



## INFORME CIENTIFICO DE BECA

Legajo N°:

**TIPO DE BECA** DOCTORAL CIENTÍFICO-TECNOLÓGICA  
año

**PERIODO** 2016 1er

### 1. DATOS PERSONALES

*APELLIDO: Valiente Dmitruk*

*NOMBRES: María Carolina*

*Dirección Particular: Calle:*

*Localidad: La Plata CP: 1900 Tel:*

*Dirección electrónica (donde desea recibir información, que no sea "Hotmail"):  
carolinavalientedmitruk@yahoo.com.ar*

### 2. TEMA DE INVESTIGACION (Debe adjuntarse copia del plan de actividades presentado con la solicitud de Beca)

Estudio de la aplicación de bacterias lácticas en la crianza de pollos para disminuir los efectos producidos por hongos, micotoxinas y parásitos

**PALABRAS CLAVE (HASTA 3)** pollos micotoxinas parásitos

### 3. OTROS DATOS (Completar lo que corresponda)

**BECA DOCTORAL 1° AÑO** (ex ESTUDIO 1° AÑO): *Fecha inicio:* 01/04/2016

**BECA DOCTORAL 2° AÑO** (ex ESTUDIO 2° AÑO): *Fecha inicio:*

**BECA DOCTORAL 3° AÑO** (ex PERFECCIONAMIENTO 1° AÑO): *Fecha inicio:*

**BECA DOCTORAL 4° AÑO** (ex PERFECCIONAMIENTO 2° AÑO): *Fecha inicio:*

### 4. INSTITUCION DONDE DESARROLLA LA TAREA

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

*Facultad: Ciencias Exactas*

*Departamento: Ciencias Biológicas*

*Cátedra: Microbiología*

*Otros: CIDCA*

*Dirección: Calle: 47 y 115 N°:*

*Localidad: La Plata CP: 1900 Tel: 4235333int38*

### 5. CARGO UNIVERSITARIO (si existe, especificar categoría, dedicación, condición de ordinario, regular o interino):

Ayudante alumno, dedicación simple

### 6. CARGOS EN OTRAS INSTITUCIONES:

### 7. DIRECTOR DE BECA

*Apellido y Nombres: De Antoni, Graciela Liliana*

*Dirección Particular: Calle:*

*Localidad: City Bell CP: 1896 Tel:*

*Dirección electrónica: [gracielaideantoni@yahoo.com.ar](mailto:gracielaideantoni@yahoo.com.ar)*

## **8. RESUMEN DE LA LABOR QUE DESARROLLA**

*Descripción para el repositorio institucional. Máximo 150 palabras.*

Durante el desarrollo del primer año de beca doctoral realicé labores de búsqueda de material científico certificado, desarrollo de modelos de estudio para el aislamiento e identificación de hongos presentes en alimento de pollos, estudio de la capacidad antifúngica de los microorganismos probióticos ya aislados y conservados en la Cátedra de Microbiología -FCE- UNLP, estudio la capacidad de secuestrar micotoxinas in vitro e in vivo por parte de los microorganismos aislados y análisis los mecanismos moleculares envueltos en la captura. Además, estudio de la capacidad de producir micotoxinas por parte de los hongos aislados y el aislamiento e identificación de los parásitos presentes en muestras de cama y materia fecal de pollos de corral.

Aislé 4 hongos filamentosos y 17 cepas de las cuales sólo una tiene un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de un hongo.

Profundizaré los estudios sobre los mecanismos de acción de las cepas su identificación

## **9. EXPOSICION SINTETICA DE LA LABOR DESARROLLADA EN EL PERIODO.**

*Debe exponerse la orientación impuesta a los trabajos, técnicas empleadas, métodos, etc., y dificultades encontradas en el desarrollo de los mismos, en el plano científico y material. Si corresponde, explicita la importancia de sus trabajos con relación a los intereses de la Provincia.*

Labor desarrollada durante 2016:

Las tomas de muestra y algunos ensayos se realizaron en granjas de producción masiva de pollos (27.000 o más pollos por ciclo de producción) de las localidades de Sarmiento, y General Rodriguez.

La importancia de mis trabajos radica en la búsqueda de alternativas al uso de antibióticos en alimentación animal, cuyo uso quedará prohibido desde 2019.

\*Durante el informe se utilizará la siguiente notación matemática:

$1000=1e^{3}$ , siendo exp una forma de notación exponencial de base 10 y el número contiguo (3) el factor exponencial

Abril/2016

Objetivos:

Realizar recuento de aerobios mesófilos y hongos filamentosos del alimento para pollos. Aislar y caracterizar hongos filamentosos del alimento.

Materiales y Métodos

1. Muestra inicial: se tomó muestra del alimento comercial que se le da a los pollos entre 40 y 45 días en la granja de Sarmiento. El alimento comercial viene mezclado con el núcleo. Características de la muestra: alimento seco en forma de grano de color amarillo claro mezclado con elevada cantidad de alimento pulverizado.

2. Procesamiento de la muestra

- Recuento de hongos filamentosos y aerobios mesófilos: En condiciones de esterilidad se pesaron 25 gramos de alimento y se homogenizaron en 225 ml de agua de peptona al 0,1% p/v en agitador de palas Stomacher 400™ (Laboratory Blender, England).

Se hicieron diluciones seriadas del homogenizado y se sembraron en medios adecuados, según las recomendaciones del BAM (FDA, 2013), de la siguiente manera:

- Recuento de aerobios mesófilos: se empleó medio para recuento en placa PCA™ (Biokar, Beauvais, Francia). Para ello, se tomó 1ml de las diluciones  $10e^{-1}$  hasta la  $10e^{-6}$  y se sembraron por inclusión por duplicado.

- Para el recuento de hongos filamentosos y levaduras, se usó agar Diclorán Rosa de Bengala Cloramfenicol DRBC™ (Biokar, Beauvais, Francia). Para ello se tomó 100µl de cada dilución nombrada y se sembró en superficie para homogeneizarse utilizando perlas de vidrio estériles por triplicado.

Los medios para recuento de microorganismos aerobios mesófilos se incubaron a 37 °C durante 48 horas y las placas con medio de cultivo DRBC se incubaron durante cinco días a 30°C en oscuridad. Una vez terminado el tiempo de incubación, se procedió al recuento de colonias a dos tiempos y al reporte de las UFC/g de alimento (Tournas y col. 2001).

- Aislamiento de hongos filamentosos: el homogenato del alimento se sembró en medio Malta Agar para su posterior aislamiento y caracterización a nivel morfológico (Pitt & Hocking) y a nivel molecular. La prevalencia de colonias típicas se determinó haciendo un recuento del total de colonias de hongos filamentosos presentes en cada dilución y calculando el porcentaje de cada uno de ellos.

#### Resultados

- El recuento de aerobios mesófilos no varió significativamente en los distintos tiempos considerados (24 y 48hs)

Recuento de aerobios mesófilos =  $5,95 \pm 0,78 \exp5$  UFC/g alimento

El recuento de hongos filamentosos no varió significativamente en los distintos tiempos.

Recuento de Hongos filamentosos=  $1,87 \pm 0,29 \exp5$  UFC/g alimento

- Prevalencia de hongos filamentosos:

- Hongo 1 (H1)

Características: color verde central y los bordes blancos, con aspecto aterciopelado-seco y surcos concéntricos ventrales hacia el centro de la colonia

PrevalenciaH1= 66%

- Hongo 2 (H2)

Características: color blanco con una elevación central y amplia circunferencia de aspecto algodonoso.

PrevalenciaH2= 80%

#### Conclusión

Los recuentos obtenidos tanto para aerobios mesófilos como para hongos filamentosos exceden los valores máximos permitidos, ya que, los valores micológicos para los alimentos balanceados molidos, están dados máximo en  $1,5 \exp4$  UFC/g y para las raciones granuladas en  $1,0 \exp4$  UFC/g (Vallejo, 2003) y datos semejantes lo menciona (Masdeu et al2004)

Valores altos de aerobios mesófilos corresponde a deterioro del alimento temprano y valores elevados de hongos filamentosos indica una alta probabilidad de presencia de micotoxinas y hongos invasores para personas inmunosuprimidas y animales, como por ejemplo *A. fumigatus*

Mayo/2016

Objetivo: aislamiento e identificación de hongos contaminantes del alimento para pollos (A).

Estudio parasitológico de la muestra de cama de pollos(B)

Materiales y métodos

Previamente se presentaron los resultados de los recuentos de hongos y levaduras obtenidos en alimento de pollos (Terminador).

A partir de estos recuentos se procedió a aislar e identificar a nivel morfológico según las claves dicotómicas (Pitt y Hocking)

A.1) Aislamiento de los hongos filamentosos

Los Hongos filamentosos que crecieron en los recuentos se aislaron en medio Agar Malta (Pitt & Hocking, 1999). Para ello se hicieron, con ansa de punta, tres punciones en forma de vértices de triángulo sobre el agar y se incubó durante 5 días a 30°C en oscuridad. Esta operación se repitió en tres repiques sucesivos para garantizar el aislamiento de cada hongo filamentosos. Una vez aislados, se almacenaron los hongos en crioviales con agar agua (agar al 0,2% p/v en agua) a 4°C hasta su caracterización a nivel fenotípico. Adicionalmente, los hongos se mantuvieron mediante repiques en Agar Papa inclinado (Merck, Darmstadt, Alemania).

A.2) Clasificación morfológica de los aislamientos

Una vez terminado el aislamiento se procedió a la clasificación morfológica hasta género y especie (Pitt y Hocking, 1999) cultivando cada aislamiento durante 7 días a 5, 25 y 37 °C en los medios MEA, G25N y CEA.

Durante los 7 días de incubación, se determinó la medida de los diámetros de cada colonia con calibre; además del color y la textura, así como el color de los pigmentos liberados al medio de cultivo (Pitt & Hocking, 1999).

A.3) Caracterización de los hongos filamentosos.

Una vez obtenidos los cultivos fúngicos, se seleccionaron las colonias aisladas y diferenciadas; se hizo una observación macroscópica de las colonias mediante lupa Nikon C-PS® (Nikon, Japan) y observación microscópica de las estructuras reproductivas con microscopio LEITZ Laborlux 12® (LEITZ, Germany).

La observación macroscópica se realizó directamente sobre la placa, mientras que la observación microscópica requirió de una preparación del hongo en porta objeto. Se observaron al microscopio las estructuras reproductivas, haciendo preparaciones en portaobjetos. Todas las muestras se observaron en microscopio con un aumento de 400 para analizar la estructura de la hifa reproductiva y con un aumento de 1000 para analizar la forma de los conidios (Basílico, 2008).

#### Resultados (A)

A partir de los ensayos realizados, encontramos que:

Hongo 1: corresponde al género *Penicillium*

Hongo 2: probablemente corresponda al género *Nigrospora*, hongo misceláneo.

#### Conclusión

Se esperará a la identificación genética de los hongos aislados para evaluar su prevalencia en alimentos para pollos y sus efectos adversos

#### B) Estudio parasitológico de la muestra de cama de pollos

A partir de los resultados obtenidos anteriormente (presencia de *Blastocystis* y sospecha de coccidios), se procedió a la tinción de los extendidos de muestras de cama de pollo, por el método de Ziehl-Neelsen.

#### Materiales y métodos

- 1) Se procedió a obtener extendidos de la muestra de la cama de pollo como se indicó en el anterior informe
- 2) Se cubren los extendidos con Fucsina y se calienta hasta emisión de vapores blancos
- 3) Se enfría y lava con agua destilada
- 4) Se cubren los extendidos con decolorante de Ziehl-Neelsen por 2 minutos
- 5) Se lava hasta que no se desprenda más colorante
- 6) Se cubren los extendidos con Azul de metileno por 30 segundos
- 7) Se lava con agua destilada y se deja secar, para observar posteriormente al microscopio óptico

#### Resultados (B)

Se observan ooquistes inmaduros de coccidios.

#### Conclusiones

El resultado obtenido es esperable, ya que según la bibliografía, el uso de vacunas coccidiales o coccidiostatos en la granjas de producción no elimina al 100% la presencia de ooquistes infectantes sino que solo reduce su emisión.

Junio 2016

Objetivo: Aislamiento de microorganismos probióticos de fermentos naturales

Materiales y métodos

Se tomó muestra de fermento natural y se sembró 100ul del mismo sobre placa con agar MRS y agar M17 en condiciones de esterilidad. Se incubaron las placas por 24hs a 37°C. Se seleccionó cada colonia con morfología diferente y se aisló en agar específico estéril por el método de agotamiento.

Se realizaron sucesivos pasajes de cada colonia aislada en agar MRS o M17. Además se realizó tinción de Gram de cada colonia aislada y prueba de la catalasa.

Se conservaron muestras de cada colonia en leche a -20°C en la Cátedra de Microbiología de la Facultad de Ciencias Exactas de la UNLP.

#### Resultados

Se logró aislar 17 cepas con morfología de colonia diferente correspondientes a lactococos y lactobacilos.

#### Conclusión

Se realizarán ensayos de propiedades probióticas de cada cepa aislada y se determinará el género y especie de cada una por biología molecular.

Julio/2016

**Objetivos:** Determinar la resistencia a antibióticos por el método de dilución, Concentración Inhibitoria Mínima (CIM), para 5 cepas seleccionadas como posibles probióticos, y una sexta cepa control *L. plantarum*, conservadas en la cátedra de Microbiología. Por otro lado, analizar los Hongos filamentosos de alimento de pollo en época de frío.

#### Materiales y métodos

- Concentración Inhibitoria Mínima:

1) Propagación de la cepa

Se creció cada una de las cepas a ensayar en agar MRS inclinado, incubándolas a 37°C durante 24hs.

2) Preparación de la placa de microdilución

##### Antibiótico

Dilución y distribución del antibiótico

I) Se partió de la solución concentrada del antibiótico ENROFLOXACINA (0,1gr/ml), procedente de la Granja Sarmiento. Se esterilizó la solución por filtración.

II) Se realizaron diluciones seriadas a la mitad, partiendo de la concentración inicial de antibiótico hasta la dilución  $1,95 \times 10^{-4}$  gr/ml con agua destilada estéril, en volumen final de 0,5ml por tubo.

##### Medio de Cultivo

A) Preparación del medio

Se preparó un medio alternativo al LSM propuesto por la norma ISO 10932 IDF 223 (IST 90% + 10% MRS), dado los altos costos del medio. El medio utilizado es una modificación del caldo Mueller-Hinton (Composición por litro: Peptona ácida de caseína 17,5gr, Extracto de levadura 3gr y Almidón 1,5gr)

B) Distribución del medio

Se distribuye 0,4ml del medio Mueller-Hinton modificado estéril por cada tubo de dilución de antibiótico.

##### Inóculo

A) Preparación del inóculo

I) Se tomó muestra con ansa de una colonia de cada cepa propagada y se resuspendió en Solución fisiológica estéril (5ml)

II) Se llevó la suspensión a grado 1 en la escala de turbidez de Mc Farland o a una DO a 625nm de 0,16 a 0,2. (Corresponde a  $3 \times 10^8$  UFC/ml aproximadamente)

B) Dilución del inóculo

i) Se realizó una dilución seriada 1/10 en tres pasos de la suspensión bacteriana inicial en Solución fisiológica estéril (Pasamos de  $3 \times 10^8$  UFC/ml en la dilución inicial hasta  $3 \times 10^5$  UFC/ml en la mayor dilución)

C) Distribución de la dilución bacteriana

Se distribuyó 0,1ml de la dilución bacteriana correspondiente a  $3 \times 10^5$  UFC/ml en cada tubo de dilución de antibiótico. (Corresponde a  $3 \times 10^4$  UFC/ml final en cada tubo). Se incubó a 37°C durante 24hs.

#### Resultados

Se evaluaron 5 cepas con propiedades probióticas aisladas de fermentos naturales, de las cuales 4 de ellas tienen una CIM menor a la mínima concentración de antibiótico ensayada y una de ellas presenta una CIM de 0,000195mg/ml.

#### Conclusión

Las cepas evaluadas no presentan una resistencia significativa frente a Enrofloxacina, en las dosis usadas terapéuticamente en pollos, por lo que no habría riesgo de generar cepas resistentes si se las utiliza como probiótico.

- Análisis de Hongos filamentosos de alimento de pollo en época de frío

Recuento de heterótrofos totales

Se realizó el recuento de heterótrofos totales en medio PCA por duplicado, como se indicó en el informe anterior de alimento de pollo comercial procedente de la Granja Sarmiento, en época de frío.

Recuento de hongos filamentosos

Se realizó el recuento de hongos filamentosos en medio DRBC por triplicado, como se indicó en el informe anterior, de alimento de pollo comercial procedente de la Granja Sarmiento, en época de frío.

#### Resultados

Recuento de aerobios mesófilos =  $1,00 \pm 0,71 \times 10^6$  UFC/g alimento

Recuento de Hongos filamentosos =  $1,20 \pm 0,53 \times 10^4$  UFC/g alimento

#### Conclusiones

El recuento de aerobios mesófilos continúa elevado, posiblemente debido a la humedad ambiente prevalente. Mientras que el recuento de hongos filamentosos bajó en un orden de magnitud. Se informó a los productores los resultados obtenidos para mejorar su producción.

Se requiere un nuevo ensayo en temporadas de menos humedad ambiente

Agosto/Septiembre 2016

Objetivos: - Aislamiento e identificación de los posibles parásitos colonizantes del intestino de 2 pollos de corral de 10 días, en sus diferentes secciones (duodeno, yeyuno y ciego)

- Identificación de las formas parasitarias en muestras de materia fecal oriunda de los intestinos y del raspado de la mucosa intestinal y aislamiento e identificación de parásitos en muestra de cama y materia fecal de la granja de Gral. Rodríguez

- Aislamiento y caracterización a nivel morfológico de los hongos filamentosos del segundo recuento en alimento de pollo

- Extracción de ADN de los hongos filamentosos aislados hasta el momento y secuenciación para la identificación de los mismos

- Ensayo de Secuestro de aflatoxinas por las 5 candidatas seleccionadas con capacidad probiótica

#### Materiales y métodos

- Aislamiento de los parásitos de intestino: Abrir uno de los extremos de intestino cerrado con hilo de nylon. Lavar de la luz intestinal con agua destilada. Raspar con material quirúrgico el epitelio intestinal. Resuspender el material obtenido en formol al 10%. Colocar una alícuota del material sobre un portaobjeto y se observa al microscopio óptico a aumentos de 400 y 1000. Realizar tinción de tinción de Ziehl-Neelsen para confirmar la presencia de coccidios.

- Muestras de cama y materia fecal de pollo: Homogeneizar la muestra en formol al 10%. Filtrar la muestra completa con gasa recuperando cada filtrado en tubos. Repetir el filtrado, con abundante gasa, de cada tubo colectado. Concentrar la muestra por los métodos de sedimentación por centrifugación y flotación. Tomar una alícuota de cada muestra. Observar cada preparado al microscopio óptico a aumentos de 400 y 1000. Realizar tinción de Ziehl-Neelsen si se sospecha de la presencia de coccidios

- Para la extracción de ADN se puso a punto siguiente protocolo:

- 1) Activar los hongos filamentosos aislados en Agar Papa inclinado durante 5 días a 30°C
- 2) Inocular una porción del medio de reactivación con crecimiento y esporulación del hongo visible en medio YES (Extracto de levadura 2% y Sacarosa 15%). Incubar durante 24-48hs a 30°C, debe observarse una fructificación color blanca sin esporular.
- 3) Filtrar con papel desecante estéril y recuperar la capa de micelio
- 4) Secar la capa de micelio sobre papel desecante estéril
- 5) Colocar el micelio en un tubo eppendor. Volcar un volumen suficiente de N<sub>2</sub> y se romper la fructificación con varilla de vidrio, para la ruptura de la pared.
- 6) Adicionar un volumen adecuado de en buffer Tris HCl ph 7,5-8,5.
- 7) Purificar el ADN con lavados con solventes orgánicos (fenol-cloroformo) y alcohol isoamínico. Luego, centrifugar para obtener el ADN en solución acuosa.
- 8) Precipitar el ADN con agregado de sales y de isopropanol
- 9) Lavar el pellet con etanol 70% y dejar secar.
- 10) Visualizar los productos en gel al 1,2% de agarosa adicionado con bromuro de etidio. Observar en el transiluminador con UV.
- 11) Conservar el ADN extraído a -20°C.

- Reacción en Cadena en Polimerasa (PCR)

Se realiza el siguiente proceso de 30 ciclos consecutivos :

- 1) Desnaturalización del DNA a 95°C
- 2) Hibridación de las cadenas simples con los primers a 55°C
- 3) Elongación del complejo ADN-iniciador realizado por las polimerasas termoestables (TAC) a 72°C

Luego, se visualizan los productos en gel al 1,2% de agarosa adicionado con bromuro de etidio y se observa en el transiluminador con UV.

Se amplifica la región ITS1 e 8SrDNA-ITS2 que corresponde al ADN que codifica para ARN ribosomal de los hongos filamentosos

- Ensayo de secuestro de aflatoxinas

- 1) Reactivar de las cepas seleccionadas en caldo MRS por 24hs a 30°C. Luego, homogeneizar la muestra e inocular 200µl de este cultivo en caldo MRS e incubar por 24hs a 30°C.
- 2) Centrifugar el cultivo a 3000rpm por 15 minutos y descartar el sobrenadante.
- 3) Lavar con PBS (Solución tampón de fosfato: Na<sub>2</sub>HCO<sub>3</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> y NaCl) a pH 7 y una vez con agua bidestilada estéril.
- 4) Resuspender los pellets en 2 ml de solución de aflatoxina AFB1 a 150ppb. En paralelo hacer un control de aflatoxina sin microorganismo.
- 5) Realizar el desafío a 30°C durante una hora en agitador.
- 6) Terminado el desafío centrifugar la solución a 13000rpm durante 15 minutos
- 7) Determinar la capacidad de secuestro de aflatoxina por los microorganismos, midiendo la cantidad de aflatoxina restante en el sobrenadante mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), determinándose el área del pico de aflatoxina AFB1.
- 8) Previo al ensayo de captura hacer el recuento de los microorganismos empleados diluyendo 500µl de la solución de microorganismos en 4,5 ml de PBS y realizando diluciones seriadas 1/10, hasta la dilución 1exp-6. Sembrar 100 µl de las últimas tres diluciones en superficie de agar MRS, dispersando el inóculo con perlas de vidrio estériles. Incubar las placas a 30°C por 48 horas.

## Resultados

- De los tres hongos filamentosos aislados, se encontró la siguiente identificación morfológica:

Hongo 3: corresponde a *Aspergillus acuelatus*

Hongo 4: no fue posible aislarlo

Hongo 5: probablemente corresponda al género *Aspergillus*

- Aislamiento e identificación de parásitos en intestino de pollo

Pollo 1 (10 días):

- Duodeno, Materia fecal: Ooquiste de coccidio inmaduro, cantidad baja prueba confirmatoria negativa.

- Duodeno Raspado de mucosa: *Blastocystis*, cantidad baja

- Yeyuno Materia fecal: *Blastocystis*, cantidad moderada  
Raspado de mucosa No se observan formas parasitarias

- Ciego Materia fecal No se observan formas parasitarias  
Raspado de mucosa *Blastocystis* y posibles coccidios, cantidad moderada  
prueba confirmatoria negativa

Pollo 2 (10 días)

- Duodeno Materia fecal: Posibles coccidios, cantidad baja, prueba confirmatoria negativa  
Raspado de mucosa: No se observan formas parasitarias

- Yeyuno Materia fecal: Posibles coccidios, cantidad moderada, prueba confirmatoria negativo  
Raspado de mucosa: Posibles coccidios, cantidad moderada, prueba confirmatoria negativa

Ciego Materia fecal: *Blastocystis*, cantidad moderada  
Raspado de mucosa: Posibles coccidios, cantidad moderada, prueba confirmatoria negativo

- Formas parasitarias encontradas en muestra de cama y fecal: *Blastocystis* y posibles coccidios, abundantes por el método de sedimentación espontánea, prueba confirmatoria positiva.

## Conclusiones

- Respecto al procesamiento de los órganos, se puede decir que *Blastocystis* es el parásito que se encuentra en mayor proporción pero en baja cantidad. Esto es coherente con lo encontrado en muestras de cama y materia fecal de la Granjas de crianza de los pollos analizados. Sin embargo, se desarrollará un método más eficiente para el aislamiento e identificación de parásitos en futuras muestras, ya que los coccidios inicialmente observados en la muestras, no se pudieron confirmar por el método usualmente utilizado (tinción de Ziehl Neelsen).

- Respecto al análisis de la cama y materia fecal de la Granja Rodríguez se puede afirmar que la modificación al método colaboró en el mejoramiento de la eficiencia del aislamiento de parásitos, siendo necesario el doble filtrado inicial pero no así la concentración por centrifugación ni el método de flotación. Se encontró y confirmó la presencia de *Blastocystis* y al menos dos géneros de coccidios diferentes, todos presentes en abundante cantidad. Realizaré una capacitación con investigadores especializados en coccidiosis aviar para profundizar mis investigaciones.

- Los hongos aislados son típicos en alimentos a base de cereal. Se esperará su identificación genética para evaluar su potencialidad toxicogénica.

- Luego de obtener la medición en HPLC, se podrá concluir el potencial de secuestro de aflatoxinas por parte de las cepas candidatas.

Octubre/2016

Objetivos: - Secuenciación y análisis de la región ITS 1 y 4 de los hongos filamentosos aislados del alimento del pollo y realización de ensayo de secuestro de aflatoxinas por las 5 candidatas, seleccionadas con capacidad probiótica, a diferentes valores de pH



### Materiales y métodos

- Se envió a secuenciar las regiones ITS1 e ITS4 de los hongos filamentosos aislados en alimento de pollo.
- Procedimiento del secuestro de aflatoxinas a diferentes valores de pH:
  - 1) Reactivar de las cepas seleccionadas en caldo MRS por 24hs a 30°C. Luego, homogeneizar la muestra e inocular 200µl de este cultivo en caldo MRS e incubar por 24hs a 30°C.
  - 2) Centrifugar el cultivo a 3000rpm por 15 minutos y descartar el sobrenadante.
  - 3) Lavar con PBS (Solución tampón de fosfato: Na<sub>2</sub>HCO<sub>3</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> y NaCl) a pH 7 y una vez con agua bidestilada estéril.
  - 4) Resuspender los pellets en 2 ml de solución de aflatoxina ABF1 a 150ppb a pH 2, 5 y 8. En paralelo hacer un control de aflatoxina sin microorganismo a cada valor de pH.
  - 5) Realizar el desafío a 30°C durante una hora en agitador.
  - 6) Terminado el desafío centrifugar la solución a 13000rpm durante 15 minutos
  - 7) Determinar la capacidad de secuestro de aflatoxina por los microorganismos, midiendo la cantidad de aflatoxina restante en el sobrenadante mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), determinándose el área del pico de aflatoxina AFB1.
  - 8) Previo al ensayo de captura y luego del desafío a los distintos valores de pH hacer el recuento de los microorganismos empleados diluyendo 500µl de la solución de microorganismos en 4,5 ml de PBS y realizando diluciones seriadas 1/10, hasta la dilución 1exp-6. Sembrar 100 µl de las últimas tres diluciones en superficie de agar MRS, dispersando el inóculo con perlas de vidrio estériles. Incubar las placas a 30°C por 48 horas.

### Resultados:

El análisis de la secuencia obtenida mediante el programa Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) indica que:

El hongo H1: corresponde a *Penicillium rubens*

El hongo H3 corresponde a *Aspergillus fumigatus*

El hongo H5 corresponde a *Aspergillus chevallieri*

-Se está a la espera de las medidas de HPLC de aflatoxinas para evaluar el secuestro.

### Conclusiones

La identificación molecular de los hongos aislados fue determinante, ya que por identificación morfológica se logra una caracterización complementaria.

A partir de la información recabada sobre los mismos, se puede concluir que son hongos comunes en cereales, lo cual explica su aparición en el alimento pelleteado que se le da al pollo de crianza.

### Noviembre/2016

**Objetivos:** Determinación de resistencia a antibióticos (Norma ISO 10932 IDF 223) de cepas lácticas seleccionadas y ensayo de inhibición por sobrecapa de los hongos filamentosos aislados con las cepas seleccionadas

#### Materiales y métodos

- Ensayo de resistencia a antibióticos por el método de dilución para determinar la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) con AMPICILINA (0,1 g/ml) con SULBACTAM (0,05g/ml)

Se realizaron diluciones seriadas a la mitad, partiendo de la concentración inicial de antibiótico hasta la dilución 9,75exp10-5g/ml con agua destilada estéril, en un volumen final de 0,5 ml por tubo.

Se preparó un medio alternativo al LSM (Lactic acid bacterium Susceptibility test Medium) propuesto por la norma ISO 10932 IDF 223 [IST (Iso SensiTest) 90% + 10% MRS)], dado los altos costos del medio. El medio utilizado es una modificación del caldo Mueller-Hinton, el cual tiene la siguiente composición: peptona ácida de caseína (17,5 g/l), extracto de

levadura (3 g/l) y almidón (1,5 g/l), adicionado con MRS en las proporciones correspondientes.

- Ensayo de sobrecapa: se activaron las cepas lácticas en caldo MRS a 37°C durante 24hs. Posteriormente, se sembró 100µl del cultivo de cada aislado sobre medio MRS Agar con perlas estériles.

Se incubaron las placas a 37°C durante 24hs. Transcurrido el tiempo de incubación, se tomó muestra de una colonia de cada aislado con ansa en anillo estéril y se sembró una línea de 3cm de largo sobre una placa de MRS Agar. Se incubaron las placas a 37°C por 24hs.

Una vez crecidas los aislados en la línea, se sirvió sobre ellas una capa de 10ml de agar blando de Extracto de Malta (1% extracto de malta, 2% extracto de levadura y 0,7% de agar agar) conteniendo 10exp4 conidios/ml de *A. fumigatus* y se incubó a 30°C por 48hs en aerobiosis, por triplicado.

Las zonas claras alrededor de las líneas de siembra, se midieron y se clasificaron de la siguiente manera: (-)= no hay inhibición, (d)= sólo inhibición sobre la raya, (+)= zona de inhibición menor a 5mm, (++)= zona de inhibición mayor a 5mm.

#### Resultados

- Todas las cepas lácticas seleccionadas fueron sencibles al antibiótico hasta la mínima concentración utilizada.
- Solo una de las cepas seleccionadas inhibió levemente el crecimiento del hongo.

#### Conclusión

A partir de los resultados, se puede decir que los aislados ensayados son sensibles al antibiótico Ampilicilina/Sulbactam hasta la concentración 9,75exp-5 g/ml y solo una de ellas inhibe levemente el crecimiento de *A. fumigatus* in vitro.

Diciembre/2016

Objetivo: Determinación de la capacidad micotoxigénica de los hongos aislados del alimento de pollo y aislamiento de *Bacillus subtilis* de fermentos naturales.

#### Materiales y métodos

- Se procedió a realizar el ensayo con tres de los cuatro hongos aislados en el alimento del pollo de crianza.

Protocolo:

- a) Preparar el medio Agar Coco (100gr de coco rallado en 300ml de agua destilada caliente), filtrarlo con gasa y al filtrado esterilizarlo.
- b) Verter el medio esterilizado en placas de Petri y sembrar con ansa estéril una muestra de cada hongo a ensayar.
- c) Incubar el hongo a 28°C
- d) Revelar con una gota de hidróxido de amonio cada una de las placas y observar la formación de un halo alrededor del crecimiento del hongo.

#### Resultados

Ninguno de los hongos ´dio reacción positiva

#### Conclusión

Los hongos aislados del alimento para pollo no poseen capacidad significativa de producir aflatoxinas

- Para el aislamiento de *Bacillus subtilis*, se tomó una alícuota del fermento y se colocó en 5ml de Caldo LB ((10g/l de triptona, 5 g/l de extracto de levadura y 10g/l de NaCl) estéril. Se incubó a 30°C por 24hs en shaker a 200rpm. De estos cultivos se sembraron por estrías, con ansa estéril, placas de agar nutritivo y se incubaron durante 16-24hs a 30°C. Del crecimiento de éstas se hizo una descripción macroscópica.

Cada colonia con características semejantes a *B. subtilis* pero diferentes entre sí fue tomada con ansa estéril y enriquecida en caldo LB, incubándose a 30°C durante 24hs. De los cultivos enriquecidos se realizó una tinción de Gram para caracterizar a los aislados microscópicamente (colonias blanquecinas, opacas, aplanadas de bordes irregulares). Aquellas colonias con características típicas de *Bacillus subtilis* y que presentaron a la tinción de Gram bacilos gram positivos con endosporas centrales, se les realizó la prueba de catalasa y, las que dieron un resultado positivo, se conservaron en leche a -20°C en la Cátedra de Microbiología de la Facultad de Ciencias Exactas de la UNLP.

#### Conclusión

Se procederá a analizar sus las propiedades probióticas del aislado y su identificación genética

### 10. TRABAJOS DE INVESTIGACION REALIZADOS O PUBLICADOS EN ESTE PERIODO.

**10.1 PUBLICACIONES.** *Debe hacer referencia exclusivamente a aquellas publicaciones en la cual se haya hecho explícita mención de su calidad de Becario de la CIC (Ver instructivo para la publicación de trabajos, comunicaciones, tesis, etc.). Toda publicación donde no figure dicha mención no debe ser adjuntada ya que no será tomada en consideración. A cada trabajo asignarle un número e indicar el nombre de los autores, en el mismo orden en que aparecen en la publicación, informe o memoria técnica, lugar donde fue publicado, volumen, página y año si corresponde. En cada trabajo que el becario presente -si lo considerase de importancia- agregará una nota justificando el mismo y su grado de participación. Asimismo, en cada caso deberá indicar si el trabajo se encuentra depositado en el repositorio institucional CIC-Digital.*

1) Autores: Valiente Dmitruk María Carolina y Ángela León Pelaez

Lugar: Tercer Congreso Internacional Científico y Tecnológico de la Provincia de Buenos Aires

Tipo de publicación: póster "Estudio de la aplicación de bacterias lácticas en la crianza de pollos"

Año: 2016

El trabajo se encuentra depositado en el repositorio institucional CIC-digital

2) Exposición con power point del trabajo realizado como becaria de investigación y extensionista en la Cátedra Libre en Salud y Derechos Humanos de la Facultad de Cs. Exactas de la UNLP vinculado con la producción alimenticia en el Taller de Extensión "TRABAJO INTERDISCIPLINARIO PARA LA ELABORACIÓN DE ALIMENTOS INOCUOS EN EL MARCO DE LA ECONOMÍA SOCIAL"

Lugar: desarrollado durante la reunión anual de la red CYTED en el centro de investigación CIDCA de la ciudad de La Plata. No se encuentra depositado en el repositorio institucional CIC-Digital.

Autores: Valiente Dmitruk María Carolina, Manuel Orbea y Ángela Leon Pelaez

**10.2 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 Becario 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 aparecen 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 becario 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.*

**10.3 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 ha sido enviado. Adjuntar copia de los manuscritos.*

**10.4 TRABAJOS TERMINADOS Y AUN NO ENVIADOS PARA SU PUBLICACION.** *Incluir un resumen de no más de 200 palabras de cada trabajo.*

**10.5 COMUNICACIONES.** *Incluir únicamente un listado y acompañar copia en papel de cada una. (No consignar los trabajos anotados en los subtítulos anteriores).*

**10.6 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. Indicar en cada caso si se encuentra depositado en el repositorio institucional CIC-Digital.*

Informes de cada mes de trabajo (Expuesto en el informe general, punto 9)

## **11. PUBLICACIONES Y DESARROLLOS EN:**

### **11.1 DOCENCIA**

1) Talleres de salud e higiene con futuros externados del Hospital de Salud Mental Alejandro Korn de la ciudad de La Plata, como parte del Proyecto de Voluntariado "180°". No se encuentra depositado en el repositorio institucional CIC-Digital

2) Taller de Ciencias con niños y adolescentes del Hogar de Día Laura Vicuña en la ciudad de Ensenada, como parte del programa de extensión Cátedra Libre en Salud y Derechos Humanos de la Facultad de Cs. Exactas de la UNLP. No se encuentra depositado en el repositorio institucional CIC-Digital

### **11.2 DIVULGACIÓN**

1) Presentación y exposición oral de póster y trabajo completo en el VII Congreso Nacional de Extensión Universitaria 2016. Título del trabajo "Catedra Libre en Salud y Derechos Humanos. Enfoque extensionista para promoción de la salud integral. FCE - UNLP" Autores: Valiente Dmitruk María Carolina, Taylor Jorge, Lopez Fino Carlos, Iriquin Julieta y Leon Pelaez Angela No se encuentra depositado en el repositorio institucional CIC-Digital.

### **11.3 OTROS**

1) Análisis microbiológicos de alimentos de productores artesanales de la ciudad de La Plata, como parte del proyecto PROCODAS "Mejoramiento de la calidad panadera". No se encuentra depositado en el repositorio institucional CIC-Digital

En cada caso indicar si se encuentran depositados en el repositorio institucional CIC-Digital.

**12. 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.*

Participación en la red CYTED (Ciencia y Tecnología para el Desarrollo)

Lugar: centro de investigación CIDCA, La Plata, Buenos Aires.

Fecha: del 30/10/16 al 4/11/16

Tipo de participación: asistente y expositora

Título del trabajo: Proyecto de extensión 180° (power point)

Autores: Valiente Dmitruk María Carolina, Orbea Manuel y León Pelaez Ángela

**13. CURSOS DE PERFECCIONAMIENTO, VIAJES DE ESTUDIO, ETC.** Señalar características del curso o motivo del viaje, período, instituciones visitadas, etc, y si se realizó algún entrenamiento.

1) Curso de posgrado: PRINCIPALES PATÓGENOS ASOCIADOS A ENFERMEDADES TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS (ETA) EN EL MERCOSUR: MÉTODOS DE DETECCIÓN Y ESTRATEGIAS PARA SU PREVENCIÓN

Estado: APROBADO

Características: El OBJETIVO GENERAL del curso es brindar un abordaje interdisciplinario sobre la Seguridad Alimentaria en el MERCOSUR y en Latinoamérica. El mismo incluye tres aspectos esenciales:

- a) los fundamentos de las principales enfermedades transmitidas por alimentos (ETA),
- b) la prevención a través de la aplicación de buenas prácticas de producción y manipulación, y la incorporación de desarrollos biotecnológicos,
- c) los métodos de detección.

Para alcanzar el objetivo general, se plantean los siguientes OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Presentar la relevancia de las principales enfermedades transmitidas por bacterias y hongos en alimentos en el MERCOSUR y en Latinoamérica.
- Comprender los diferentes mecanismos de virulencia de patógenos alimentarios (i.e.: Escherichia coli O157:H7, Salmonella).
- Comprender los mecanismos de toxicidad de toxinas de origen fúngico asociadas a hongos contaminantes de alimentos.
- Comprender la importancia de las buenas prácticas de producción y manipulación en toda la cadena de producción de alimentos: desde el campo a la mesa del consumidor.
- Brindar información acerca de la relevancia de los probióticos como herramientas de prevención y los mecanismos de interacción probiótico-patógeno y probiótico-micotoxina.
- Brindar los fundamentos de los métodos usualmente utilizados para la detección y cuantificación de patógenos en alimentos.
- Introducir al alumno en los fundamentos de la Microbiología predictiva y sus aplicaciones en la prevención de ETA.
- Proporcionar al alumno fundamentos teóricos sobre los métodos basados en la espectroscopía vibracional (infrarrojo y Raman) como herramientas útiles en Biotecnología.
- Brindar los fundamentos de los principales métodos multivariante utilizados en el análisis e interpretación de espectros vibracionales como métodos válidos para la detección de patógenos en alimentos.
- Introducir al alumno en el manejo de herramientas computacionales orientadas al diseño, verificación y validación de modelos predictivos, aprovechando la disponibilidad de sala de cómputos con los programas necesarios.

- Período: 1/11/16 a 4/11/16

- Institución encargada: Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA).

2) Curso de Posgrado y de capacitación: Salud Intestinal en Aves Comerciales

- Estado: APROBADO

- Características: Objetivos. Las aptitudes productivas de las aves comerciales son, por un lado, la producción de carne y por el otro, la de huevos, ya sea para consumo o para incubación. Para ambas será necesario que el animal convierta muy rápidamente y a valores lo mas bajos posibles un alimento que cubra eficientemente tales requisitos. Esto implica que su aparato digestivo deberá adecuarse a tales requisitos y hallarse en óptimas condiciones fisiológicas y sanitarias para ello. Las exigencias extremas de la producción intensiva lo exponen, además a riesgos patológicos de todo tipo.

El objetivo del curso que se propone será brindar los conocimientos de necesarios para mantener la salud intestinal en las condiciones adecuadas para lograr los mejores valores productivos.

El curso abarcará aspectos anatomofisiológicos, histológicos, histopatológicos, histomorfométricos, inmunológicos, bacteriológicos, coccidiológicos, farmacológicos y nutricionales, los que serán completados con las prácticas correspondientes.

- Período: 23, 24 y 25 de noviembre de 2016
- Institución organizadora: Universidad Nacional de Luján
- 3) Curso de posgrado: "Problemática alimentaria argentina"
  - Estado: Se envió el examen y se está a la espera del resultado.
  - Características:
    - Objetivos Generales  
Exponer los elementos teóricos y metodológicos que construyen la problemática alimentaria que Argentina comparte con el mundo en la actualidad.
    - Específicos
      - Describir y analizar la situación alimentaria mundial y Argentina en particular desde los factores básicos que sostienen la producción: tierras, agua, clima, organización social, inversiones, especulación, valores asociados al consumo conspicuo.
      - Describir y analizar la organización de la producción y el comercio mundial (subsidios y retenciones) observando datos macro.
      - Analizar la construcción de la problemática alimentaria en diferentes países e instituciones (OMC y FAO) comparando discursos y datos.
      - Analizar las reducciones naturalistas: los nutrientes, la normalización de las dietas y los cuerpos saludables.
      - Describir y analizar la situación Argentina en los últimos 30 años desde los datos macro (SAGYPA, INDEC, M.E.).
      - Describir y analizar las estrategias de consumo de diferentes sectores de ingresos en tanto prácticas (diversificación del ingreso y del abasto, manejo de la composición doméstica y autoexplotación) y representaciones (del cuerpo, de los alimentos mismos y de la comensalidad) en diferentes sectores de ingresos.
  - Comparar la construcción de la problemática en diferentes épocas con los datos y las políticas propuestas por diferentes instituciones (Ministerio de Salud, Desarrollo Social, diferentes partidos políticos, ONG'S).
- Metodología docente  
El curso se dicta en la modalidad presencial. El programa analítico se desarrollará a través de clases teórico-prácticas en las que se plantearán los conceptos y métodos involucrados en cada unidad temática, se utilizará apoyo visual para el análisis de hechos y estadísticas sociales actuales.
- Evaluación  
Examen autoadministrado sobre los contenidos tratados en el curso y un tema monográfico a desarrollar al finalizar la cursada. Se entrega certificado oficial del Instituto de Altos estudios Sociales de la Universidad de San Martín.
  - Período: de agosto a noviembre de 2015, clase semanal de 2hs.
  - Institución organizadora: IDAES (Instituto de Altos Estudios Sociales de la Universidad Nacional de San Martín)

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

- 1) PID 0049-2014 Producción de probióticos aviares para la Industria argentina  
Institución otorgante: Agencia nacional de promoción científica, tecnológica y de innovación.  
Fondo para la investigación científica-tecnológica  
Fines: Investigación y desarrollo de probióticos para la alimentación aviar  
Monto otorgado: \$2.684764  
Carácter de participación: becaria integrante del proyecto de investigación
- 2) Voluntariado 180°  
Institución otorgante: Universidad Nacional de La Plata  
Fines: desarrollar talleres de capacitación de producción inocua y mercantilización de productos artesanales para futuros externados del Hospital de Salud Mental Dr. Alejandro Korn  
Monto recibido: \$32.000

Carácter de participación: extensionista integrante del programa de Extensión Cátedra Libre en Salud y Derechos Humanos

3) Proyecto PROCODAS "Mejoramiento de la calidad panadera"

Institución otorgante: Universidad Nacional de La Plata

Fines: capacitar a productores artesanales en buenas practicas de manipulación de alimentos, mejorar sus instalaciones de producción y analizar los productos que elaboren para la venta.

Monto recibido: \$79.000

Carácter de participación: extensionista e investigadora integrante del programa de Extensión Cátedra Libre en Salud y Derechos Humanos

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

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

9hs semanales (16% demandado)

Cargo: Ayudante Alumno dedicación simple en la Cátedra Libre en Salud y Derechos Humanos de la Facultad de Cs. Exactas de la UNLP

**17. 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.*

Realicé una capacitación con becarias doctorales oriundas de la Universidad de la República (Uruguay) quienes realizaron pasantías en la Facultad de Ciencias Exactas de la UNLP. La temática abordada fue Evaluación de la Capacidad Micotoxigénica de hongos. Período de capacitación: 5/12/16 a 9/12/16

**18. DESCRIPCION DEL AVANCE EN LA CARRERA DE DOCTORADO.**

*Debe indicarse los logros alcanzados en la carrera de Doctorado en relación a los requisitos particulares de la misma (cursos, seminarios, trabajos de campo, etc), así como el porcentaje estimado de avance en la tesis.*

Teniendo en cuenta los objetivos específicos planteados en el plan de tesis, los porcentajes de avance de la misma son:

- Estudiar la capacidad antifúngica de los microorganismos probióticos ya aislados y conservados en la Cátedra de Microbiología - Facultad Ciencias Exactas - UNLP: 25%

- Estudiar la capacidad de secuestrar micotoxinas in vitro e in vivo por parte de los microorganismos aislados y analizar los mecanismos moleculares envueltos en la captura: 25%

- Determinar la capacidad reductora de la morbi-mortalidad de los microorganismos probióticos contra parásitos, principalmente coccidios como *Cryptosporidium* sp, *Eimeria* sp, etc. y bacterias enteropatógenas como *Salmonella*: 10%

Por fuera de los objetivos específicos planteados en la tesis:

- Aislamiento de bacterias lácticas y de otras bacterias de fermentos naturales: 100%

- Determinación de la CIM a antibióticos de cepas seleccionadas: 50%

Asistencia a cursos del área de trabajo: 50%

Asistencia a curso humanístico: 100%

**19. TITULO Y PLAN DE TRABAJO A REALIZAR EN EL PROXIMO PERIODO.** *Deberán indicarse claramente las acciones a desarrollar.*

PLAN DE TRABAJO PERIODO 2017-2018: Estudio de la aplicación de bacterias lácticas en la crianza de pollos para disminuir los efectos producidos por hongos, micotoxinas y parásitos

El plan de trabajo que se desarrolla a continuación para el periodo abril 2017-abril 2018, se basa en el plan de beca propuesto (Ver cronograma general). El objetivo es continuar con las actividades propuestas para el primero y segundo año. Además da inicio a los estudios de inhibición de la reinfección con parásitos propuesta en el plan de trabajo.

#### OBJETIVOS 2017-2018

- Estudiar la capacidad antifúngica de los microorganismos probióticos aislados a partir de fermentaciones naturales y conservados en la Cátedra de Microbiología - Facultad Ciencias Exactas - UNLP.
- Estudiar la capacidad de disminuir el daño celular causado por micotoxinas por parte de los microorganismos aislados y analizar los mecanismos moleculares envueltos en esta protección.
- Determinar la capacidad reductora de la morbi-mortalidad de los pollos por parte de los microorganismos probióticos contra parásitos, principalmente coccidios.

#### METODOLOGÍA:

Determinación de las propiedades antifúngicas de los microorganismos probióticos. Se fermentarán caldo MRS (DIFCO, Beauvais, Francia) y Permeado de suero líquido (Arla Foods, Buenos Aires, Argentina) o medio alternativo con los distintos microorganismos y se obtendrán los sobrenadantes libres de células (SLC) que se conservarán a -20 °C. Se evaluará la acción antifúngica de los SLC contra hongos toxicogénicos mediante tres métodos:

- Reducción del porcentaje de germinación de conidios (%RG). El screening de la acción antifúngica que ejercen los SLC obtenidos seguirá la técnica de porcentaje de reducción de la germinación de los conidios (Gerez et al., 2009; Lavermicocca et al., 2000), seleccionando los SLC que generen los mayores %RG.
- Método de difusión en agar. Se estudiará el efecto sobre la tasa de crecimiento y la fase de latencia fúngica de los SLC seleccionados en los estudios de reducción de germinación. (Molina y Giannuzzi, 1999; León et al., 2012; Gamba et al., 2015, 2016a,b).
- Método de sobrecapa. Cada microorganismo se cultivará en agar MRS, inoculando una línea e incubando por 24 horas. Al crecer, la estría se cubre con 10 ml de agar malta blando con 10<sup>4</sup> UFC/ml de hongos filamentosos. Se incuba por 4 días y se evalúa el halo de inhibición obtenido (Onilude et al., 2005).

Determinación de la producción de metabolitos antifúngicos. Se determinarán en los SLC, la presencia de metabolitos con actividad antifúngica mediante HPLC acoplada a espectrometría de masas y espectrometría de infrarrojo (Dieuleveux et al., 1998).

Actividad protectora contra la acción citotóxica de micotoxinas. Se determinará la viabilidad celular de cultivos de células HepG2 y Caco-2TC7 incubados previamente con microorganismos probióticos y desafiados con micotoxinas (Gamba et al., 2015).

La determinación del efecto de los microorganismos probióticos sobre la morbi-mortalidad de los pollos se realizará *in vivo* sobre un lote de 10 pollos de los cuales se tomará muestra del raspado intestinal de pollos al azar antes, durante y al finalizar el ciclo de producción para evaluar la infección con coccidios, sobre pollos tratados con y sin probiótico. También se determinará la presencia de coccidios en muestra de cama y en materia fecal. Además, se evaluarán parámetros de producción aviar como peso de los pollos al finalizar el ciclo de producción, características anatómicas y análisis visceral para evaluar el desarrollo de enfermedades que puedan afectar la producción.

Cronograma general del plan de beca: (Ver Plan de Beca)

1. Determinación de la capacidad antifúngica: durante el primer año
2. Análisis de metabolitos antifúngicos: durante el primer y segundo año
3. Evaluación del efecto protector contra aflatoxinas *in vitro* e *in vivo*: durante los cuatro años de tesis doctoral



4. Estudio de la inhibición de la reinfección con parásitos: desde segundo semestre del segundo año hasta el cuarto año de tesis doctoral

.....  
Firma del Director

.....  
Firma del Becario

---

### **Condiciones de 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 Becario, la que deberá incluir:

- a. Una copia en papel A-4 (puntos 1 al 14).
- b. Las copias de publicaciones y toda otra documentación respaldatoria, deben agregarse al término del desarrollo del informe
- c. Informe del Director de tareas con la opinión del desarrollo del becario (en sobre cerrado).

---

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