

CARRERA DEL INVESTIGADOR CIENTÍFICO Y TECNOLÓGICO

Informe Científico¹

PERIODO ²: 2013-2015

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

“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.”

3. DATOS RELATIVOS A INGRESO Y PROMOCIONES EN LA CARRERA

INGRESO: Categoría: Asistente Fecha: Septiembre 187

ACTUAL: Categoría: Principal desde fecha: Julio 2004

4. INSTITUCION DONDE DESARROLLA LA TAREA

Universidad y/o Centro: UNLP

Facultad: Ciencias Exactas

Departamento: Ciencias biológicas

Cátedra: Microbiología

Otros: CIDCA

Dirección: Calle: 47 y 115 N°:

Localidad: La Plata CP: 1900 Tel: 4226979

Cargo que ocupa: Profesor Titular DE

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

Apellido y Nombres:

Dirección Particular: Calle: N°:

Localidad: CP: Tel:

Dirección electrónica:

¹ Art. 11; Inc. “e” ; Ley 9688 (Carrera del Investigador Científico y Tecnológico).

² 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.

.....
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.

Hasta el momento se lograron los siguientes resultados

- Aislamiento y caracterización molecular de hongos filamentosos a partir de alimento para pollos y el estudio de su inhibición mediante sobrenadantes de permeado de suero fermentado con gránulos de kefir y microorganismos aislados.
- Estudio de la capacidad de secuestrar aflatoxina AFB1 con microorganismos completos del permeado de suero fermentado con gránulo de kefir y con *L. plantarum* 83114 y *Kluyveromyces marxianus* 8154 cultivados en permeado de suero. Los estudios de captura se hicieron bajo diferentes condiciones como tiempos de desafío microorganismo aflatoxina, pH del medio, concentración de microorganismo y viabilidad de éste.
- Se optimizó la fermentación del permeado de suero con microorganismos aislados del gránulo de kefir y se determinó su supervivencia a diferentes tiempos, diluciones y temperaturas de almacenamiento, a fin de ajustar las condiciones de suministro del producto a los animales
- Efecto del permeado de suero fermentado con *L. plantarum* 83114 sobre distintos parámetros de crecimiento y productivos en pollos parrilleros en el INTA de Concepción del Uruguay bajo la coordinación del Dr. Dante Bueno.
- Estudio de la dosis infectiva de *Salmonella tiphymurium* aislada de pollos (granjas de Entre Ríos), en modelo murino.
- Estudio de la capacidad de los microorganismos del gránulo de kefir de leche aislados y en conjunto de secuestrar aflatoxina AFB1 in vitro simulando algunas de las condiciones del tracto gastrointestinal humano.
- Estudio de la actividad antifúngica del kefir de leche y su efecto sobre la vida útil y las propiedades sensoriales de la Arepa Antioqueña
- Aislamiento y caracterización a nivel molecular de hongos provenientes de alimento para pollos y de ambiente de galpón.
- Estudio de la capacidad del permeado de suero fermentado con gránulo de kefir de leche de inhibir hongos filamentosos aislados de alimento para pollos y de alterar la producción de aflatoxina AFB1 in vitro y en el alimento.
- Estudio de la capacidad de los anteriores productos fermentados de prolongar la vida útil del pan negro y de su efecto sobre las propiedades sensoriales.
- Estudio del efecto de la inocuidad de la administración de *L. plantarum* 83114 sobre pollos parrilleros (parámetros zootécnicos, funcionamiento hepático y renal, traslocación del microorganismo y estudio histológico en hígado y baso).
- Estudio de las capacidades fermentativas, recuentos microbiológicos, cinética de acidificación y actividad antifúngica de diferentes sustratos (pana, azúcar de moscabo, miel de caña y azúcar refinada) fermentados con gránulos de kefir de agua.
- Estudio de las propiedades microbiológicas, fermentativas, antibacterianas y sensoriales del gránulo de kefir de leche liofilizado y almacenado durante 6 meses a 4°C.

A. Caracterización de los productos fermentados con kefir (CIDCA-Lab. de Microbiología General)

1. Inhibición de *Bacillus cereus* por leche fermentada con kefir

Se evaluó el posible efecto antagónico del kefir sobre la inhibición de la germinación de esporos de *B. cereus* y el desarrollo de sus formas vegetativas, como también la posibilidad de impedir la formación de toxinas y antagonizar su acción sobre células intestinales en cultivo. Los resultados de las cinéticas demostraron que el kefir elaborado con un alto porcentaje de inóculo ejerció un efecto inhibitorio impidiendo la germinación de los esporos de *Bacillus cereus*. La presencia de toxina no fue detectada en las muestras donde se inocularon concentraciones de *B. cereus* de entre 1 a 100 esporos por gramo de leche. Los ensayos de citotoxicidad mostraron que, en las mismas condiciones, no se produjo desprendimiento de las células Caco-2. La ausencia de acción tóxica fue atribuida al efecto protector de los microorganismos presentes en el gránulo de kefir y de sus metabolitos. Los resultados demostraron la potencialidad del kefir de inhibir el desarrollo de *Bacillus cereus* cuando se elabora con leche en polvo y la capacidad in vitro de antagonizar el efecto citotóxico sobre células intestinales.

3. Inhibición del crecimiento de *A. flavus* y *A. parasiticus* por leche y permeado de suero fermentados con kefir y captura de micotoxinas

Se ha estudiado la capacidad de los SLCs de leche y permeado de suero fermentados con gránulos de kefir CIDCA AGK1 y AGK2 de inhibir el crecimiento fúngico a diferentes pHs y concentraciones. Se ha encontrado que el kefir de leche a pH inferior a 3,5 y en concentración $\frac{1}{2}$ en el medio de cultivo logra reducir la tasa de crecimiento de *A. flavus* y *A. parasiticus* y prolongar su fase de latencia. El kefir de leche también genera inhibición entre el 40-80% de la germinación de los conidios de estos hongos (León et al., 2008). En estudios realizados con permeado de suero fermentado con los mismos gránulos hemos encontrado que a pH superior de 3,9, la germinación de conidios de *A. flavus*, *A. parasiticus*, *Rhizopus* sp. y *Penicillium* sp. se reduce al 90% (León et al. 2011). De otro lado, hemos hallado que diferentes cepas de *L. plantarum*, *L. kefir*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Kluyveromyces marxianus* capturan in vitro aflatoxina AFB1 (León et al., 2010). Por último, se ha podido demostrar que la adición de permeado de suero y suero fermentados con los gránulos arriba descriptos, incrementa el tiempo de aparición visible de hongos en el alimento –cuando es contaminado con conidios- entre 15 y 30 días con respecto al control. Finalmente, los probióticos adicionados en el fermento de gránulo al alimento, han resistido el almacenamiento a 15, 30 y 60 días a 20 °C (Londero et al., 2011).

4. Efecto de la administración de kefir entero y de cepas aisladas de kefir en un modelo murino de infección para *Salmonella enterica* serovar Enteritidis.

Estos ensayos se realizaron empleando la cepa de ratón BALB/c (hembras de 6 a 8 semanas de vida) y lotes de entre 5 y 10 animales de acuerdo al experimento. El patógeno fue administrado por vía oral (con sonda intragástrica) mientras que el kefir o las cepas en estudio fueron adicionadas al agua de bebida (recambio diario).

a) Puesta a punto de las condiciones de infección: se realizaron ensayos de dosis-respuesta administrando suspensiones de salmonella de diferente concentración (100 ul por ratón) y se seleccionó la dosis de 106 ufc/ml para los estudios posteriores.

b) Ensayos de traslocación: se realizaron ensayos para evaluar la posible traslocación extraintestinal de los microorganismos administrados. Para ello se administraron a distintos lotes de animales durante 7 días diferentes diluciones de kefir entero de 24 hs de fermentación y una suspensión de *L. plantarum* CIDCA 83114 (106, 108 y 109 ufc/ml). Se realizaron recuentos de microorganismos viables en agar MRS a partir de muestras de hígado y bazo. No se observó traslocación en ninguno de los animales analizados. Se seleccionaron la dilución de kefir 1/50 y la concentración de CIDCA 83114 109 ufc/ml para los ensayos posteriores.

c) Ensayos de tratamiento-infección: empleando las dosis y vías de infección y de tratamiento seleccionadas y lotes de 10 animales, se realizaron ensayos para evaluar el efecto de la administración de kefir entero y de cepas aisladas sobre la infección por *Salmonella* mediante curvas de supervivencia. En el primer ensayo realizado se observó

que el tratamiento con kefir entero y con la cepa *L. plantarum* CIDCA 83114 produjo un aumento del número de sobrevivientes desde el día 4 hasta el día 7 post-infección. En base a lo observado, se realizaron ensayos con el objetivo de evaluar diferentes parámetros (supervivencia y estado general de los animales, análisis de la flora, traslocación, histología intestinal, IgA fecal, IgG sérica, proliferación antígeno-específica de esplenocitos).

B Selección de cepas para desarrollar el concentrado bacteriano

1. Aislamiento y caracterización de microorganismos

a) Se confirmó la identificación de las cepas de lactobacilos aislados de kefir por métodos basados en ácidos nucleicos (secuencia del espaciador 16-23S, ARDRA, AP-PCR, Rep-PCR) y espectroscopia de infrarrojo (FT-IR). Estos estudios se realizaron en colaboración con la Dra. Semorile de la UNQ y el Dr. Yantorno del CINDEFI.

Se amplió la colección de levaduras. Actualmente contamos con 40 levaduras a partir de gránulos de kefir de diferentes procedencias. Mediante técnicas fenotípicas (métodos bioquímicos y espectroscópicos vibracionales) se determinó la presencia los géneros *Kluyveromyces*, *Saccharomyces* e *Issatchenkia*.

En cuanto a sus características probióticas, se determinó que 31 de los aislados mantienen su concentración viable luego de ser sometidos durante 2 hs y 37°C a pH 2,5. De ellos el 77,4% son altamente resistentes a la bilis, mientras que un 22% mostró resistencia moderada. En base a estas características, que les permitirían resistir el pasaje por el tracto gastrointestinal, se seleccionaron 20 aislados a los que se les determinó la capacidad de inhibir in vitro el desarrollo de microorganismos patógenos mediante ensayos de difusión en agar. Se observó que 10 levaduras aisladas de distintos gránulos de kefir producen halos de inhibición del crecimiento de *Escherichia coli*, *Salmonella* sp., *Staphylococcus aureus*, y/o *Bacillus cereus*. Además se observó que algunas levaduras presentan actividad inmunomoduladora en sistemas in Vitro.

b) Se caracterizaron las bacterias lácticas y levaduras aisladas de gránulos de kefir y de bifidobacterias aisladas de neonatos sanos en cuanto a sus propiedades probióticas tales como la capacidad inhibitoria frente a *Salmonella*, *E. coli* EHEC y *Clostridium difficile*. También se caracterizó el efecto protector de cepas aisladas de kefir en cuanto a la acción de toxinas Shiga de EHEC in vitro.

i- De 24 cepas ensayadas se encontraron 3 de *Lb. plantarum* (CIDCA 8336, 83114 y 8338) con mayor actividad bactericida contra *E. coli* O157:H7. Se está estudiando el mecanismo de acción inhibitoria ya que los sobrenadantes de las cepas mencionadas poseen menor concentración de ácido láctico que otras y aún así su poder inhibitorio frente a *E. coli* es mayor.

ii- De 22 cepas de *Lb. kefir* se encontraron 4 con capacidad de coagregar con *Salmonella* disminuyendo la capacidad de invadir enterocitos (Caco-2/TC7) in vitro. Por otra parte, la Capa-S de *Lb. kefir*, presente en el sobrenadante de cultivos en leche en una concentración de 0.1 mg/ml, inhibe la internalización de *Salmonella* en enterocitos in vitro. Los estudios realizados indican que la capa-S de *Lb. kefir*, proteína hidrofóbica autoensamblable de 69-71 kDa, se deposita en la superficie de *Salmonella* enmascarando los factores de virulencia superficiales esenciales para la internalización.

iii- Los ensayos realizados con sobrenadantes de EHEC indican que estructuras superficiales de varias cepas de *Lb. plantarum* poseen la capacidad de evitar el daño que produce la toxina Shiga sobre células Vero. La protección de células Vero también se evidencia con las paredes bacterianas y depende de factores termolábiles presentes en la superficie de los lactobacilos

Se están estudiando los mecanismos de acción probiótica de las cepas mencionadas y de los productos de su metabolismo, encontrándose que los ácidos orgánicos son los principales responsables de la acción bacteriostática y bactericida, pero no se puede descartar en algunos casos especiales la presencia de otras sustancias aún no identificadas.

2. Capacidad de crecer en diferentes condiciones y estudio de compatibilidad entre cepas

Se optimizaron las condiciones de desarrollo de los microorganismos constituyentes del concentrado bacteriano en leche y se está estudiando el sinergismo/antagonismo entre los mismos. La leche fermentada con *Lb. plantarum* CIDCA 83114 y *Kluyveromyces marxianus* CIDCA 8154 permite obtener un producto de pH 4,0-4,5, con una concentración de microorganismos de 109 ufc/ml y una concentración de lactosa diez veces inferior a la de la leche deslactosada comercial. Este producto se podría utilizar en un futuro para personas intolerantes a la lactosa.

Fermentación de suero con gránulos de kefir: resultados previos de nuestro laboratorio indican que los gránulos de kefir son capaces de acidificar suero de leche, de quesería líquido y en polvo reconstituido, aumentando su tamaño con los repiques sucesivos. La compleja microflora asociada a la matriz del gránulo se reproduce y parte de ella es liberada al suero. Durante la fermentación de suero con kefir a 20°C ocurre un descenso del pH, una disminución del contenido de lactosa y se produce polisacárido. Además, en el suero fermentado la microflora de kefir permanece viable y datos preliminares indican que este producto posee propiedades inhibitorias in vitro contra bacterias gram negativas.

3. Resistencia de las cepas a las condiciones de almacenamiento y conservación

Se liofilizaron las siguientes bacterias y levaduras aisladas de Kefir seleccionadas por sus propiedades probióticas, su capacidad de crecer en leche y comportamiento sinérgico o al menos no antagónico: *Lactobacillus kefir* CIDCA 8348, *Lactobacillus plantarum* CIDCA 83114, *Lactococcus lactis* subespecie *lactis* CIDCA 8221, *Kluyveromyces marxianus* CIDCA 8154 y *Saccharomyces lipolytica* CIDCA 812 en cultivo como fermento multicepa y crecidas en forma aislada. Se ensayaron diferentes condiciones de liofilización y tiempos de almacenamiento a 4°C, por considerarse esta una temperatura accesible en términos de equipamiento para la conservación en tiempos prolongados del fermento multicepa. Como crioprotectores se ensayaron leche estéril comercial (UAT), sacarosa 0,3 M y trehalosa 0.3 M, y la combinación de leche con ambos crioprotectores. Los periodos de almacenamiento fueron al menos hasta 6 meses. Los sobrevivientes de la cepa CIDCA 83114, CIDCA 8348 y CIDCA 8221 decaen aproximadamente a la mitad a las 96, 48 y 65 hs respectivamente. Sin embargo, no disminuyen por debajo de 10⁷ hasta tres meses de almacenamiento a 4°C. Como resultado de estos ensayos se selecciono como mejor condición el uso conjunto de leche UAT combinada con trehalosa o sacarosa 0,3 M como crioprotectores.

Tanto los cultivos de lactobacilos frescos monomicrobianos y mixtos como los respectivos liofilizados inhibieron el desarrollo de *E. coli* O157, O145, O103, 71935, O111, O26, 933, O113, 71945, 69160.

4. Optimización de las condiciones de conservación por deshidratación del formulado mixto (Secado spray) y propiedades probióticas luego del secado en spray .

Este trabajo se realizó en colabora

- Estudio de la capacidad fermentativa del gránulo de kefir de leche en leche fortalecida con vitaminas y minerales y de la actividad inhibitoria de los sobrenadantes de estos productos fermentados sobre la toxina shiga de *E. coli* O157-H7.

ción con la Dra. Paula Teixeira (Escola Superior de Biotecnología de la Universidad Católica Portuguesa de Porto)

Resultados obtenidos con cepas aisladas de kefir indican que la deshidratación por secado spray de *Lb plantarum* CIDCA 83114, *Lb kefir* CIDCA 8348 y 8321 y *S. lipolytica* CIDCA 812, se puede realizar sin pérdidas importantes de viabilidad a temperaturas inferiores a 80 °C. En este sentido se obtuvieron microorganismos deshidratados en leche con capacidad de permanecer viables durante 80 días en concentraciones de 10⁶- 10¹¹ ufc/g según la especie. De todos los microorganismos, *Lb plantarum* es el más resistente y *S. lipolytica* el más sensible. La resistencia de *L. kefir* 8321 y *L.*

plantarum 83114 a lisozima, sales biliares, cloruro de sodio y penicilina antes y después del secado en spray se mantuvo inalterada, es decir que los resultados indicarían que no se produce daño en la membrana durante el proceso de secado. Los resultados de adhesión a células en cultivo de la línea Caco 2 TC-7 de las cepas deshidratadas no mostraron diferencias significativas y la capacidad de *L. kefir* 8321 de inhibir la invasión de *Salmonella* a células en cultivo no se vio afectada por el proceso de secado en spray.

5. Estudios in vivo

a) Se montaron los modelos animales para determinar si las cepas seleccionadas como probióticas in vitro poseen capacidad de expresar dichas propiedades in vivo y si la mantienen después del proceso de rehidratación. Se están utilizando ratones BALB/c y C57BL/6. Los animales son tratados previamente con suspensiones de microorganismos seleccionados según los puntos anteriores en el agua de bebida. Se están probando dosis que varían entre 10⁸ y 10⁹ microorganismos probióticos/día. El tratamiento probiótico continúa durante todo el estudio. Al cabo de 7 días de tratamiento probiótico, se infectan los animales con el patógeno elegido mediante sondeo gástrico en una única dosis de entre 10⁶ y 10⁹ por animal. Esta dosis depende del patógeno utilizado y es optimizada durante ensayos preliminares de infección. Se analiza materia fecal y sangre a intervalos regulares de 7 días y hasta los 28 días de experimento. Se evalúan las siguientes variables: supervivencia y estado general de los animales, análisis de la flora, translocación, histología, IgA fecal, IgG sérica, proliferación de esplenocitos.

A los efectos de poder establecer la asociación y/o permanencia de lactobacilos aislados de kefir en tracto intestinal y de diferenciar las diferentes cepas de *Lb. kefir* se obtuvieron anticuerpos monoclonales contra capa-S. Se obtuvieron 4 hibridomas específicos de capa S de *Lb kefir* CIDCA 8348. Se analizó la reactividad de los AcMo y se observó que los mismos reconocen de manera diferente proteínas de capa S provenientes de distintos asilamientos de *Lb. kefir* tanto por ELISA como por inmunoblotting. Ninguno de los AcMo mostró reactividad frente a las 2 cepas de *Lb brevis* analizadas. Actualmente se ampliará este estudio a otras cepas de *Lb kefir* para analizar la existencia de una correlación entre las propiedades inmunoquímicas de las proteínas de capa S y las propiedades superficiales y probióticas de las diferentes cepas.

b) Efecto protector de lactobacilos sobre la acción de EHEC: Se utilizaron 2 modelos murinos: C57BL/6 y Balb/c. Se administró la cepa 133 desde el día -7 y al día 0 se infectó con *E. coli* O157:H7. Se tomaron muestras a diferentes tiempos post-infección. Se evidenció una marcada diferencia en la susceptibilidad entre los dos modelos: en los ratones C57BL/6 la infección fue letal mientras que en los Balb/c los animales permanecieron vivos hasta el último punto del muestreo (21 días). En el modelo C57BL/6 la administración de la cepa 133 permitió la supervivencia de los animales hasta el último día de ensayo mientras que todos los animales del grupo placebo murieron durante la primera semana post-infección. En los ratones Balb/c, la supervivencia de los animales en los dos grupos (placebo y tratamiento) permitió la colección de muestras de sangre, materia fecal y tejidos para su análisis.

d) Efecto protector de un concentrado mixto de microorganismos aislados de kefir frente a la proliferación de trofozoítos de *Giardia* intestinales: para probar la capacidad de inhibir la proliferación de trofozoítos de *Giardia intestinalis* (cepa WB clon C6) in vitro, se coincubó una suspensión de 4.10⁴ trofozoítos en medio TYI con sobrenadantes de *S. lipolytica* CIDCA 812, *L. plantarum* CIDCA 83114 y *L. kefir* CIDCA 8348 crecidos en medio TYI modificado (pH=6), en una proporción 2:1. A las 24, 48 y 72 horas se hicieron recuentos de trofozoítos y se comparó con los controles correspondientes. En los ensayos in vivo se utilizaron ratones C57BL/6 y se administraron 2.10⁵ UFC de *S. lipolytica* CIDCA 812, 1.10⁷ UFC de *L. plantarum* CIDCA 83114 y 2.10⁷ UFC de *L. kefir*

CIDCA 8348 por animal por día durante 7 días previo a la infección con $1,4 \times 10^7$ trofozoitos de *Giardia intestinalis* (cepa H7). A los 7, 14 y 21 días post-inoculación se determinó el recuento de trofozoitos en duodeno, la presencia de antígenos fecales específicos de *Giardia* (Proteína GSA-65) y el nivel de anticuerpos IgA específicos anti-*Giardia* en materia fecal. Los sobrenadantes de cultivo de los microorganismos probióticos inhibieron la proliferación de trofozoitos in vitro, manteniendo el recuento constante en el tiempo y significativamente menor que en los controles. La administración de cepas probióticas previno la infección por *Giardia intestinalis* en ratones. Se observó una disminución significativa ($p < 0,05$) en la tasa de infección. Además se observó una tendencia hacia una disminución en la liberación de antígenos específicos de *Giardia* que se correspondió con un incremento en la producción de anticuerpos IgA específicos anti-*Giardia*. Nuestros resultados muestran el potencial de las cepas probióticas en estudio para interferir en el crecimiento y la capacidad de infección de *Giardia intestinalis*, así como también para estimular la respuesta inmune específica contra este parásito. Esto supondría una alternativa en el creciente campo de aplicación de los productos probióticos alimentarios.

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.*

- Bolla P., Carasi P., Serradell M., De Antoni GL. (2013) Kefir-isolated *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* inhibits the cytotoxic effect of *Clostridium difficile* in vitro. *Journal of Dairy Research*: 80: 96-102.
- Carasi P., Ambrosio N., De Antoni G., Bressollier P., Urdaci M., Serradell M. (2014) Adhesion properties of potentially probiotic *Lactobacillus kefir* to gastrointestinal mucus. *Journal of Dairy Research* ;81(1):16-23
- Correa Franco M., Golowczyc M., De Antoni G., Pérez P., Humen M., Serradell M. (2013) Administration of kefir-fermented milk protects mice against *Giardia intestinalis* infection *Journal of Medical Microbiology*; 62(Pt 12):1815-22.
- Emiliano Kakisu, Patricia Bolla, Analía G. Abraham, Patricio de Urraza, Graciela L. De Antoni (2013) *Lactobacillus plantarum* isolated from kefir: protection of cultured Hep-2 cells against *Shigella* invasion. *International Dairy Journal* 33: 22-26
- Trejo FM, De Antoni GL, Pérez PF (2013) Protective effect of bifidobacteria in an experimental model of *Clostridium difficile* associated colitis. *J Dairy Res.* Aug;80(3):263-9. doi: 10.1017/S0022029913000216. Epub 2013 Apr 23.

- Carasi P, Díaz M, Racedo SM, De Antoni G, Urdaci MC, Serradell Mde L. (2014) Safety characterization and antimicrobial properties of kefir-isolated Lactobacillus kefir. Biomed Res Int.;2014: Volume 2014, Article ID 208974, 7 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2014/208974>. Epub 2014 May 13.

- Londero A, León Peláez MA, Diosma G, De Antoni GL, Abraham AG, Garrote GL. (2014) Fermented whey as poultry feed additive to prevent fungal contamination. J Sci Food Agric;94(15):3189-94. doi: 10.1002/jsfa.6669. Epub 2014 Apr 22.

- P. Carasi, C. Jacquot, D. E. Romanin, A. M. Elie, G. L. De Antoni, M. C. Urdaci, M. Serradell.(2014) "Safety and potential beneficial properties of Enterococcus strains isolated from kefir". International Dairy Journal 2014 - 39(1):193-200.

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).*

1) 2013- Título del trabajo: "Poultry-feed preservative potential of whey fermented with kefir grains" A. Londero, A. León Peláez, G. Diosma, G.L. De Antoni, A.G. Abraham, G.L. Garrote. IV Simposio Internacional de Bacterias Lácticas (SIBAL), San Miguel de Tucumán – Tucumán, Argentina, 16 al 18 de Octubre.

2) 2013- Título del trabajo: "Immunomodulatory properties of non bacterial fraction of kefir: role of organic acids" C. Iraporda, M. Rumbo, G. L. Garrote A. G. Abraham. IV Simposio Internacional de Bacterias Lácticas (SIBAL), San Miguel de Tucumán – Tucumán, Argentina, 16 al 18 de Octubre.

3) 2013- Título del trabajo: "Inclusión de bacterias lácticas y levaduras en películas de kefir: viabilidad y conservación de características probióticas en una matriz con funcionalidad biológica" Aquino C., Diosma G., Piermaría J., Garrote G., Abraham A. XIV Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos, CYTAL, Rosario, Santa Fe, Argentina. 23 al 25 de Octubre.

4) X Congreso Argentino de Microbiología General SAMIGE, Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina, Julio 2014. Correa, M.; Soria, M.A.; Federico, F.; Gallinger, C.; Gómez, S.C.; Zapata, R.A.; Bueno, D.J.; Leon, A.M. "Inocuidad de la

aplicación de *Lactobacillus plantarum* CIDCA 83114 en alimentación de pollos parrilleros”.

5) 2013- A. LONDERO, A. LEÓN PELÁEZ, G. DIOSMA, G.L. DE ANTONI, A.G. ABRAHAM, G.L. GARROTE. IV Título del trabajo: “Poultry-feed preservative potential of whey fermented with kefir grains” A. Londero, A. León Peláez, G. Diosma, G.L. De Antoni, A.G. Abraham, G.L. Garrote. IV Simposio Internacional de Bacterias Lácticas (SIBAL), San Miguel de Tucumán – Tucumán, Argentina, 16 al 18 de Octubre.

6)XIII Congreso argentino de microbiología y II congreso de microbiología agrícola y ambiental”.,“Estudio de la capacidad antifúngica del permeado de suero fermentado con gránulos de kefir CIDCA AGK1 in vitro y sobre alimento para pollos frente a *Aspergillus parasiticus* CMUNLP7” Autores: Raúl Gamba, Carolina Ni Coló, Angela León Peláez y Graciela L. De Antoni, Septiembre 23, 24, 25 y 26 de 2013.

7.6 INFORMES Y MEMORIAS TÉCNICAS. *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.*

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.*

- 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.

- 2009- 2014- Lic.Raul Gamba
Becario Posgrado CONICET
Director: G. L. De Antoni.

- 2013 y continua- Mg. Mariana Correa
Becario doctorado CONICET
Director: G. L. De Antoni.

- 2014 y continua- Lic. Lina Merino
Becario doctorado CONICET
Director: G. L. De Antoni.

- 2013 y continua- Lic. Manuel Teijeiro
Becario doctorado CONICET
Director: 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.*

Paula Carasi. Tesis doctoral aprobada 2014
Director: M. Serradell. Co-director: G De Antoni Lugar de trabajo:C átedra de microbiología- Facultad de Ciencias Exactas – Universidad Nacional de La Plata. Fecha de defensa: 20/11/2014. Calificación: sobresaliente (10).

Raul .GambaTesis doctoral aprobada 2015, co-directora
Director: G De Antoni Lugar de trabajo:Cátedra de microbiología y CIDCA- Facultad de Ciencias Exactas – Universidad Nacional de La Plata. Fecha de defensa: 10/03/2014. Calificación: sobresaliente (10).

Mariana Correa. Tesis doctoral en realizacion. Director: G. De Antoni- Co.director: A. Pelaez

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 0716- 2011. 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.” Inicio 28-9-2012. finalizacion 2015

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

Secretaria de Extension de la Facultad de Ciencias Exactas 2014-2018

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: Introduccion a la Microbiología y Microbiología de Alimentos 2013 a 2015. 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 periodo.

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. 2013-2015

Proyecto PITAP: Diseño y construcción de un pasteurizador para la obtención de leche fortificada con vitaminas y minerales a ser empleada en la elaboración de kefir. Descripción: Proyecto transdisciplinario para produccion en pequeños tambos de leche pasteurizada fortificada con vitaminas y minerales, para la produccion de kefir de leche y derivados como suero, en comunidades desfavorecidas socio economicamente. 2013-2015

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.”

OBJETIVOS GENERALES.

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, controlaría 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.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS E HIPÓTESIS DE TRABAJO.

Hipótesis de Trabajo y abordaje del problema de investigación: 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 centrara 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 bacteriofagos 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.

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: infinvest@cic.gba.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.