

**CARRERA DEL INVESTIGADOR CIENTÍFICO Y  
TECNOLÓGICO**  
**Informe Científico<sup>1</sup>**

**PERIODO** <sup>2</sup>: 2011-2013

Legajo N°:

**1. DATOS PERSONALES**

*APELLIDO: De Antoni*

*NOMBRES: Graciela Liliana*

*Dirección Particular: Calle: N°:*

*Localidad: City Bell CP: 1896 Tel:*

*Dirección electrónica (donde desea recibir información):  
gracieladeantoni@yahoo.com.ar*

**2. TEMA DE INVESTIGACION**

Desarrollo de un producto probiótico deshidratado de amplio espectro a base de suero de quesería fermentado con bacterias lácticas y levaduras. Estudio de su acción inhibitoria sobre *Campylobacter*, *Shigella*, *Escherichia coli* enteropatógenas, *Giardia* intestinales y hongos toxigénicos

**3. DATOS RELATIVOS A INGRESO Y PROMOCIONES EN LA CARRERA**

*INGRESO: Categoría: Asistente Fecha: septiembre 1987*

*ACTUAL: Categoría: Principal desde fecha: julio 2004*

**4. INSTITUCION DONDE DESARROLLA LA TAREA**

*Universidad y/o Centro: Universidad Nacional de La Plata*

*Facultad: Ciencias Exactas*

*Departamento: Ciencias Biologicas*

*Cátedra: Microbiologia*

*Otros: Centro de Investigacion y Desarrollo en Criotecnologia de Alimentos*

*Dirección: Calle: 47 y 115 N°: -*

*Localidad: La Plata CP: 1900 Tel: 4254853*

*Cargo que ocupa: Profesora Titular- Investigadora Principal*

**5. DIRECTOR DE TRABAJOS. (En el caso que corresponda)**

*Apellido y Nombres:*

*Dirección Particular: Calle: N°:*

<sup>1</sup> Art. 11; Inc. "e"; Ley 9688 (Carrera del Investigador Científico y Tecnológico).

<sup>2</sup> El informe deberá referenciar a años calendarios completos. Ej.: en el año 2008 deberá informar sobre la actividad del período 1°-01-2006 al 31-12-2007, para las presentaciones bianuales.

Localidad: CP: Tel:

Dirección electrónica:

.....  
Firma del Director (si corresponde)

.....  
Firma del Investigador

**6. EXPOSICION SINTETICA DE LA LABOR DESARROLLADA EN EL PERIODO.**

*Debe exponerse, en no más de una página, la orientación impuesta a los trabajos, técnicas y métodos empleados, principales resultados obtenidos y dificultades encontradas en el plano científico y material. Si corresponde, explicita la importancia de sus trabajos con relación a los intereses de la Provincia.*

Durante el desarrollo del proyecto se trabajó en la optimización de las condiciones de producción de suero fermentado, la caracterización química, microbiológica y actividad inhibitoria de los sueros fermentados para el desarrollo de un producto probiótico deshidratado de amplio espectro a base de suero de quesería fermentado con bacterias lácticas y levaduras.

Se evaluó la capacidad de gránulos de kefir de diferentes orígenes de mantenerse viables, crecer y fermentar suero de quesería. Se observó que todos fueron capaces de aumentar su biomasa, no observándose diferencias significativas en el crecimiento en suero y leche para los gránulos AGK10 que resultó seleccionado para los siguientes ensayos. Se analizó el pH, la producción de ácidos orgánicos y la degradación de lactosa durante la fermentación del suero. Luego 24 horas el pH del suero desciende de  $6,4 \pm 0,3$  a  $3,56 \pm 0,24$ , detectándose un 0,83% de ácido láctico y 0,027% de ácido acético. Durante el proceso se degrada un 18,8% de la lactosa presente en el suero. Los gránulos crecidos en ambos sustratos presentaron similar contenido de bacterias lácticas y levaduras. La composición microbiológica del suero fermentado difiere significativamente de la leche fermentada que presenta mayor contenido de bacterias lácticas y menor de levaduras. Se empleó DGGE (Electroforesis en Gel en Gradiente Desnaturalizante) como técnica independiente de cultivo para analizar la diversidad microbiana. Se optimizó la obtención de ADN así como las condiciones electroforéticas y los resultados mostraron una semejanza en la composición bacteriana de gránulos desarrollados en leche y suero observándose sólo diferencias en los perfiles de levaduras.

En cuanto al proceso, al incubar a 30 y 37° C se acelera la velocidad de fermentación, hay una acidificación más rápida y mayor degradación de lactosa que a 20° C. Sin embargo a altas temperaturas los gránulos no aumentan su biomasa, presentan cambios morfológicos y un aumento de la proporción de bacterias lácticas. El empleo de gránulos de kefir en concentración de 10% p/v también permite aumentar la velocidad de acidificación. Sin embargo en 24 h de incubación el producto obtenido utilizando gránulos a 1 y 10% p/v a 30 y 37° C presenta similar pH, contenido de lactosa y número de microorganismos que el obtenido empleando gránulos a concentración 1% p/v. A 20°C al inocular gránulos 1% p/v se obtiene un producto con similar concentración de microorganismos y mayor pH. Se evaluó el empleo de distintos sueros como sustratos: origen ovino y vacuno, no hallándose diferencias significativas en el aumento de biomasa de los gránulos, composición microbiológica, pH, ácido láctico, humedad, cenizas, proteínas y materia grasa. Sí varió de acuerdo al suero empleado el contenido de lactosa en el producto final.

Se determinó la capacidad inhibitoria de los SF contra 100 aislados de Salmonella sp. y 100 de Escherichia coli, resultando inhibitorios todos los obtenidos con 10% de gránulos de kefir. La concentración inhibitoria mínima fue de una dilución al 30% de los SF, mientras que la concentración bactericida mínima varió entre 40% y 70% dependiendo del aislado. Los patógenos Salmonella enterica serovar Enteritidis 2713 y Escherichia

coli 2710 perdieron su viabilidad en el SF luego de 2 a 7 h de incubación. La inhibición estuvo principalmente relacionada a la producción de ácido láctico.

Se analizó el efecto inhibitorio de proteínas de Capa-S de *Lactobacillus kefir* sobre la acción de toxinas de *Clostridium difficile*. Los resultados sugieren que las proteínas de Capa-S están implicadas en los mecanismos de inhibición de la acción citotóxica de *C. difficile* in vitro sobre células Vero, por cepas probióticas de *L. kefir*. Se analizó el efecto antagónico de cepas *L. kefir* sobre la acción citotóxica de *Bacillus cereus* sobre células en cultivo, detectándose que *L. kefir* CIDCA 8345 y CIDCA 8348 interactúan con los factores de virulencia extracelulares del patógeno disminuyendo su efecto nocivo, lo cual podría deberse a la adsorción de toxinas o a la modificación de la actividad debido a componentes o actividades metabólicas bacterianas. Se investigó la capacidad de captura de aflatoxinas AFB1 por bacterias lácticas y levaduras aisladas de gránulos de kefir observándose que varía significativamente con el medio de cultivo empleado, posiblemente por cambios en sus componentes superficiales.

Se estudió la optimización de la deshidratación del suero fermentado. Se liofilizó suero fermentado y se evaluó la supervivencia de bacterias lácticas y levaduras al proceso. Asimismo se determinó que luego de ser reconstituido en agua el producto conserva su capacidad inhibitoria.

Se estudió el efecto de la liofilización sobre la viabilidad y propiedades probióticas *L. kefir*, *L. plantarum*, *Lac. lactis*, *Sacch. cerevisiae* y *K. marxianus* seleccionadas previamente en base a sus potenciales propiedades probióticas in Vitro. Se analizaron una mezcla microbiana (MM) suspendida en leche y leche fermentada con MM (FMM). Luego de 180 días de almacenamiento a 4°C durante 6 meses la MM liofilizada mostró mejor sobrevida para cada una de las cepas que las del FMM. La adición de azúcares (trealosa o sacarosa) no mejoró la sobrevida de ninguno de los microorganismos liofilizados. La liofilización no afectó la capacidad de MM de inhibir el crecimiento de *Shigella sonnei* in Vitro, puesto que la co-incubación del patógeno con MM liofilizado produjo una disminución de 2 log de *Shigella*. La seguridad de MM liofilizada fue testeada in vivo y no se observó traslocación de microorganismos a hígado ni bazo en ratones BALB/c alimentados ad-libitum durante 7 o 20 días.

Se estudió el comportamiento de tres microorganismos con propiedades probióticas aislados de kefir durante el secado en spray. Se evaluó el efecto de la humedad relativa durante el almacenamiento a 20 y 30°C, así como la acción de diferentes termoprotectores. Las cepas sobrevivieron bien al proceso. Las cepas seleccionadas no sufrieron daños en la membrana, mantuvieron su actividad metabólica y capacidad de adhesión a células en cultivo.

## **7. TRABAJOS DE INVESTIGACION REALIZADOS O PUBLICADOS EN ESTE PERIODO.**

**7.1 PUBLICACIONES.** *Debe hacer referencia exclusivamente a aquellas publicaciones en las que haya hecho explícita mención de su calidad de Investigador de la CIC (Ver instructivo para la publicación de trabajos, comunicaciones, tesis, etc.). Toda publicación donde no figure dicha mención no debe ser adjuntada porque no será tomada en consideración. A cada publicación, asignarle un número e indicar el nombre de los autores en el mismo orden que figuran en ella, lugar donde fue publicada, volumen, página y año. A continuación, transcribir el resumen (abstract) tal como aparece en la publicación. La copia en papel de cada publicación se presentará por separado. Para cada publicación, el investigador deberá, además, aclarar el tipo o grado de participación que le cupo en el desarrollo del trabajo y, para aquellas en las que considere que ha hecho una contribución de importancia, deberá escribir una breve justificación.*

1. P. Mobili, C. Araujo-Andrade, A. Londero, C. Frausto Reyes, R. Ivanov Tzonchev, G. De Antoni and A. Gómez-Zavaglia (2011) Development of a Method Based on

Chemometric Analysis of Raman Spectra for the Discrimination of Heterofermentative Lactobacilli. Journal of Dairy Research 78:233-241.

2. Golowczyc Marina A., Joana Silva, Paula Teixeira, Graciela L. De Antoni and Analía G. Abraham.(2011) Cellular injuries of spray-dried Lactobacillus spp. isolated from kefir and their impact on probiotic properties. International Journal of Food Microbiology, 144 (3), 556-560
3. Golowczyc Marina A., Carla L. Gerez, Joana Silva, Analía G. Abraham, Graciela L. De Antoni and Paula Teixeira (2011) Survival of spray-dried Lactobacillus kefir is affected by different protectants and storage conditions. Biotechnology Letter 33(4), 681–686.
4. A Londero, R Quinta, A G Abraham, R Sereno, G De Antoni and G L Garrote (2011) Inhibitory activity of cheese whey fermented with kefir grains. J Food Prot 74(1):94-100.
5. Emiliano Kakisu; Aurora Irigoyen; Paloma Torre; Graciela L De Antoni; Analía G Abraham (2011) Physicochemical, microbiological and sensory profiles of fermented milk containing probiotic strains isolated from kefir. Journal of Dairy Research 78:456-463
6. Paula Carasi; Fernando M Trejo; Pablo F Pérez; Graciela L De Antoni; María de los Angeles Serradell (2012) Surface proteins from Lactobacillus kefir antagonize in vitro cytotoxic effect of Clostridium difficile toxins. Anaerobe Feb: 1-8
7. A.M. León Peláez, C.A. Serna Catañod, E.A. Quintero Yepesd, R.R. Gamba Villarroel, G.L. De Antoni L. Giannuzzi. (2012) Inhibitory activity of lactic and acetic acid on Aspergillus flavus growth for food preservation. Food Control 24: 177-183
8. Alejandra Londero, María F. Hamet, Graciela L. De Antoni, Graciela L. Garrote and Analía G. Abraham (2012) Kefir grains as a starter for whey fermentation at different temperatures: chemical and microbiological characterisation. J. of Dairy Research 79 :262-271

**7.2 TRABAJOS EN PRENSA Y/O ACEPTADOS PARA SU PUBLICACIÓN.** *Debe hacer referencia exclusivamente a aquellos trabajos en los que haya hecho explícita mención de su calidad de Investigador de la CIC (Ver instructivo para la publicación de trabajos, comunicaciones, tesis, etc.). Todo trabajo donde no figure dicha mención no debe ser adjuntado porque no será tomado en consideración. A cada trabajo, asignarle un número e indicar el nombre de los autores en el mismo orden en que figurarán en la publicación y el lugar donde será publicado. A continuación, transcribir el resumen (abstract) tal como aparecerá en la publicación. La versión completa de cada trabajo se presentará en papel, por separado, juntamente con la constancia de aceptación. En cada trabajo, el investigador deberá aclarar el tipo o grado de participación que le cupo en el desarrollo del mismo y, para aquellos en los que considere que ha hecho una contribución de importancia, deberá escribir una breve justificación.*

**7.3 TRABAJOS ENVIADOS Y AUN NO ACEPTADOS PARA SU PUBLICACION.** *Incluir un resumen de no más de 200 palabras de cada trabajo, indicando el lugar al que han sido enviados. Adjuntar copia de los manuscritos.*

- 7.4 TRABAJOS TERMINADOS Y AUN NO ENVIADOS PARA SU PUBLICACION.** *Incluir un resumen de no más de 200 palabras de cada trabajo.*
- 7.5 COMUNICACIONES.** *Incluir únicamente un listado y acompañar copia en papel de cada una. (No consignar los trabajos anotados en los subtítulos anteriores).*
- 7.6 INFORMES Y MEMORIAS TECNICAS.** *Incluir un listado y acompañar copia en papel de cada uno o referencia de la labor y del lugar de consulta cuando corresponda.*
- 8. TRABAJOS DE DESARROLLO DE TECNOLOGÍAS.**
- 8.1 DESARROLLOS TECNOLÓGICOS.** *Describir la naturaleza de la innovación o mejora alcanzada, si se trata de una innovación a nivel regional, nacional o internacional, con qué financiamiento se ha realizado, su utilización potencial o actual por parte de empresas u otras entidades, incidencia en el mercado y niveles de facturación del respectivo producto o servicio y toda otra información conducente a demostrar la relevancia de la tecnología desarrollada.*
- 8.2 PATENTES O EQUIVALENTES.** *Indicar los datos del registro, si han sido vendidos o licenciados los derechos y todo otro dato que permita evaluar su relevancia.*
- 8.3 PROYECTOS POTENCIALMENTE TRANSFERIBLES, NO CONCLUIDOS Y QUE ESTAN EN DESARROLLO.** *Describir objetivos perseguidos, breve reseña de la labor realizada y grado de avance. Detallar instituciones, empresas y/o organismos solicitantes.*
- 2011- Convenio con Diagramma S.A. (2004 y 2011).
- 2012- Sello IBEROEKA 2012, consorcio CIDCA-Diagramma S.A.(Arg)-SORUS (Portugal)- Universidade Lusofona (Port).
- 8.4 OTRAS ACTIVIDADES TECNOLÓGICAS CUYOS RESULTADOS NO SEAN PUBLICABLES** *(desarrollo de equipamientos, montajes de laboratorios, etc.).*
- 8.5 Sugiera nombres (e informe las direcciones) de las personas de la actividad privada y/o pública que conocen su trabajo y que pueden opinar sobre la relevancia y el impacto económico y/o social de la/s tecnología/s desarrollada/s.**
- 9. SERVICIOS TECNOLÓGICOS.** *Indicar qué tipo de servicios ha realizado, el grado de complejidad de los mismos, qué porcentaje aproximado de su tiempo le demandan y los montos de facturación.*
- 10. PUBLICACIONES Y DESARROLLOS EN:**
- 10.1 DOCENCIA**
- 10.2 DIVULGACIÓN**
- 11. DIRECCION DE BECARIOS Y/O INVESTIGADORES.** *Indicar nombres de los dirigidos, Instituciones de dependencia, temas de investigación y períodos.*

2008 y continua- Dra. Maria Serradell  
Investigador Asistente de CONICET.  
Director: G. L. De Antoni

2010 y continua- Dra. Marina Golowczyk  
Investigador Asistente de CONICET  
Director: G. L. De Antoni.

2010 -2013- Dr. Emiliano Kakisu  
Becario posdoctoral de CONICET  
Director: G. L. De Antoni.

2010 - 2012 Paula Carasi  
Becaria Posgrado CONICET  
Director: Maria Serradell, codirector G. L. De Antoni.

2009 y continua- Raul Gamba  
Becario Posgrado CONICET  
Director: Maria Serradell, codirector G. L. De Antoni.

**12. DIRECCION DE TESIS.** *Indicar nombres de los dirigidos y temas desarrollados y aclarar si las tesis son de maestría o de doctorado y si están en ejecución o han sido defendidas; en este último caso citar fecha.*

- Patricia Bolla

Desarrollo de un alimento funcional deshidratado constituido por microorganismos aislados de kefir

Direct: G De Antoni Co-dir: P. de Urza. Lugar de trabajo: CIDCA – Cátedra de microbiología- Facultad de Ciencias Exactas – Universidad Nacional de La Plata. Fecha de defensa: 20/3/2011. Calificación: sobresaliente (10).

**13. PARTICIPACION EN REUNIONES CIENTIFICAS.** *Indicar la denominación, lugar y fecha de realización, tipo de participación que le cupo, títulos de los trabajos o comunicaciones presentadas y autores de los mismos.*

**14. CURSOS DE PERFECCIONAMIENTO, VIAJES DE ESTUDIO, ETC.** *Señalar características del curso o motivo del viaje, período, instituciones visitadas, etc.*

**15. SUBSIDIOS RECIBIDOS EN EL PERIODO.** *Indicar institución otorgante, fines de los mismos y montos recibidos.*

- PICT 2011-716. Desarrollo de Terapias combinadas para el biocontrol de Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA) y toxoinfecciones alimentarias. Diseño de estrategias de intervención en la cría de aves de corral.

- PITAP UNLP 2011 Diseño y Construcción de un Pasteurizador para la obtención de Leche fortificada con vitaminas y minerales a ser empleada en la elaboración de kefir. Proyecto transdisciplinario para producción en pequeños tambos de leche pasteurizada, fortificada con vitaminas y minerales, para producción de kefir en comunidades desfavorecidas socioeconómicamente.

- CYTED Red temática 108RT0363. Responsable del grupo CIDCA: G. De Antoni "Red Iberoamericana para evaluar la factibilidad del desarrollo de nuevos productos en la alimentación animal. Aprovechamiento de efluentes quesería para la producción de probióticos". Coordinadora: Dra. Andrea Gómez-Zavaglia. Director responsable en el CIDCA: Dra. Graciela De Antoni. Desde el 1/1/08 al 1/1/11

**16. OTRAS FUENTES DE FINANCIAMIENTO.** *Describir la naturaleza de los contratos con empresas y/o organismos públicos.*

**17. DISTINCIONES O PREMIOS OBTENIDOS EN EL PERIODO.**

**18. ACTUACION EN ORGANISMOS DE PLANEAMIENTO, PROMOCION O EJECUCION CIENTIFICA Y TECNOLÓGICA.** *Indicar las principales gestiones realizadas durante el período y porcentaje aproximado de su tiempo que ha utilizado.*

Decana de la Facultad de Ciencias Exactas (2010-2014)

**19. TAREAS DOCENTES DESARROLLADAS EN EL PERIODO.** *Indicar el porcentaje aproximado de su tiempo que le han demandado.*

Dictado de dos cursos semestrales de grado para las carreras de Licenciatura en Química, Licenciatura en Química y Tecnología Ambiental, Licenciatura en Ciencia y Tecnología de Alimentos: Introducción a la Microbiología y Microbiología de Alimentos 2011, 2012 y 2013. Nueve horas semanales todo el año.

**20. OTROS ELEMENTOS DE JUICIO NO CONTEMPLADOS EN LOS TITULOS ANTERIORES.** *Bajo este punto se indicará todo lo que se considere de interés para la evaluación de la tarea cumplida en el período.*

PROYECTO DE EXTENSIÓN:

-Nombre del proyecto acreditado: "Kefir, un alimento probiótico a costo cero para comedores comunitarios" Director: Graciela De Antoni, codirector Ing.Ángela María León Peláez

- Breve descripción de la tarea de extensión desarrollada en el período.  
Se realizaron visitas semanales a los comedores para realizar el seguimiento de la elaboración del producto, recolección periódica de excedente de gránulos y toma cuatrimestral de muestra para determinar inocuidad del producto. Los gránulos y la leche fermentada recolectados, fueron evaluados microbiológicamente tres veces durante el año, según las indicaciones del Código Alimentario Argentino, encontrándose la ausencia de posibles contaminantes y corroborando de esta manera la inocuidad de los mismos. Se entregaron los informes microbiológicos a las encargadas de los comedores, acompañados de una asesoría técnica.

**21. TITULO Y PLAN DE TRABAJO A REALIZAR EN EL PROXIMO PERIODO.** *Desarrollar en no más de 3 páginas. Si corresponde, explicita la importancia de sus trabajos con relación a los intereses de la Provincia.*

“Terapias combinadas para el biocontrol de Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA) y toxoinfecciones alimentarias. Diseño de estrategias de intervención en la cría de aves de corral.”

La producción avícola nacional es una actividad en plena expansión, originando una importante transformación de productos primarios y generando altas tasas de empleo en zonas rurales y urbanas. Tanto en carne como en huevo, la actividad proyecta un sostenido crecimiento anual, ya sea para consumo interno o exportación. Para apuntalar a este desarrollo comercial es necesario generar información que permita incrementar la competitividad de los productos avícolas producidos en Argentina. Por otro lado, la presencia de bacterias asociadas a Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA) en estos productos, debido fundamentalmente a la cría intensiva de aves, hace necesario implementar estrategias efectivas de control para garantizar la inocuidad y mejorar la calidad de estos productos.

El uso de pre y probióticos ha sido propuesto y aceptado como un mecanismo de biocontrol de bacterias patógenas causantes de ETA y hongos causantes de toxoinfecciones alimentarias. En ese sentido se han desarrollado varios productos comerciales para el biocontrol de estos microorganismos en aves de corral y sus productos derivados. Sin embargo, no existen evidencias concluyentes que sustenten la efectividad de estos productos, y por el contrario han sido publicados gran cantidad de trabajos de investigación en el campo de las bacterias probióticas donde se demuestra la efectividad parcial *in vitro* de las mismas sobre algunas bacterias patógenas causantes de ETA, y en micotoxinas producidas por hongos como *Fusarium spp.*, *Aspergillus spp.* y *Penicillium spp.*. Sin embargo, el método más ampliamente aceptado para el control de bacterias es el uso de antibióticos. Actualmente el abuso de antibióticos en animales ha provocado problemas serios en la evolución de los perfiles de resistencia a antibióticos en varias bacterias patógenas causantes de ETA. Si a esto le sumamos el empleo de antibióticos como estimuladores del crecimiento de animales el problema es aún más severo. Con respecto al control de hongos, se utilizan ácidos, compuestos antifúngicos y agentes secuestrantes de micotoxinas en los alimentos para animales significando esto último un elevado incremento en el costo de producción.

Otras estrategias de control incluyen la modificación de la dieta o el uso de vacunas. Más recientemente se han reflatado estudios sobre la efectividad de la fagoterapia como metodología para el biocontrol de bacterias. El uso de probióticos multicepas o de cocteles de varios fagos se ha planteado como estrategia para el biocontrol. Así, el uso de estas terapias combinadas de manera eficaz, permitiría emplear varias estrategias de control, disminuyendo y desplazando al uso de antibióticos como la más eficaz y sencilla de todas. En consecuencia con el uso racional de los antibióticos exclusivamente de manera terapéutica, controlarían la diseminación de resistencia y el posterior problema que surge en el tratamiento en humanos de patógenos causantes de ETA.

Se propone entonces para disminuir el impacto en Salud Pública de las ETA y toxoinfecciones, el empleo de probióticos y fagos de manera combinada como estrategia de biocontrol en la cría de aves de corral. En particular dada la importancia epidemiológica de *Salmonella* y hongos como *Fusarium spp.*, *Aspergillus spp.* y *Penicillium spp.* en nuestro país, el trabajo se centrará especialmente en los microorganismos mencionados y sus micotoxinas.

En base a lo expuesto se proponen en este proyecto tres objetivos generales:

1- Formulación de una mezcla para biocontrol (MBC) de bacteriófagos, microorganismos probióticos y metabolitos microbianos.

2- Estudio del mecanismo de acción de la MBC in vitro e in vivo en modelos animales establecidos.

3- Biocontrol ambiental de hongos toxicogénicos y Salmonella en alimento y huevos de aves de corral mediante la adición de MBC.

4- Biocontrol in vivo de Salmonella y absorción de micotoxinas en pollos mediante la administración por vía oral de MBC.

La aplicación de una terapia combinada de bacteriófagos y microorganismos probióticos en la alimentación y crianza de aves de corral podría contribuir en la disminución de la incidencia de Salmonella, y a la vez evitar el crecimiento fúngico en el ambiente y la absorción de micotoxinas en el animal. Dada la importancia epidemiológica de los brotes en granjas de producción de aves de corral de Salmonella enterica subesp. enterica serovar Enteritidis (de ahora en adelante referida como S. Enteritidis), agente causal de ETA, nuestro trabajo se centrará en este patógeno.

Para ello se plantean una serie de experimentos tanto in vitro como in vivo donde se aplicarán diferentes mezclas para biocontrol en el ambiente, en el alimento para pollos, y se evaluará la eficacia de las mismas en aves de cría comparando entre grupos controles sin tratamiento y grupos sometidos a otros tratamientos.

Para desarrollar los objetivos generales planteados en el punto anterior, se definen los siguientes objetivos específicos:

1. Formulación de una mezcla para biocontrol (MBC) de Salmonella spp., Fusarium spp., Aspergillus spp. y Penicillium, y sus micotoxinas.

1.1 Aislamiento, caracterización y selección de bacteriófagos líticos empleando cepas de origen animal de S. Enteritidis.

1.2 Selección de microorganismos probióticos como componentes de la MBC y estudios in-vitro de su compatibilidad.

1.3 Optimización de las condiciones de crecimiento, concentración y conservación de los componentes de la MBC.

2 Estudio del mecanismo de acción de la MBC in vitro e in vivo en modelos animales establecidos.

2.1.a Aislamiento y caracterización fenotípica y molecular de hongos a partir de alimentos para aves.

2.1.b Estudio in vitro de la capacidad de la MBC para inhibir el desarrollo de hongos toxigénicos, y secuestrar micotoxinas.

2.2 Estudio in vitro de la capacidad de la MBC para inhibir el desarrollo y la acción patogénica de S. Enteritidis.

2.3 Estudio in vivo en modelo murino de la acción de la MBC .

3 Biocontrol ambiental de hongos toxicogénicos y Salmonella.

3.1 Estudio de la efectividad de la MBC para disminuir la incidencia de S. Enteritidis en cascaras de huevos.

3.2 Estudio de la efectividad de la MBC en la eliminación de S. enteritidis de agua de bebida y alimento para pollos y gallinas ponedoras.

3.3 Estudio de la robustez del tratamiento con la MBC en el alimento para pollos y gallinas ponedoras frente a la contaminación con conidios.

4 Biocontrol in vivo de Salmonella y de la absorción de micotoxinas en aves de producción.

4.1. Estudio de la efectividad de la MBC en el control de un brote de Salmonella en aves de producción.

4.2 Ensayos de biocontrol empleando la MBC en aves de producción infectadas con S. Enteritidis.

#### 4.3. Estudio de la efectividad de la MBC en el control de intoxicaciones de aves de corral con micotoxinas.

La seguridad alimentaria se ha convertido en los últimos años en un tema central en la agenda de la industria de alimentos y fundamentalmente de los organismos públicos de control a nivel mundial. Mas allá de todas las medidas y esfuerzos realizados por todas las partes involucradas en el tema, aún se registra un impacto importante sobre la salud de la población mundial que involucra fundamentalmente las Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA) causadas por diversos microorganismos y toxoinfecciones causadas por hongos. Existe una demanda creciente a nivel global de seguridad alimentaria y en particular apuntando a mecanismos o estrategias de control en los inicios de la cadena de producción y elaboración de producto (Havelaar et al. 2010). En el centro de atención de las ETA se encuentran aquellas originadas en el consumo de productos avícolas contaminados.

La producción avícola en Argentina es una actividad en expansión, originando una importante transformación de productos primarios (maíz y soja fundamentalmente) y generando altas tasas de empleo en zonas rurales y urbanas. La Argentina, país productor de granos, está en una situación privilegiada para la elaboración de alimentos económicos para aves. Es mucho más rentable para nuestro país exportar carne y huevos con un 10% más de valor agregado que exportar los granos como tales. Por otro lado, la necesidad de proteínas de alto valor nutritivo es cada vez mayor en el mundo (SAGPyA, 2007). La alta demanda de producción genera una producción intensiva nacional que requiere el control de distintos contaminantes microbianos. Además, la exportación de productos avícolas requiere que éstos contemplen el control de enfermedades que afectan la salud pública y al comercio internacional. Por otra parte, dado que la cría avícola para consumo doméstico o en una escala de comercialización pequeña es alentada por distintos programas nacionales, se hace necesario incorporar prácticas sencillas que garanticen la seguridad alimentaria e inocuidad de los productos obtenidos. Se trata entonces de controlar la incidencia de Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA), ligadas en este caso a la producción avícola. Si bien debe existir un control que asegure la calidad microbiológica del alimento en toda la cadena de producción, la prevención de ETA debe ser abordada desde la fuente inicial del problema, esto es comenzando desde la misma crianza de las aves (Gast et al. 2003; Doyle and Erickson 2011). Las estrategias de intervención en granjas deben pensarse en dos instancias: una dirigida a la reducción de patógenos en el ambiente, y la otra dirigida a la disminución o eliminación de los patógenos en los animales. En referencia a esta última opción, el método más ampliamente aceptado para el control de bacterias es el uso de antibióticos, a pesar de no ser reconocido por los propios productores. Actualmente el abuso de antibióticos en animales ha provocado problemas serios en la evolución de los perfiles de resistencia a antibióticos en varias bacterias patógenas causantes de ETA. En un estudio hecho en Canadá se demostró que un aumento registrado en la resistencia a cefalosporinas de aislados de patógenos humanos, se correlacionaba con el uso extensivo de estos antibióticos en granjas de cría de pollos (Turnidge 2004; Webster 2009). Si a esto le sumamos el empleo de antibióticos como estimuladores del crecimiento de animales el problema es aún más severo. Con respecto al control de hongos, se utilizan ácidos, compuestos antifúngicos y agentes secuestrantes de micotoxinas en los alimentos para animales significando esto último un elevado incremento en el costo de producción.

El uso de pre y probióticos ha sido propuesto y aceptado como un mecanismo de biocontrol de bacterias patógenas causantes de ETA y hongos causantes de toxoinfecciones alimentarias (Doyle and Erickson 2011). En ese sentido se han desarrollado varios productos comerciales para el biocontrol de estos microorganismos en aves de corral y sus productos derivados (Callaway et al. 2008). Con el objeto de

reducir particularmente *Salmonella* en aves se han publicado varios trabajos que emplean probióticos. Entre otros podemos resaltar los siguientes: se ha ensayado una combinación por alimentación oral de *L. reuteri* y *L. johnsonii* en pollos desafiados previamente con *S. Enteritidis*, lográndose disminuir 10 veces el título de bacterias en células de bazo, hígado y ciego comparado con los controles (Van Coillie et al. 2007). En otro ensayo, un lote de pollos fue tratado con *L. salivarius* y *Streptococcus cristatus* por vía oral luego de haber sido desafiados con una mezcla de *S. Enteritidis*, *S. Kentucky* y *S. Typhimurium*. Se observó nuevamente reducción en el recuento de *Salmonella* del 41% comparado con los lotes control (Zhang et al. 2007). Resultados similares fueron hallados por Vila y col. (Vila et al. 2009), y Higgins y col. (Higgins et al. 2007; Higgins et al. 2010). Los microorganismos usados principalmente como probióticos en animales incluyen los géneros *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Bacillus*, aunque algunas levaduras del género *Saccharomyces* también han sido usadas (Gaggia et al. 2010; Vandeplass et al. 2010). Entre los efectos que producen las bacterias probióticas se ha descrito además de la inhibición potencial del patógeno, la capacidad para inmodular (Brisbin et al. 2010; Higgins et al. 2011).

Otra de las estrategias de biocontrol consiste en el empleo de bacteriofagos para reducir o eliminar patógenos tanto en el ambiente como en el animal. Dado que los ciclos de reproducción de fagos pueden ser líticos o lisogénicos, en los procesos de biocontrol se evita el empleo de fagos lisogénicos porque se integran al genoma de la bacteria que infectan. Como consecuencia de esto puede ocurrir transferencia de genes de una bacteria a otra lo que puede provocar una diseminación de genes de resistencia a antibióticos o virulencia entre la microbiota normal de los animales y las bacterias patógenas. Entre las ventajas del empleo de fagos se encuentra su especificidad por el huésped, lo cual puede resultar eventualmente una desventaja si es el que rango de huésped resulta estrecho (Dini and De Urza 2010). Idealmente, se deben seleccionar fagos cuyo receptor sea una molécula de superficie presente en varios patógenos relacionados, como por ej. varias serovariedades de *Salmonella*. En caso de ser usados por vía oral, otra limitación puede ser la resistencia al pH dado que se ha reportado que por debajo de pH 4 se pierde inefectividad (Dini and De Urza 2010). Pero el agregado de buffers inmediatamente después de la ingestión de los fagos y el uso de polímeros para encapsular pueden atenuar la pérdida de inefectividad (Niu et al. 2008; Zhang et al. 2010). Otra estrategia empleada con éxito es el uso de fagos pulverizados en aerosol (Borie et al. 2009). Numerosos trabajos han sido reportados con aislados de fagos para biocontrol o eliminación de *Salmonella* en aves de corral. Andreatti Filho y col. (Andreatti Filho et al. 2007) han reportado una disminución entre 45 y 70% de *S. Enteritidis* en pollos infectados previamente, comparando con el control sin tratar con fagos. Atterbury y col. (Atterbury et al. 2007) reportaron una disminución de entre 2 y 4 log en el recuento de *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium* comparado con el control sin tratar. Recientemente se han publicado varios trabajos, algunos con reportes similares y otros en los que el efecto del tratamiento con fagos es casi nulo o nulo (Borie et al. 2008; Higgins et al. 2008; Hurley et al. 2008; Johnson et al. 2008; Capparelli et al. 2010; Gebu et al. 2010; Sillankorva et al. 2010; Vandeplass et al. 2010; Wall et al. 2010; Callaway et al. 2011). En estos últimos trabajos se pone énfasis en la necesidad de profundizar el estudio del uso de los fagos como herramienta de biocontrol enfatizando la necesidad a optimizar las condiciones de su aplicación (Doyle and Erickson 2011).

Otro problema en la producción avícola es la presencia de hongos y micotoxinas en los alimentos y camas de criaderos de aves, los que generan pérdidas grandes de producción. A partir de alimentos para animales se aíslan con frecuencia hongos de los géneros *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp., *Fusarium* spp., *Mucor* spp., *Rhizopus* spp., *Cunninghamella* spp., *Cladosporium* spp., *Phoma* spp., *Endomyces* spp. y *Eurotium* spp (Bueno, 2000). Las micotoxinas son metabolitos altamente tóxicos producidos por una variedad de hongos, en especial los pertenecientes a los géneros *Aspergillus*,

Penicillium y Fusarium. Aspergillus y Penicillium son encontrados generalmente como contaminantes en alimentos durante el secado y almacenamiento y las especies de Fusarium pueden producir micotoxinas antes o después de la cosecha (CAST, 2003). Las micotoxinas más importantes en aves y cerdos son las aflatoxinas, ocratoxina A (OTA), zearalenona (ZEA), fumonisinas, citrinina y los tricotecenos deoxinivalenol (DON o vomitoxina) y toxina T-2 (Daghir, 1998, Tapia, 1986).

Dentro de las principales estrategias que se han aplicado hasta ahora en prevención de los efectos tóxicos de los alimentos contaminados por micotoxinas se encuentran la prevención de la contaminación por éstas durante la precosecha, cosecha y poscosecha y la detoxificación de micotoxinas presentes en los alimentos (CAST, 2003). Las medidas preventivas buscan la inhibición de la formación de micotoxinas en los productos agrícolas y son la estrategia más efectiva para evitar la exposición de los animales. Sin embargo, cuando la contaminación no es prevenida durante los períodos de precosecha, cosecha y poscosecha, se pueden emplear algunas estrategias para remover o detoxificar las micotoxinas de los alimentos, incluyendo técnicas físicas, químicas y biológicas. El uso de los métodos físicos y químicos para la detoxificación de alimentos contaminados con micotoxinas es limitado debido a problemas de seguridad, posible pérdida del valor nutricional, eficacia limitada y costos altos (Kabak et al., 2006). Esto ha llevado a buscar otras alternativas, como el uso de agentes biológicos para la decontaminación.

Las bacterias lácticas producen compuestos antimicrobianos, como los ácidos láctico y acético, peróxido de hidrógeno, bacteriocinas y pueden competir con otras especies acidificando el medio y disminuyendo rápidamente los nutrientes (Gourama y Bullerman, 1995, De Muyneck y col., 2004). Aunque el uso de bacterias lácticas ha producido resultados alentadores in vitro, este trabajo debe ser extendido in situ a sistemas que involucren alimentos de humanos y de animales. Algunas levaduras como *Pichia anomala*, *Pichia guillermondii* y *Saccharomyces cerevisiae* pueden disminuir el crecimiento de hongos contaminantes bajo condiciones similares a las del almacenamiento de los cereales (Petersson y Schnürer, 1995).

Para que un alimento contaminado con micotoxinas pueda ser utilizado, existe la opción de remover o degradar la toxina a compuestos menos tóxicos o sin toxicidad. Existe una gran variedad de bacterias y hongos con capacidad de degradar o remover distintas micotoxinas de una solución, pero pocas han pasado las pruebas in vivo (Kabak y Dobson, 2009). Diferentes bacterias lácticas han demostrado ser eficientes en la remoción de aflatoxina B1 (AFB1) y ZEA de distintos medios líquidos, actuando como secuestrantes biológicos (El-Nezami et al., 1998, 2002). Para AFB1 se conoce que este proceso responde a una adsorción de tipo física (pared celular bacteriana- AFB1) en un proceso rápido (menos de 1 minuto), siendo la unión reversible tanto en bacterias vivas como muertas y dependiente de la cantidad de toxina y de la concentración bacteriana (Bueno et al., 2007). En ensayos realizados en intestino de pollos inyectados con una mezcla probiótica compuesta por *Lactobacillus rhamnosus* LC-705 y *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *Shermanii* JS (Bioprofit) y con AFB1, se observó que sólo el 25% de la toxina fue capturada por las bacterias, aunque la absorción intestinal de la toxina se redujo de manera importante. De todos modos, el mucus intestinal disminuyó la unión de AFB1 a las bacterias (Gratz et al., 2005). Lo anterior permitió concluir que la mezcla probiótica puede sólo reducir pero no prevenir la absorción de AFB1 en el intestino. Se ha encontrado que *Lactobacillus rhamnosus* GG disminuye la absorción de AFB1 en el tejido intestinal de pollo, lo que la hace una bacteria interesante para ser analizada en estudios in vivo (El-Nezami et al., 2000). Para el caso de ZEA, DON y fumonisinas B1 y B2 (FB1, FB2), puede existir una unión entre cepas de *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, y propionibacterias con esta toxina en condiciones in vitro (El-Nezami et al., 2002, Niderkon et al., 2006, 2007), y algunos lactobacilos y *Leuconostoc* pueden transformar ZEA a  $\alpha$ -zearalenol, un

compuesto menos tóxico (Niderkorn et al., 2007). Diferentes levaduras han demostrado su capacidad secuestrante debido a su pared celular. Un glucomanano esterificado de *Sacharomyces cerevisiae*, es utilizado en diferentes productos comerciales como adsorbente de AFB1, OTA y toxina T-2 en aves comerciales (Raju y Devegowda, 2000), pero no contra DON (Dänicke et al., 2007). Otro componente de la pared celular de *S. cerevisiae*,  $\beta$ -D glucano, está relacionado con la unión a ZEA (Yiannikouris et al., 2004). Estudios utilizando una cepa bacteriana y una levadura dieron lugar a un suplemento microbiano patentado (Biomin MTV), capaz de detoxificar todo tipo de tricotecenos, ZEA y OTA (Schatzmayr, 2004).

De todo lo anterior se desprende la necesidad de formular un producto que contenga tanto microorganismos probióticos como bacteriofagos para ser usados en biocontrol de microorganismos patógenos como *Salmonella*, hongos toxicogénicos y sus micotoxinas, ya reconocidos como causantes de grandes pérdidas en el sector avícola.

---

### **Condiciones de la presentación:**

- A. El Informe Científico deberá presentarse dentro de una carpeta, con la documentación abrochada y en cuyo rótulo figure el Apellido y Nombre del Investigador, la que deberá incluir:
  - a. Una copia en papel A-4 (puntos 1 al 21).
  - b. Las copias de publicaciones y toda otra documentación respaldatoria, en otra carpeta o caja, en cuyo rótulo se consignará el apellido y nombres del investigador y la leyenda "Informe Científico Período .....".
  - c. Informe del Director de tareas (en los casos que corresponda), en sobre cerrado.
- B. Envío por correo electrónico:
  - a. Se deberá remitir por correo electrónico a la siguiente dirección: [ininvest@cic.qba.gov.ar](mailto:ininvest@cic.qba.gov.ar) (puntos 1 al 21), en formato .doc zipeado, configurado para papel A-4 y libre de virus.
  - b. En el mismo correo electrónico referido en el punto a), se deberá incluir como un segundo documento un currículum resumido (no más de dos páginas A4), consignando apellido y nombres, disciplina de investigación, trabajos publicados en el período informado (con las direcciones de Internet de las respectivas revistas) y un resumen del proyecto de investigación en no más de 250 palabras, incluyendo palabras clave.

---

**Nota:** El Investigador que desee ser considerado a los fines de una promoción, deberá solicitarlo en el formulario correspondiente, en los períodos que se establezcan en los cronogramas anuales.