoxicity and cytotoxicity evaluation of probiotic *Saccharomyces cerevisiae* RC016: a 60-day subchronic oral toxicity study in rats. *J Appl Microbiol* 117(3): 824-833.
8. Xu CP, Kim SW, Hwang HJ, Yun JW (2002) Application of statistically based experimental designs for the optimization of exo-polysaccharide production by *Cordyceps militaris* NG3. *Biotechnol Appl Biochem* 36(2): 127-131.
9. Rao RS, Prakasham RS, Prasad KK, Rajesham SSPN, Sarma PN, et al. (2004) Xylitol production by *Candida* sp. parameter optimization

- using Taguchi approach. *Proc Biochem* 39(8): 951-956.
10. Plackett RL, Burman JP (1946) The design of optimum multifactorial experiments. *Biometrika* 33(4): 305-325.
  11. Armando MR, Dogi CA, Pizzolitto RP, Escobar F, Peirano MS, et al. (2011) *Saccharomyces cerevisiae* strains from animal environmental with aflatoxin B<sub>1</sub> binding ability and antipathogenic bacteria influence in vitro. *World Mycotoxin J* 1: 59-68.
  12. Gu SY, Ren J (2005) Process optimization and empirical modeling for electrospun poly (D, L-lactide) fibers using response surface methodology. *Macromol Materials Engineer* 290(11): 1097-1105.
  13. Li XY, Liu ZQ, Chi ZM (2008) Production of phytase by a marine yeast *Kodamaea ohmeri* BG3 in an oats medium: optimization by response surface methodology. *Biores Technol* 99(14): 6386-6390.
  14. Ferreira SC, Bruns RE, Ferreira HS, Matos GD, David JM, et al. (2007) Box-Behnken design: An alternative for the optimization of analytical methods. *Anal Chem Acta* 597(2): 179-186.
  15. Winkler M (1988) Optimisation and time profiling in fermentation process. In: Bushell ME (Ed.), Chapter 4: Computer applications in fermentation technology progress in industrial microbiology. Volume 25, Elsevier, Amsterdam, Netherlands, pp. 91-150.
  16. Castillo EEF, Forero SCS, Industrial M (2007) Evaluación de melaza de caña como sustrato para la producción de *Saccharomyces cerevisiae*. Trabajo de grado. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de ciencias básicas. Microbiología industrial. Bogota DC, Colombia.
  17. Bezerra MA, Santelli RE, Oliveira EP, Villar LS, Escalera LA (2008) Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta* 76(5): 965-977.
  18. Li X, Ouyang J, Xu Y, Chen M, Song X, et al. (2009) Optimization of culture conditions for production of yeast biomass using bamboo wastewater by response surface methodology. *Biores Technol* 100(14): 3613-3617.
  19. Marova I, Carnecka M, Halienova A, Certik M, Dvorakova T, et al. (2012) Use of several waste substrates for carotenoid-rich yeast biomass production. *J Environ Manage* 95: 338-342.
  20. <http://www.grains.org/buyingselling/ddgs>



This work is licensed under Creative Commons Attribution 4.0 License  
DOI: [10.19080/AIBM.2018.08.555727](https://doi.org/10.19080/AIBM.2018.08.555727)

### Your next submission with Juniper Publishers will reach you the below assets

- Quality Editorial service
- Swift Peer Review
- Reprints availability
- E-prints Service
- Manuscript Podcast for convenient understanding
- Global attainment for your research
- Manuscript accessibility in different formats  
( Pdf, E-pub, Full Text, Audio)
- Unceasing customer service

Track the below URL for one-step submission

<https://juniperpublishers.com/online-submission.php>

## ORIGINAL ARTICLE

# Aflatoxin B<sub>1</sub> adsorption/desorption dynamics in the presence of *Lactobacillus rhamnosus* RC007 in a gastrointestinal tract-simulated model

A.S. Fochesato<sup>1,2</sup>, D. Cuello<sup>1</sup>, V. Poloni<sup>1,2</sup>, M.A. Galvagno<sup>2</sup>, C.A. Dogi<sup>1,2</sup> and L.R. Cavaglieri<sup>1,2</sup> <sup>1</sup> Departamento de Microbiología e Inmunología, Universidad Nacional de Río Cuarto, Río Cuarto, Córdoba, Argentina<sup>2</sup> Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICET), Buenos Aires, Argentina**Keywords**adsorption/desorption dynamics, aflatoxin B<sub>1</sub>, degradation, gastrointestinal tract, *Lactobacillus rhamnosus*.**Correspondence**Lilia Cavaglieri, Departamento de Microbiología e Inmunología, Universidad Nacional de Río Cuarto, Ruta 36 km 601, 5800 Río Cuarto, Córdoba, Argentina.  
E-mail: lcavaglieri@exa.unrc.edu.ar

2018/0717: received 7 April 2018, revised 16 August 2018 and accepted 3 September 2018

doi:10.1111/jam.14101

**Abstract****Aims:** (i) To determine the aflatoxin B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) adsorption and desorption dynamics in the presence of *Lactobacillus rhamnosus* RC007 under simulated transit of AFB<sub>1</sub> at each gastrointestinal tract (GIT—saliva, stomach and intestine) stage consecutively and then, separately, (ii) to study the ability of *L. rhamnosus* RC007 to biotransform AFB<sub>1</sub> as a strategy that complements the adsorption process.**Methods and Results:** The AFB<sub>1</sub> adsorption and desorption assay simulating the GIT passage of AFB<sub>1</sub> (93·89 ng g<sup>-1</sup>) in the presence of *L. rhamnosus* RC007 (10<sup>8</sup> CFU per ml) was conducted. Moreover, lactic acid production was determined. Results demonstrated that predominant environmental conditions in salivary solution induced a low AFB<sub>1</sub> adsorption, while the transit through the gastric solution and intestinal solution allowed high percentages of adsorption and did not generate significant AFB<sub>1</sub> desorption.**Conclusions:** The AFB<sub>1</sub> adsorption and desorption dynamics in the presence of *L. rhamnosus* RC007 was favoured by gastric and intestinal environment.**Significance and Impact of the Study:** The knowledge of the adsorption dynamics of AFB<sub>1</sub> with a micro-organism of interest will allow predicting its behaviour at each stage of the GIT.**Introduction**

Mycotoxins are toxic secondary metabolites produced by some species of fungi that exert deleterious effects in animals and humans. Not all fungi are capable of producing mycotoxins and those who produce them, do it under specific environmental conditions (CAST 2003). Major agricultural important mycotoxins are produced mainly by three genera of fungi, *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium*, and although there are other genera, only the mycotoxins produced by these three genera have been studied in depth (Magan and Aldred 2007). Mycotoxin contamination affects overall livestock and cereal sectors as well as in the human health (Pinotti *et al.* 2016). It reduces the efficiency of growth, decreases food conversion and reproduction rates, harms the resistance to infectious diseases, reduces the vaccination effectiveness,

and induces pathological damage to the liver and other organs. Each toxin has features and specific effects, and the occurrence of two or more mycotoxins, as normally found in nature, may cause more adverse effects than the presence of a single one (CAST Report 2003).

Pre- and postharvest strategies to reduce mycotoxin contamination in food and raw materials have been proposed; however, once mycotoxins have reached contamination levels in an ingredient or a food, it is extremely difficult to achieve the total elimination. FAO (2016) defines probiotics as 'viable microorganisms which, when administered in adequate amounts, confer benefits on the host health'. Lactobacilli are probiotic microorganisms that have been widely used in the food additives production and some species have been recognized as safe (GRAS). They also have a high multiplication rate, are able to grow in a wide variety of carbon sources and

do not produce toxic compounds. The union of probiotics with mycotoxins reduces their availability and, consequently, their absorption in the gastrointestinal tract (GIT). It has been demonstrated *in vitro* the adsorption capacity of major mycotoxins such as aflatoxin B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) exerted by probiotic *Saccharomyces cerevisiae* (Armando *et al.* 2011, 2012) and probiotic *Pediococcus acidolactici* and *P. pentosaceus* (Martínez *et al.* 2017). The use of these micro-organisms at a commercial level requires a design of the culture medium, one of the most important tasks within the biological technology, evaluating the use of economic substrates for the biomass production at a large scale, allowing also the conservation of the biological properties previously demonstrated in the laboratory.

Previous studies works allowed selecting lactic acid bacteria (LAB) from maize silage, such as probiotic *Lactobacillus rhamnosus* RC007 capable of inhibiting the growth of *Fusarium graminearum* and *Aspergillus carbonarius* (Dogi *et al.* 2013). This strain did not possess genes for antibiotics of veterinary importance and showed the interaction with the intestinal microbiota by modulating the immune system of the host, increasing its resistance against pathogens or by stimulating the immune system of mice and pigs through the release of anti-inflammatory cytokines (Dogi *et al.* 2016; García *et al.* 2018).

Studies have demonstrated the ability of LAB to adsorb mycotoxins; however, none of them have determined in detail the AFB<sub>1</sub> adsorption and desorption dynamics and how it is occurring at the different stages of the simulated GIT (Lahtinen *et al.* 2004; Niderkorn *et al.* 2006). The present work aims to (i) determine the AFB<sub>1</sub> adsorption and desorption dynamics simulating the passage of AFB<sub>1</sub> at each stage of the GIT (saliva, stomach and gut) consecutively, in the presence of *L. rhamnosus* RC007 and then, considering the AFB<sub>1</sub> adsorption and desorption behaviour at each of the simulated stages, independently, (ii) to study the ability of *L. rhamnosus* RC007 to bio-transform AFB<sub>1</sub> as a strategy that complements the adsorption process.

## Materials and methods

### Micro-organism, growth medium and cultural conditions

*Lactobacillus rhamnosus* RC007 isolated from maize silage was obtained from the collection centre at the National University of Rio Cuarto, Argentina. Stock cultures were maintained at -80°C in 15% (v/v) glycerol. The LAB strain was identified from both the fermentation pattern (API 50 CHL test) and the 16S rRNA gene sequence (Dogi *et al.* 2013). *Lactobacillus rhamnosus* RC007 was grown at 37°C

for 24 h without agitation in Man, Rogosa and Sharpe (MRS) broth (Britania, Buenos Aires, Argentina).

### Effect of simulated gastrointestinal conditions on aflatoxin B<sub>1</sub> binding

To conduct the AFB<sub>1</sub> binding assay, inoculations were made from the working cultures into each artificial solution simulating the GIT. After being incubated, cells were collected by centrifugation (5000 g 10 min) and washed twice with phosphate-buffered saline (PBS, pH 7). The LAB pellet ( $1 \times 10^8$  cells per ml) concentration was determined by viable counts.

### Aflatoxin B<sub>1</sub> solutions

From a solution of 7500 ng ml<sup>-1</sup>, new AFB<sub>1</sub> solutions containing 93.89 ng ml<sup>-1</sup> were prepared using artificial salivary solution (SS), simulated gastric juice (GS) or artificial intestinal fluid (IS), separately. Positive (AFB<sub>1</sub> suspended in the adequate simulated condition) and negative (non-AFB<sub>1</sub> inoculated simulated condition) controls were included in all the experiments. The assays were conducted in triplicate.

### Simulated gastrointestinal tract solutions' composition

Simulated GIT solutions were prepared as follows: SS: lysozyme 2 mg ml<sup>-1</sup> (Sigma 47 700 U mg<sup>-1</sup>) in saline solution pH 6.5; GS: NaCl 125 mmol, KCl 7 mmol, NaHCO<sub>3</sub> 45 mmol, pepsin 3 g l<sup>-1</sup> adjusted to pH 3 with HCl; IS: trypsin 1 mg ml<sup>-1</sup> (Fluka 11 531 U mg<sup>-1</sup>), chymotrypsin 1 mg ml<sup>-1</sup> (Fluka 80 U mg<sup>-1</sup>), oxgall bile salts 0.3% (w/v) adjusted to pH 8 with NaOH 5 mmol l<sup>-1</sup>.

### Aflatoxin B<sub>1</sub> adsorption and desorption assay simulating the gastrointestinal tract passage

Simulated GIT passage was performed according to Armando *et al.* (2011) with some modifications. The assays were conducted in two different ways:

- i A complete simulated GIT passage (the SS, GS and IS consecutively) was simulated in order to know the dynamics of the adsorption process, LAB cells were resuspended in SS (1 ml) containing AFB<sub>1</sub> (93.89 ng ml<sup>-1</sup>) and incubated at 37°C for 5 min under agitation in an orbital shaker (100 rev min<sup>-1</sup>) to simulate the mastication process. After centrifugation, the same cells were added to GS (1 ml) and incubated at 37°C for 45 min under agitation in an orbital shaker (50 rev min<sup>-1</sup>) simulating the peristalsis process. After

centrifugation, the same cells were added to IS (1 ml) and incubated at 37°C for 30 min under agitation in an orbital shaker (100 rev min<sup>-1</sup>). After that, LAB cells were centrifuged at 5000 g for 15 min, and the supernatant containing unbound mycotoxin was collected and stored at -20°C until high-performance liquid chromatography (HPLC) analysis.

ii Each GIT stage (SS, GS and IS) was simulated separately. So, each stage had AFB<sub>1</sub> (93.89 ng ml<sup>-1</sup>) in the presence of *L. rhamnosus* RC007 (10<sup>8</sup> CFU per ml) and was conducted as follows:

- LAB cells (1 × 10<sup>8</sup> cells per ml) were resuspended in SS containing AFB<sub>1</sub> (93.89 ng ml<sup>-1</sup>) and incubated at 37°C for 5 min under agitation in an orbital shaker (100 rev min<sup>-1</sup>) to simulate the mastication process. After centrifugation, the supernatant containing unbound mycotoxin was collected and stored at -20°C.
- LAB cells (1 × 10<sup>8</sup> cells per ml) were resuspended in GS containing AFB<sub>1</sub> (93.89 ng ml<sup>-1</sup>) and incubated at 37°C for 45 min under agitation in an orbital shaker (50 rev min<sup>-1</sup>) simulating the peristalsis process. After centrifugation, the supernatant containing unbound mycotoxin was collected and stored at -20°C.
- LAB cells (1 × 10<sup>8</sup> cells per ml) were resuspended in IS containing AFB<sub>1</sub> (93.89 ng ml<sup>-1</sup>) and incubated at 37°C for 30 min under agitation in an orbital shaker (100 rev min<sup>-1</sup>). After that, cells were centrifuged at 5000 g for 15 min, and the supernatant containing unbound mycotoxin was collected and stored at -20°C. All supernatants from each GIT stage (salivary, gastric and intestinal conditions) were analysed by HPLC.

#### Aflatoxin B<sub>1</sub> degradation assay by cell-free extracts

The toxin degradation technique was performed according to the methodology proposed by Teniola *et al.* (2005) with modifications. The experiment was run in 15-ml tubes; a cell-free extract from a 24-h culture of *L. rhamnosus* RC007 was placed and contaminated with a solution of AFB<sub>1</sub> (93.89 ng ml<sup>-1</sup>). The mixture was incubated in dark at 37°C without stirring for 12, 24 and 48 h. Extraction with chloroform (1 : 1, v/v) of the remaining AFB<sub>1</sub> was then performed for further quantification by HPLC. All experiments were carried out in triplicate.

#### Detection and quantification of aflatoxin B<sub>1</sub>

Aflatoxin B<sub>1</sub> was quantified by HPLC (Waters e2695; Waters, Milford, MA) with fluorescence detection

(Waters 2475 multi  $\lambda$  fluorescence detector) according to Trucksess *et al.* (1994) with some modifications. Chromatographic separations were performed on a reversed-phase C18 column (150 × 4.6 mm i.d., 5  $\mu$ m particle size; Phenomenex, Luna, Torrance, CA). The fluorescence of AFB<sub>1</sub> derivatives was recorded at excitation and emission wavelengths of 360 and 460 nm respectively. The mobile phase (water : acetonitrile : methanol, 4 : 1 : 1) was pumped at 1.5 ml min<sup>-1</sup>. The injection volume was 100  $\mu$ l and the retention time was around 4 min. The detection limit of the technique was 1 ng g<sup>-1</sup>.

#### Aflatoxin B<sub>1</sub> recovery assays

Aflatoxin B<sub>1</sub> recovery assays were carried out in triplicate in the different solutions simulating the GIT. The percentage (%) recovery was tabulated by taking the difference of the amount of AFB<sub>1</sub> spiked into each solution and the amount of AFB<sub>1</sub> recovered from the assay divided by the amount of AFB<sub>1</sub> spiked into each solution multiplied by 100%.

#### Determination of total viable *Lactobacillus rhamnosus* counts

Aliquots (100  $\mu$ l) of *L. rhamnosus* cells prior to GI passage and after salivary, gastric and intestinal conditions were taken. Total viable counts of *L. rhamnosus* were determined by a plate method using MRS agar after serial 10-fold dilutions. Plates were incubated at 37°C for 24 h.

#### Statistical analyses

Means were analysed by analysis of variance ( $P < 0.0001$ ). The variables that showed significant differences were compared using the least significant Fisher LSD difference test ( $P \leq 0.05$ ). The analysis was performed using Info Stat for Windows 2012 ver. 2.03 (SPSS Inc., Córdoba, Argentina).

## Results

#### Effect of simulated gastrointestinal conditions on aflatoxin B<sub>1</sub> binding

The ability of *L. rhamnosus* RC007 to adsorb and desorb AFB<sub>1</sub> in the GIT solutions was determined by simulating the temperature, pH, peristaltic movements as well as the enzymes and specific salts at each stage of the tract (saliva, stomach and intestine).

Table 1 shows the levels (ng) and percentages (%) of AFB<sub>1</sub> adsorption and desorption when the GIT of AFB<sub>1</sub> (93.89 ng) in the presence of *L. rhamnosus* RC007 was simulated. The results were expressed as levels (ng) of

GIT*	Aflatoxin B <sub>1</sub> adsorption				Aflatoxin B <sub>1</sub> desorption		
	Levels (ng ml <sup>-1</sup> )		Percentage (%)		Residual levels (ng ml <sup>-1</sup> )¶	Relative**	Total††
	In solution or in pellet†	Adsorbed	Relative‡	Total§			
SS	93.89 ± 5.12	17.74 ± 3.88	18.8		76.15 ± 2.34	81.2	
GS	17.74 ± 3.88	4.43 ± 2.03	24.97	4.71	13.31 ± 1.85	75.03	95.28
IS	4.43 ± 2.03	3.65 ± 0.48	82.39	3.89	0.78 ± 0.03	17.61	96.11

\*GIT, gastrointestinal tract; SS, salivary solution; GS, gastric solution; IS, intestinal solution.

†Aflatoxin B<sub>1</sub> present in the salivary solution at the start of the experience or present in the pellet in the gastric and the intestinal solutions (GS-IS).

‡Percentage of aflatoxin B<sub>1</sub> adsorbed by *L. rhamnosus* RC007 in relation with the AFB<sub>1</sub> added to the salivary solution (SS) or present in the *L. rhamnosus* RC007 pellet (GS and IS).

§Percentage of aflatoxin B<sub>1</sub> adsorbed by *L. rhamnosus* RC007 in relation with the total AFB<sub>1</sub> added at the start of the experiment in the salivary solution (SS).

¶Residual amount of AFB<sub>1</sub> that is not adsorbed by *L. rhamnosus* RC007 and is removed in the supernatant at each stage of the GIT. This AFB<sub>1</sub> does not enter the next tract again.

\*\*Percentage of AFB<sub>1</sub> desorbed by *L. rhamnosus* RC007 in relation with the AFB<sub>1</sub> added to the salivary solution (SS) or present in the *L. rhamnosus* RC007 pellet (GS and IS).

††Percentage of AFB<sub>1</sub> desorbed by *L. rhamnosus* RC007 in relation with the total AFB<sub>1</sub> added at the start of the experiment in the salivary solution (SS).

AFB<sub>1</sub> present in SS or present in the same LAB pellet that transited through GS and IS. It is important to note here that cell-free supernatant solutions containing the non-adsorbed mycotoxin by the LAB pellet were removed and did not continue the subsequent steps of the assay according to the employed methodology. In this way, the levels (ng) of AFB<sub>1</sub> (Table 1—first column) present in the SS and those present in the LAB pellet were reported and subsequently passed to the other stages of the GIT, showing that in each one of them there was also a desorption process. Both, levels (ng) and percentages (%) of desorption at each GIT stage were considered taking into account the residual levels of AFB<sub>1</sub> as well as relative percentages (percentage of AFB<sub>1</sub> adsorbed by *L. rhamnosus* RC007 in relation with the AFB<sub>1</sub> added to SS or present in the *L. rhamnosus* RC007 pellet in GS and IS) and adsorbed AFB<sub>1</sub> total percentages (percentage of AFB<sub>1</sub> adsorbed by *L. rhamnosus* RC007 in relation to the total AFB<sub>1</sub> added at the start of the experiment in the SS).

The relative AFB<sub>1</sub> adsorption percentage in the passage through simulated SS showed a low adsorption percentage, as did the passage through the GS; while IS allowed to retain a high percentage of AFB<sub>1</sub>. If the total percentage of adsorbed AFB<sub>1</sub> is observed, the IS showed the highest retention. These results are directly related to the relative and total percentages of desorption that were between 81.20 and 96.11% at the different GIT stages.

In a subsequent trial, the LAB pellet was confronted with AFB<sub>1</sub> for each of the solutions that simulated the GIT separately (Table 2). Again, it was observed that when mycotoxin was in contact with SS, the percentage

**Table 1** Adsorption and desorption of aflatoxin B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) in the presence of *Lactobacillus rhamnosus* RC007 (10<sup>8</sup> CFU per ml) through the different stages of the gastrointestinal tract consecutively (GIT)

of AFB<sub>1</sub> adsorption was low. However, this did not occur in the GS or IS since the mycotoxin adsorption rates were significantly higher ( $P \leq 0.0001$ ), as can be observed in the levels of adsorbed mycotoxin (ng—Table 2). These results showed that in both, GS and IS, the adsorption rates were higher than 88%. If the mycotoxin desorption percentages are observed, they are directly related to the adsorption percentages previously shown.

#### Aflatoxin B<sub>1</sub> degradation assay

Table 3 shows the AFB<sub>1</sub> degradation percentages by *L. rhamnosus* RC007 cell-free extracts. The strain showed a range between 74.43 and 80.40% of AFB<sub>1</sub> degradation between 12 and 48 h of exposure, showing significant differences between 12 and 24 h in relation with 48 h where the best degradation was observed.

#### Aflatoxin B<sub>1</sub> recovery assays

The overall % recoveries for salivary, gastric and intestinal solutions were 105.71, 97.55 and 88.57% respectively.

#### Effect of simulated gastrointestinal tract on *Lactobacillus rhamnosus* RC007 viability

After carrying out the viable cell count, after incubation it was observed that all the strains kept the number of viable cells constant after the simulation to the gastrointestinal passage (10<sup>7-8</sup> CFU per ml), indicating in this way that they resist the stomach and intestinal conditions.

**Table 2** Adsorption and desorption of aflatoxin B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) in the presence of *Lactobacillus rhamnosus* RC007 (10<sup>8</sup> CFU per ml) simulating each stage of the gastrointestinal tract, independently

GIT*	AFB <sub>1</sub> (ng ml <sup>-1</sup> )†	AFB <sub>1</sub> adsorption		AFB <sub>1</sub> desorption (%)
		(ng ml <sup>-1</sup> )	Percentage (%)	
SS	93.89 ± 5.12	17.74 ± 3.88 <sup>a</sup>	18.8	81.2
GS	93.89 ± 5.12	83.49 ± 5.02 <sup>b</sup>	88.92	11.08
IS	93.89 ± 5.12	91.07 ± 5.28 <sup>b</sup>	96.99	3.01

Different letters mean significant differences ( $P < 0.05$ ) between the values according to Fisher's LSD test.

\*GIT: gastrointestinal tract; SS: salivary solution; GS: gastric solution; IS: intestinal solution.

†Aflatoxin B<sub>1</sub> present in the salivary, gastric and intestinal solutions.

**Table 3** Aflatoxin B<sub>1</sub> degradation percentages by *Lactobacillus rhamnosus* RC007 cell-free extracts at different time of exposure

Time (h)	Degradation percentage (%) (mean ± SD)
12	74.43 ± 0.68a
24	75.87 ± 2.33a
48	80.40 ± 3.10b

SD: standard deviation. Values corresponding to the same letter are not significantly different according to Fisher's protected LSD test ( $P < 0.05$ ).

## Discussion

There is a growing interest in the research of strategies to prevent the AF production in food and feed, as well as to eliminate, inactivate or reduce their bioavailability in contaminated products (Hernandez-Mendoza *et al.* 2009). The use of micro-organisms for AF control or elimination is a very attractive alternative and several studies have shown that both viable and nonviable LAB cells have a great ability to bind to AFs (Bovo *et al.* 2014).

In this work, the results showed the adsorption and desorption dynamics that exist when the AFB<sub>1</sub> transits through the GIT different stages in the presence of *L. rhamnosus* RC007. When AFB<sub>1</sub> transit the predominant environmental GIT conditions consecutively, the SS generated a low adsorption of the mycotoxin, while the transit through the other stages (GS and IS) allowed high percentages of adsorption and did not generate significant desorption of AFB<sub>1</sub> from the LAB pellet. When AFB<sub>1</sub> transit through GIT, simulating each of the stages, separately, the results verified again the low adsorption in the SS, while in both GS and IS an adsorption greater than 88% was observed. Most of the studies carried out in the world with LAB as a mycotoxin-reducing agent

have studied *L. plantarum* strains (Laitila *et al.* 2002; Broberg *et al.* 2007; Valero-Cases and Frutos 2015). Different authors have reported the binding model of AFB<sub>1</sub> molecules to the surface of the bacterial cell wall, suggesting two possible processes, the binding (adsorption) and the release (desorption) of the aflatoxin molecule to and from the binding site in the surface of micro-organisms (Lee *et al.* 2003; Bueno *et al.* 2007). Using this model, it has been shown that the different capacities of the strains to trap AFB<sub>1</sub> were directly related to the number of binding sites present in the cell wall of each micro-organism. The cell wall of one of the most studied LAB, *L. rhamnosus* has polysaccharides where it binds aflatoxins. These polysaccharides occur in three main forms: cell wall polysaccharide, peptidoglycan, and teichoic or lipoteichoic acids. The environmental conditions of the different portions, given by pH, enzymes, etc. would be influencing the three-dimensional structure of the bacterial cell wall and therefore the binding sites thereof to the aflatoxins. Haskard *et al.* (2000) showed that hydrophobic interactions were expected in acid-treated bacteria where the protein denaturation treatment may expose more hydrophobic binding areas to mycotoxins. Moreover, they emphasized that salts were expected to influence the bacterial surface charge and the results show that electrostatic interactions would have some effects on binding. Although in the present work the cells were subjected to different times according to each stage of the GIT, Bueno *et al.* (2007) stated that only 30 s would be enough to achieve maximum mycotoxin adsorption. In future studies, it would be interesting to perform these tests taking into account the adsorption and desorption process at the permanence of food at each stage of the GIT, considering each animal species in which this probiotic additive adsorbent of AFB<sub>1</sub> would be used.

The search for an effective, specific, feasible and environmentally sound decontamination technology is a great demand. The biological detoxification of mycotoxins, using micro-organisms and/or enzymes to degrade mycotoxins to less toxic or nontoxic compounds may be a choice of such technology. In this work, the cell-free extract from *L. rhamnosus* RC007 was tested in interaction with AFB<sub>1</sub> and high percentages of degradation were obtained, demonstrating the potential of this bacterium for its use as an antimycotoxin feed additive that complements the adsorption and degradation abilities of AFB<sub>1</sub>. González Pereyra *et al.* (2018) evaluated soil-borne *Bacillus* sp. strains on aflatoxigenic *A. parasiticus* growth and AF production and the culture supernatant of the most effective strain was studied. They found that six *Bacillus* sp. strains were able to reduce *A. parasiticus* growth rate significantly ( $P < 0.05$ ). Among them,

*Bacillus* sp. RC1A inhibited fungal growth almost completely and could also reduce AFB<sub>1</sub> concentration produced by *A. parasiticus* ( $P < 0.0001$ ). The ability of some strains of LAB isolated from different sources to eliminate OTA, AFLA and ZEA has allowed recognizing their potential biotechnological application to reduce the health hazards associated with these mycotoxins. The cell-free supernatant of LAB isolated from vegetable (wine, olives, fruits and silage) and animal (milk and dairy products, sausages) sources were evaluated for their ability to eliminate mycotoxins. Among them, 10 strains isolated from milk were able to eliminate AFB<sub>1</sub>, belonging to *L. casei*, *L. paracasei*, *L. plantarum* and one to *Leuconostoc mesenteroides*. Two strains of *Enterococcus faecium* and one of *E. faecalis* from sausage eliminated ZEA. Concerning strains of vegetal origin, one *L. plantarum* strain was isolated from elderberry fruit, one strain each of *L. buchnerii* and *L. parafarraginis* isolated from silage, eliminated ZEA. Two other strains of *L. plantarum* from silage were able to degrade both ZEA and OTA, and one *L. buchnerii* strain showed activity over AFB<sub>1</sub> (Inês et al. 2015). Based on the present results, future studies should be conducted to characterize the cell-free supernatant and demonstrate the presence of the compound responsible for such degradation.

The AFB<sub>1</sub> adsorption and desorption dynamics in the presence of *L. rhamnosus* RC007 was strongly affected by the salivary environment. The knowledge of the adsorption dynamics of AFB<sub>1</sub> with a micro-organism of interest will allow to predict its behaviour at each stage of the GIT, and future encapsulation strategies based on the GIT influence on mycotoxin adsorption could be designed. As the greatest desorption was observed in saliva, a portion of *L. rhamnosus* RC007, produced in a molasses containing medium, could be encapsulated to resist the saliva environment and allow its release in the stomach, while another portion should be designed using other encapsulation strategies to resist saliva and stomach environment for its final release in the intestine to exert an AFB<sub>1</sub> adsorption/degradation process. Later, some candidate degradation products could be analysed (e.g. using HR-MS). In this way, *L. rhamnosus* RC007 is promissory for its use as an antimycotoxin feed additive that complements the AFB<sub>1</sub> adsorption/degradation ability.

## Acknowledgements

This study was supported by grants from SECyT-UNRC 331/16, CONICET GI 11220120100156 and PICT 2033/15.

## Conflict of Interest

The authors have no conflict of interest to declare.

## References

- Armando, M.R., Dogi, C.A., Pizzolitto, R.P., Escobar, F., Peirano, M.S., Salvano, M.A., Sabini, L.I., Combina, M. et al. (2011) *Saccharomyces cerevisiae* strains from animal environmental with aflatoxin B<sub>1</sub> detoxification ability and antipathogenic bacteria influence in vitro. *World Mycotoxin J* **4**, 59–68.
- Armando, M.R., Dogi, C.A., Rosa, C.A.R., Dalcerro, A.M. and Cavaglieri, L.R. (2012) *Saccharomyces cerevisiae* strains and the reduction of *Aspergillus parasiticus* growth and aflatoxin B<sub>1</sub> production at different interacting environmental conditions, in vitro. *Food Addit Contam Part A* **29**, 1443–1449.
- Bovo, F., Franco, L.T., Rosim, R.E., Trindade, C.S.F. and de Oliveira, C.A.F. (2014) The ability of *Lactobacillus rhamnosus* in solution, spray-dried or lyophilized to bind aflatoxin B<sub>1</sub>. *J Food Res* **3**, 35–42.
- Broberg, A., Jacobsson, K., Ström, K. and Schnürer, J. (2007) Metabolite profiles of lactic acid bacteria in grass silage. *Appl Environ Microbiol* **73**, 5547–5552.
- Bueno, D.J., Casale, C.H., Pizzolitto, R.P., Salano, M.A. and Olivier, G. (2007) Physical Adsorption of aflatoxin B<sub>1</sub> by lactic acid bacteria and *Saccharomyces cerevisiae*: a theoretical model. *J Food Prot* **70**, 2148–2154.
- CAST Report. (2003). *Mycotoxins: Risks in Plant, Animal, and Human Systems* ed. Richard, J.L. and Payne, G.A. Council for Agricultural Science and Technology Task Force report No. 139, Ames, Iowa, USA.
- Dogi, C.A., Fochesato, A., Armando, R., Pribull, B., Souza, M.M.S., da Silva Coelho, I. and Cavaglieri, L. (2013) Selection of lactic acid bacteria to promote efficient silage fermentation capable of inhibiting the activity of *Aspergillus parasiticus* and *Fusarium graminearum* and mycotoxin production. *J Appl Microbiol* **114**, 1650–1660.
- Dogi, C.A., Garcia, G., de Moreno LeBlanc, A., Greco, C. and Cavaglieri, L. (2016) *Lactobacillus rhamnosus* RC007 intended for feed additive: immunestimulatory properties and ameliorating effects on TNBS-induced colitis. *Benef Microbes* **6**, 1–10.
- FAO. (2016) *Probiotics in animal nutrition – production, impact and regulation* by Yadav S. Bajajai, Athol V. Klieve, Peter J. Dart and Wayne L. Bryden. In ed. Makkar, H.P.S. pp. 179. Rome: FAO Animal Production and Health.
- García, G.R., Payros, D., Dogi, C.A., Laffitte, J., González Pereyra, M.L., Cavaglieri, L.R. and Oswald, I.P. (2018) Intestinal toxicity of deoxynivalenol is limited by *Lactobacillus rhamnosus* RC007 in pig jejunum explants. *Arch Toxicol* **92**, 983–993.
- González Pereyra, M.L., Martínez, M.P. and Cavaglieri, L.R. (2018) Antifungal and aflatoxin-reducing activity of extracellular compounds produced by soil *Bacillus* spp. with potential application in agriculture. *Food Control* **85**, 392–399.

- Haskard, C., Binnion, C. and Ahokas, J. (2000) Factors affecting the sequestration of aflatoxin by *Lactobacillus rhamnosus* strain GG. *Chem Biol Interact* **128**, 39–49.
- Hernandez-Mendoza, A., Garcia, H.S. and Steele, J.L. (2009) Screening of *Lactobacillus casei* strains for their ability to bind aflatoxin B<sub>1</sub>. Screening of *Lactobacillus casei* strains for their ability to bind aflatoxin B<sub>1</sub>. *Food Chem Toxicol* **47**, 1064–1068.
- Inês, A., Guimarães, A., Maria, J.C., Laranjo, V., Venâncio, A. and Abrunhosa, L. (2015) Bio-detoxification of mycotoxins by lactic acid bacteria from different food matrices. World Academy of Science, Engineering and Technology. *Int J Nutrit Food Sci* **2**, 7.
- Lahtinen, S.J., Haskard, C.A., Ouwehand, A.C., Salminen, S.J. and Aokas, J.T. (2004) Binding to aflatoxin B<sub>1</sub> to cell wall components of *Lactobacillus rhamnosus* strain GG. *Food Add Contam* **21**, 158–164.
- Laitila, A., Alakomi, H.L., Raaska, L., Mattila Sandholm, T. and Haikara, A. (2002) Antifungal activities of two *Lactobacillus plantarum* strains against *Fusarium* moulds in vitro and in malting of barley. *J Appl Microbiol* **93**, 566–576.
- Lee, Y.K., El-Nezami, H., Haskard, C.A., Gratz, S., Puong, K.Y. and Salminen, S. (2003) Kinetics of adsorption and desorption of aflatoxin B<sub>1</sub> by viable and nonviable bacteria. *J Food Prot* **66**, 426–430.
- Magan, N. and Aldred, D. (2007) Post-harvest control strategies: minimizing mycotoxins in the food chain. *Int J Food Microbiol* **119**, 131–139.
- Martínez, M.P., González Pereyra, M.L., Pena, G.A., Poloni, V.L., Fernandez Juri, M.G. and Cavaglieri, L. (2017) *Pediococcus acidolactici* and *Pediococcus pentosaceus* isolated from rainbow trout ecosystem have probiotic and AFB<sub>1</sub> adsorbing/degrading abilities in vitro. *Food Addit Contam* **11**, 1–3.
- Niderkorn, V., Boudra, H. and Morgavi, D.P. (2006) Binding of Fusarium mycotoxins by fermentative bacteria in vitro. *J Appl Microbiol* **101**, 849–856.
- Pinotti, L., Ottoboni, M., Giromini, C., Dell'Orto, V. and Cheli, F. (2016) Mycotoxin contamination in the EU feed supply chain: a focus on cereal byproducts. *Toxins (Basel)* **8**, 45. <https://doi.org/10.3390/toxins8020045>.
- Teniola, O.D., Addo, P.A., Brost, I.M., Färber, P., Jany, K.D., Alberts, J.F. and Holzapfel, W.H. (2005) Degradation of aflatoxin B<sub>1</sub> by cell-free extracts of *Rhodococcus erythropolis* and *Mycobacterium fluoranthenorans* sp. nov. DSM44556 T. *Int J Food Microbiol* **105**, 111–117.
- Trucksess, M.W., Stack, M.E., Nesheim, S., Albert, R. and Romer, T. (1994) Multifunctional column coupled with liquid chromatography for determination of aflatoxins B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> and G<sub>2</sub> in corn, almonds, Brazil nuts, peanuts, and pistachio nuts: collaborative study. *J AOAC Int* **77**, 1512–1521.
- Valero-Cases, E. and Frutos, M.J. (2015) Effect of different types of encapsulation on the survival of *Lactobacillus plantarum* during storage with inulin and in vitro digestion. *LWT-Food Sci Technol* **64**, 824–828.