

CONTROL BIOLÓGICO IN VITRO POR BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS AISLADAS DE RESIDUOS DE CERVECERÍA

IN VITRO BIOLOGICAL CONTROL FOR LACTIC ACID BACTERIA ISOLATED FROM BREWER'S GRAINS

Gerbaldo G^{1,2*}, Asurmendi P^{1,2}, Ruíz F^{1,2}, Pascual L¹, Dalcero A^{1,2}, Barberis L.¹

¹Departamento de Microbiología e Inmunología. Universidad Nacional de Río Cuarto. Ruta 36 Km. 601. (5800) Río Cuarto, Córdoba. Argentina.

²Miembro of Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICET), Argentina.

Recibido: 14 de febrero de 2012.

Aceptado: 09 de junio de 2012.

Resumen

Los residuos de cervecería son suplementos de bajo costo y de fácil disponibilidad, sin embargo, el alto contenido de humedad los hace susceptibles a la degradación fúngica y al desarrollo de microorganismos patógenos. Las bacterias ácido lácticas (BAL) se encuentran formando parte de la microbiota de los granos de cebada, de manera tal, que podrían contribuir en la calidad y seguridad tanto de la malta como de los productos derivados. El objetivo de este estudio fue determinar la presencia BAL, especies fúngicas de *Aspergillus* sección *Flavi*, *Listeria monocytogenes* e incidencia de aflatoxina B₁ (AFB₁) en residuos de cervecería, y evaluar *in vitro* el efecto antifúngico y anti-aflatoxicogénico de las BAL. El análisis de los residuos de cervecería mostró que, en general, los recuentos de BAL fueron elevados durante todos los períodos analizados, sin embargo, el recuento de *Aspergillus* sección *Flavi*, *L. monocytogenes* e incidencia natural de AFB₁ fue variable. El hallazgo de *L. monocytogenes* es el primero informado en Argentina en este tipo de sustrato. *Lactobacillus coryniformis* subsp. *coryniformis* L47 y *Lactobacillus cellobiosus* L56 fueron las cepas más efectivas en

inhibir el crecimiento y la producción de AFB₁ de todas las cepas de *Aspergillus* sección *Flavi* ensayadas *in vitro*. Futuros estudios con estas cepas de BAL podrían realizarse para demostrar su efectividad *in situ* en estos sustratos alternativos destinados a la producción animal, así como también evaluar *in vitro* sus propiedades anti-*Listeria*.

Palabras clave: Bacterias ácido lácticas, *Aspergillus* sección *Flavi*, *Listeria monocytogenes*, Aflatoxina B₁, biocontrol.

Abstract

Brewer's grains are low cost and easy availability supplements, however, their high moisture level content makes them sensitive fungi and pathogenic microorganisms development. Lactic acid bacteria (LAB) found on the surface of malt barley may positively influence the quality and safety of malt and its derived products. The aim of this study was : i) to determine the presence of LAB, *Aspergillus* section *Flavi* strains and *Listeria monocytogenes*; ii) to evaluate the

***Autor corresponsal:**

Gerbaldo G., Departamento de Microbiología e Inmunología. Universidad Nacional de Río Cuarto. Ruta 36 Km. 601. (5800) Río Cuarto, Córdoba. Argentina. Tel. 54-0358-4676539. Correo Electrónico: ggerbaldo@exa.unrc.edu.ar

natural incidence of aflatoxin B1 in brewer's grains, and iii) to evaluate the antifungal and antiaflatoxicogenic effect of BAL *in vitro*. The analysis of brewer's grains showed that BAL counts were high during all studied periods. However, the *Aspergillus* section *Flavi* counts, the presence of *L. monocytogenes* and the natural occurrence of Aflatoxin B1 (AFB₁) were variable. The present study is the first report of the isolation of *L. monocytogenes* from brewer's grains in Argentina. *Lactobacillus coryniformis* subsp. *coryniformis* L47 and *Lactobacillus cellobiosus* L56 were the strains that showed the highest in inhibiting the growth and AFB₁ production of all *Aspergillus* section *Flavi* strains tested *in vitro*. Future studies with these LAB strains will be done to evaluate its effectiveness in brewer's grains *in situ* as well as to study its antilisteria properties *in vitro*.

Key words: Lactic acid bacteria, *Aspergillus* section *Flavi*, *Listeria monocytogenes*, Aflatoxin B₁, biocontrol.

Introducción

Muchas producciones pecuarias de la región central de Argentina utilizan los coproductos de la industria cervecera como alimentos alternativos a las dietas tradicionales (Gerbaldo *et al.*, 2011). Los residuos de cervecería son suplementos de bajo costo y de fácil disponibilidad, sin embargo, el alto contenido de humedad de los mismos dificulta el secado necesario para poder ser almacenados y posteriormente utilizados (Amaefule *et al.*, 2006). La mayoría de los hongos filamentosos y microorganismos de origen bacteriano tales como, *Salmonella* spp., *Escherichia* spp., *Listeria* spp. son contaminantes habituales de las materias primas de alimentos destinados al consumo animal (Schanberger *et al.*, 2004; Cotty *et al.*, 2007; Oliveira *et al.*, 2008; Carlson, 2011). *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp. y *Fusarium* spp. Son los hongos toxicogénicos más frecuentemente aislados de granos de cereales y piensos almacenados (Rosa *et al.*, 2009).

Las aflatoxinas (AFs) son metabolitos tóxicos secundarios producidos principalmente por *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* y *A. nomius*. Existen cuatro tipos de AFs: aflatoxina B₁ (AFB₁), aflatoxina B₂ (AFB₂), aflatoxina G₁ (AFG₁) y aflatoxina G₂ (AFG₂), siendo de particular interés la AFB₁ debido a que es uno de los más potentes mutágenos y carcinógenos naturales conocidos (Iheshiulor *et al.*, 2011; Reddy *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2011). Las micotoxinas son estables en los alimentos y resistentes a la degradación bajo procedimientos de cocción normales, por lo que es difícil eliminarlas una vez que se producen (Urrego *et al.*, 2006). Las bacterias ácido lácticas (BAL) se encuentran formando parte de la microbiota de los granos de cebada, de manera tal, que podrían influir en la calidad y seguridad tanto de la malta como de los productos derivados (Lowe *et al.*, 2004). El efecto preservante de las BAL está asociado principalmente a la producción de metabolitos secundarios tales como: ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno, bacteriocinas (Yang *et al.*, 2005; Dalié *et al.*, 2010). De esta manera el objetivo de este estudio fue determinar la presencia BAL, especies fúngicas de *Aspergillus* sección *Flavi*, *Listeria monocytogenes* e incidencia de AFB₁ en residuos de cervecería, y evaluar *in vitro* el efecto antifúngico y antiaflatoxicogénico de las BAL.

Material y Métodos

Muestras

Un total de 20 muestras de residuos de cervecería de una fábrica de cerveza artesanal, ubicada en Villa General Belgrano (31° 59' S 64° 34' O), Córdoba, Argentina fueron tomadas durante el período Julio de 2010 - Junio de 2011. Todas las muestras fueron procesadas para determinar la presencia de BAL, *Aspergillus* sección *Flavi* y *L. monocytogenes*.

Aislamiento de BAL y *A. flavus*

Se realizaron diluciones seriadas de cada una de las muestras en agua peptonada estéril hasta obtener una dilución 10⁻⁶. Para el

aislamiento de BAL, se tomó 1 mL de cada una de las diluciones y se colocaron por duplicado en placas de Petri estériles. Se depositó agar MRS (bioMérieux®, France) templado y se realizaron movimientos circulares a fin de homogenizar el contenido. Las placas se incubaron en microaerofilia a 37°C durante 48 h. Sólo las placas que contenían entre 30-300 unidades formadoras de colonias (UFC) se utilizaron para el recuento bacteriano. La identificación de las cepas de BAL se realizó mediante el sistema semiautomatizado API 50 CH (bioMérieux®, Francia). Para el recuento fúngico, se tomaron 0.1 mL de las diluciones 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3} y se inocularon por duplicado sobre los medios de cultivo agar diclorán cloranfenicol rosa de bengala (DRBC) y agar glicerol 18 % (DG18). Las placas se incubaron aeróbicamente a 25°C durante 7 días en oscuridad. Las placas que contenían entre 10 y 100 UFC fueron utilizadas para el recuento. Las especies fúngicas se identificaron según características morfológicas de acuerdo a la clave taxonómica de Klich (2002). Los resultados de ambos recuentos se expresaron como unidades formadoras de colonias por gramo (UFC g⁻¹).

Aislamiento de *Listeria* spp.

El aislamiento de *Listeria* spp. fue desarrollado de acuerdo al método descrito en el Manual de Bacteriología Analítica de la Food and Drug Administration (FDA) (Hitchins, 1995), con modificaciones en los medios y en el suplemento selectivo empleado. Para el enriquecimiento no selectivo se adicionó 25 g de muestra a 225 mL de caldo tripticasa soya (CTS) y se incubó durante 24 h a 37°C en microaerofilia. Posteriormente se colocó 1 mL del cultivo en 9 mL CTS suplementado con ceftazidima y tripaflavina para el enriquecimiento selectivo de *L. monocytogenes*, se reservó a 4°C durante 24 h y posteriormente se incubó durante 24 h a 37°C. El aislamiento se realizó en placas de medio PALCAM (Merck®) suplementado con ceftazidima y tripaflavina. A partir de colonias típicas se realizó coloración de Gram y se

procedió a la identificación en género y especie según lo propuesto por el Manual de Bergey de Bacteriología Sistemática (Holt *et al.*, 1994). Las cepas identificadas como *L. monocytogenes* se conservaron en CTS con el agregado de glicerol al 30% a -20 °C.

Incidencia natural de AFB₁

Se tomaron 15 g de muestra, se adicionó 100 mL de acetonitrilo: agua (84:16 % v/v) y se homogenizó en shaker durante 30 min. Luego, se separaron las fases con papel de filtro Whatman N°4 (Whatman, Inc., Clifton, New Jersey, USA) y 6 mL del filtrado se eluyó por una columna de limpieza Multisep AflaPat228® (Romer® Laboratorios, USA). Se recuperaron 4 mL del extracto, se secó por evaporación y se analizaron por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC). Para ello, el extracto seco se resuspendió en 500 µL de fase móvil, se tomó una alícuota de 200 µL y se le añadió 700 µL de una mezcla de trifluoracético-ácido acético-agua (20:10:70, v/v). La separación cromatográfica fue desarrollada sobre una columna de fase inversa (silica gel, 150 x 4.6 mm id., tamaño de la partícula 5-µ, VARIAN, Inc. Palo Alto, USA). Una mezcla de metanol:agua:acetonitrilo (17:66:17 v/v) se utilizó como fase móvil a una velocidad de flujo de 1.5 mL min⁻¹. La fluorescencia de las AFs derivatizadas se detectaron a una longitud de onda de λ 360 nm y λ 440 nm. Curvas de calibración fueron construidas con diferentes concentraciones de AFB₁. Aflatoxina B₁ fue cuantificada por correlación del área de los picos cromatográficos de los extractos de las muestras y de las curvas estándares. El límite de detección de la técnica fue de 1 ng g⁻¹ (Trucksess *et al.*, 2002).

Efecto de las BAL sobre el crecimiento fúngico

Las cepas de BAL a estudiar fueron cultivadas en caldo Rogosa (bioMérieux®, Francia) e incubadas en microaerobiosis a 37°C durante 24 h. Luego del período de incubación, se realizó una suspensión en caldo MRS (bioMérieux®, Francia) alcanzando una turbidez igual a la del tubo 0.5 de la es-

cala de McFarland (1.5×10^8 UFC mL⁻¹) y se inoculó 1 mL del cultivo de BAL en una placa de Petri estéril, se agregó caldo MRS (bioMérieux®, Francia) adicionado con agar al 1.2 % templado y se homogeneizó el contenido. Por otra parte, a partir de un cultivo de *Aspergillus* sección *Flavi* de 7 días de crecimiento en agar extracto de malta (MEA), se tomó una asada, se colocó en un tubo eppendorf conteniendo agar semisólido y se mezcló con el asa a fin de homogeneizar el contenido. Con asa en punta, se tomó una asada de la suspensión anterior y se realizó una punción central en la placa que contenía la BAL en estudio. El ensayo, se incubó a 25-27°C durante 7 días. Se examinó diariamente el crecimiento fúngico a través de la medición del diámetro de la colonia fúngica. Para cada colonia fúngica, dos diámetros medidos en ángulo recto uno de otro, se promediaron para encontrar la media de los diámetros. Todos los diámetros se determinaron utilizando 3 replicas de cada interacción. La velocidad de crecimiento radial (mm h⁻¹) se calculó por regresión lineal de la fase lineal de crecimiento y el tiempo en el cual la línea interceptó el eje x se utilizó para calcular la fase lag (h) en relación a la cepa fúngica y BAL. Paralelamente, se realizó un control positivo, en donde sólo se inoculó la cepa fúngica (Sitara *et al.*, 2008).

Efecto de las BAL sobre la producción de AFB₁

La extracción de AFs se realizó siguiendo la metodología propuesta por Geisen (1996) con modificaciones. De cada colonia de cada tratamiento, se tomaron tres asadas de caldo MRS (bioMérieux®, Francia) adicionado con agar al 1.2 % (1 x 1 cm), se transfirió a un tubo eppendorf al cual se le adicionaron 600 µL de cloroformo. La mezcla fue centrifugada a 10,000 rpm durante 10 min. Los trozos de agar fueron removidos, el extracto clorofórmico fue transferido a otro eppendorf y se evaporó mediante el uso de nitrógeno. La determinación cuantitativa se realizó por cromatografía líquida de alta definición (HPLC) siguiendo la metodología propuesta por Trucksess *et al.*, (2002).

Análisis estadístico

Los datos fueron evaluados mediante el análisis de la varianza (ANOVA) para determinar diferencias significativas entre los recuentos fúngicos y lácticos, parámetros de crecimiento y producción de AFB₁. La prueba de Tukey fue utilizado para determinar diferencias estadísticas entre los tratamientos con un valor p<0.05. Los análisis se realizaron mediante el empleo del software InfoStat versión 2011. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

Resultados y Discusión

El recuento de BAL y de especies del género *Aspergillus* sección *Flavi* en los diferentes períodos analizados se observan en la Tabla 1. En cuanto a las BAL, la mayoría de los recuentos se encontraron en el orden de 10⁸ UFC g⁻¹. Los recuentos más altos se observaron durante los períodos comprendidos entre enero y febrero de 2011, con un rango entre 2.3×10^8 y 1.6×10^9 UFC g⁻¹ y una media de 9.1×10^8 UFC g⁻¹, mientras que durante el período de noviembre-diciembre de 2010 se obtuvieron los menores recuentos de BAL con un rango entre 5.35×10^7 y 2.5×10^8 UFC g⁻¹ y una media de 1.5×10^8 UFC g⁻¹. Por otro lado, los mayores recuentos de *Aspergillus* sección *Flavi* se observaron durante el período de noviembre-diciembre de 2010 con un rango de 1×10^3 - 4×10^4 UFC g⁻¹ y una media de 2.35×10^4 UFC g⁻¹. Sin embargo, durante el período de mayo-junio de 2011 no se aislaron especies fúngicas pertenecientes a este género.

Cuando se investigó la presencia de *Listeria* spp. En las diferentes muestras de residuos de cervecería, en sólo una de ellas se aisló *L. monocytogenes* correspondiendo al período noviembre-diciembre de 2010.

El análisis de la incidencia natural de AFB₁ en el sustrato demostró que 5 muestras del total estudiado presentaron niveles detectables de la toxina. Las mismas fueron recolectadas entre los meses de septiembre 2010 y febrero 2011 (Tabla 1).

Tabla 1.
Determinación de BAL, *Aspergillus* sección *Flavi*, *Listeria monocytogenes* e incidencia natural de AFB₁ en los residuos de cervecería.

Período de muestreo	Rango de los recuentos (UFC g ⁻¹)		Presencia	Incidencia
	BAL	<i>A.</i> sección <i>Flavi</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	Niveles medios de AFB ₁ (ng g ⁻¹)
Jul-Ago 2010	3,43x10 ⁸ -4,7x10 ⁸	1x10 ³ -1x10 ⁴	-	ND*
Sep-Oct 2010	4,4x10 ⁷ -7,9x10 ⁸	1x10 ² -1x10 ⁴	-	18,5
Nov-Dic 2010	5,35 x10 ⁷ -2,5x10 ⁸	1x10 ³ -4x10 ⁴	+	26,4
Ene-Feb 2011	2,3x10 ⁸ -1,6x10 ⁹	1x10 ⁴ -2x10 ⁴	-	17,2
Mar-Abr 2011	5,3x10 ⁸ -8,9x10 ⁸	1x10 ² -3x10 ⁴	-	ND
May-Jun 2011	7,1x10 ⁶ -2,7x10 ⁹	ND	-	ND

*ND: por debajo del límite de detección de la técnica 1 ng g⁻¹; (-): ausencia de *Listeria monocytogenes*; (+): presencia de *Listeria monocytogenes*.

Estudios de crecimiento

Para este estudio, se seleccionaron colonias de BAL al azar de aquellas muestras en donde el recuento fúngico fue bajo, el de BAL fue alto y ausencia de *Listeria* spp. Las cepas fúngicas aisladas de los residuos de cervecería altamente productores de toxina (Gerbaldo *et al.*, 2011) fueron depositadas en un centro de colección de la Universidad Nacional de Río Cuarto, Córdoba, Argentina (RC) (*Aspergillus flavus* RC2053, RC2054, RC2055, RC2056, *A. parasiticus* RC2062) y utilizadas para este

ensayo. La identificación de las diferentes cepas de BAL fueron las siguientes: *Pediococcus pentosaceus* L6, *Lactobacillus plantarum* L12, *Leuconostoc mesenteroides* L18, *L. coryniformis* subsp. *coryniformis* L47, *L. brevis* L52 y *L. cellobiosus* L56. En la Tabla 2 muestra el efecto de las BAL sobre la fase de latencia de las diferentes cepas fúngicas. Se observó que el 50 % de las BAL aumentó significativamente (p<0.05) la fase de latencia de las cepas de *Aspergillus* sección *Flavi*, siendo L56 y L47 las cepas que mostraron el mayor incremento de dicho parámetro, alcanzando un máximo de 80

Tabla 2.
Efecto de las BAL sobre la fase de latencia de las cepas de *Aspergillus* sección *Flavi*.

Cepas de BAL	Fase lag (h)				
	<i>Aspergillus</i> sección <i>Flavi</i>				
	RC2053	RC2054	RC2055	RC2056	RC2062
Control	25 ^c	24 ^{bc}	24 ^d	21 ^d	24 ^{cd}
<i>P. pentosaceus</i> L6	-	18 ^{bc}	20 ^e	22 ^{cd}	21 ^d
<i>L. plantarum</i> L12	40 ^b	25 ^{bc}	40 ^a	35 ^a	28 ^{bc}
<i>L. mesenteroides</i> L18	-	6 ^c	5 ^f	3 ^e	30 ^b
<i>L. coryniformis</i> subsp. <i>coryniformis</i> L47	47 ^a	52 ^{ab}	40 ^a	25 ^{bc}	50 ^a
<i>L. brevis</i> L52	16 ^d	-	28 ^c	28 ^b	24 ^{cd}
<i>L. cellobiosus</i> L56	-	80 ^a	33 ^b	36 ^a	33 ^{bc}

Valores medios de los datos por cuadruplicado. La media de los valores en las columnas con letras en común no son estadísticamente significativas de acuerdo al test de Tukey (p<0.05). RC2053, RC2054, RC2055, RC2056: *A. flavus*; RC2062: *A. parasiticus*. (-) Bajo esta condición las cepas no fueron capaces de alcanzar la fase exponencial.

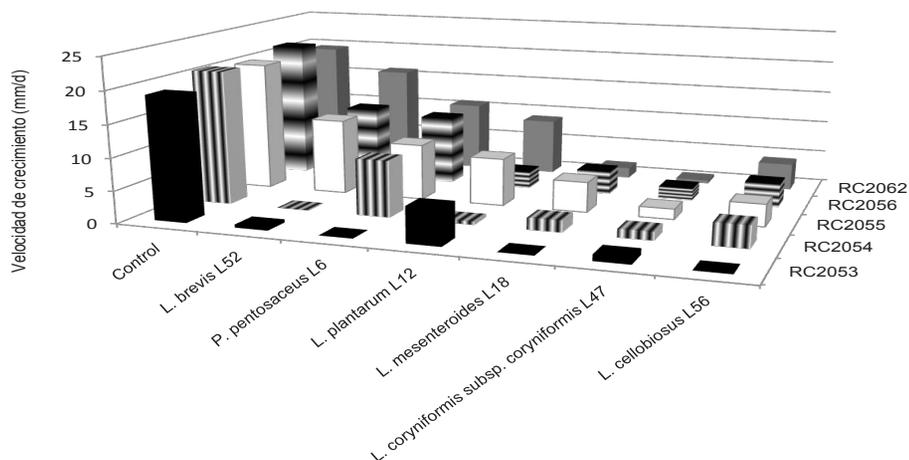


Figura 1. Efecto de BAL sobre la velocidad de crecimiento de las cepas de *Aspergillus* sección *Flavi*
Valores medios basados en datos por cuadruplicado. RC2053; RC2054; RC2055; RC2056: *A. flavus*; RC2062: *A. parasiticus*.

y 52 h, respectivamente. La Figura 1 muestra el efecto de BAL sobre la velocidad de crecimiento de *A.* sección *Flavi*. Los perfiles de velocidad de crecimiento mostraron que todas las BAL redujeron significativamente ($p < 0.05$) el crecimiento de las cepas de *A.* sección *Flavi* estudiadas. *Pediococcus pentosaceus* L6, *Leuconostoc mesenteroides* L18 y *Lactobacillus cellobiosus* L56 suprimieron completamente el desarrollo micelial de *Aspergillus Flavi* RC2053 mientras que *Lactobacillus brevis* L52 inhibió completamente el crecimiento micelial de *Aspergillus Flavi* RC2054. La interacción de *L. coryniformis* subsp. *coryniformis* L47 con las cin-

co cepas de *Aspergillus* section *Flavi* ensayadas demostró una reducción significativa ($p < 0.05$) en la tasa de crecimiento con respecto al control. La reducción de la tasa de crecimiento de *Aspergillus flavus* RC2053, RC2054, RC2055, RC2056 y *A. parasiticus* RC2062 fue de 95 %, 94 %, 92 %, 91 % y 97 %, respectivamente.

Análisis de AFB₁

El efecto de las diferentes BAL sobre la inhibición de la producción de AFB₁ se muestra en la Figura 2. En general, cuando las cepas fúngicas se co-cultivaron con las dife-

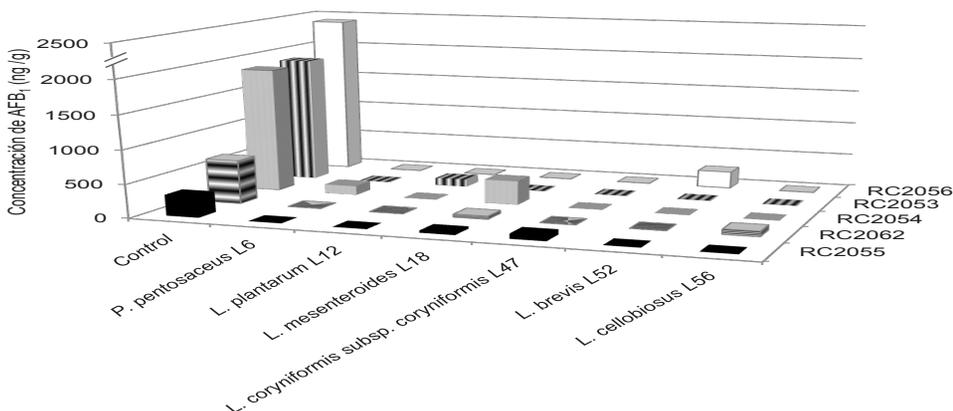


Figura 2. Efecto de las BAL sobre la producción de aflatoxina B₁ por las cepas de *Aspergillus* sección *Flavi*.
Valores medios basados en los datos por cuadruplicado.

rentes BAL, la producción de AFB₁ mostró un patrón similar al observado en la velocidad de crecimiento. La presencia de las cepas de BAL no estimularon la producción de AFB₁ en ninguna de las cepas de *Aspergillus* sección *Flavi* ensayadas. Las cepas de *Aspergillus* section *Flavi* mostraron un reducción significativa ($p < 0.05$) en la producción de AFB₁ cuando fueron co-cultivadas con *L. coryniformis* subsp. *coryniformis* L47 y *L. cellobiosus* L56, con un decrecimiento en la producción de la toxina entre 75-100 % y 88-100 %, respectivamente. La producción de AFB₁ por la cepa de *A. flavus* RC2056 fue significativamente ($p < 0.05$) reducida por todas las cepas lácticas estudiadas comparadas con el control.

El análisis de los residuos de cervecía mostró que el número de BAL se mantuvo con recuentos elevados durante los meses analizados. No se encontró correlación entre los recuentos de BAL y la época del año, lo que indicaría que las variaciones de temperatura y humedad en Villa General Belgrano no influyen en el desarrollo de estos microorganismos. Los recuentos de BAL obtenidos en este trabajo coinciden con los resultados informados en un estudio previo realizado por este grupo de investigación (Gerbaldo *et al.*, 2011) quienes obtuvieron recuentos similares al trabajar con el mismo sustrato. Sin embargo, no coincidimos con Wang *et al.*, (2008) quienes informaron recuento de BAL del orden de 10^7 UFC g⁻¹ cuando analizaron residuos de cervecía secos. Los altos recuentos de *Aspergillus* sección *Flavi* detectados en el período noviembre-diciembre 2010 sugieren que el desarrollo fúngico se vio influenciado por las condiciones climáticas debido a que en este período las temperaturas cálidas y el elevado porcentaje de humedad podrían haber favorecido el desarrollo de la microbiota, a diferencia del período mayo-junio 2011 en donde no se aislaron especies de *Aspergillus* sección *Flavi*, coincidiendo con la época invernal en donde las temperaturas oscilan entre -2 y 14°C. El hallazgo de *L. monocytogenes* es el primero informado en Argentina en este tipo de sustrato. El desarrollo de estos microorganismos pa-

tógenos podría afectar no sólo a los animales que consumen este alimento sino además a humanos que consumen carne de cerdo. Por otro lado, la presencia de hongos toxicogénicos constituye un riesgo potencial a la contaminación con AFs por lo que la inhibición de los hongos productores de toxina podría evitar la formación de AFB₁ en los piensos. Sin embargo, en este estudio se pudo observar que en aquellas muestras en donde el recuento de cepas lácticas era elevado, el recuento de *Aspergillus* sección *Flavi*, presencia de *L. monocytogenes* y la incidencia de AFB₁ era bajo o nulo, lo que nos permite pensar que las BAL ejercen un efecto biopreservante *in situ*.

Además este estudio demostró el efecto antifúngico de las BAL *in vitro*. *Lactobacillus coryniformis* subsp. *coryniformis* L47 y *L. cellobiosus* L56 fueron las cepas más efectivas en inhibir el crecimiento y la producción de AFB₁ de todas las cepas de *Aspergillus* sección *Flavi* ensayadas *in vitro*. La inhibición de la velocidad de crecimiento de las cepas fúngicas por las BAL podría deberse a varios mecanismos; uno de ellos es la producción de metabolitos secundarios. Las BAL son capaces de producir diferentes tipos de moléculas bioactivas como: ácidos orgánicos, ácidos grasos, peróxido de hidrógeno y bacteriocinas (Ström, *et al.*, 2002; Valerio, *et al.*, 2009). La presencia de estas sustancias en el medio de cultivo podrían inhibir el desarrollo de las cepas de *Aspergillus* sección *Flavi*, como se observó en nuestros ensayos. El ácido láctico y el ácido acético son los principales productos de la fermentación de los carbohidratos producidos por las BAL. Estos ácidos difunden a través de la membrana de los microorganismos sensibles, reduciendo el pH citoplasmático y causando así la pérdida de la viabilidad y destrucción celular (Gerez, *et al.*, 2009; Dalié, *et al.*, 2010).

Por otro lado, la fuerte actividad inhibitoria podría ser atribuida a la competición por los nutrientes entre las BAL y las cepas *A. sección Flavi*. En un cultivo en donde no se adicionan sustratos frescos durante el período de incubación, las BAL serían más competen-

tes que los hongos, debido a que son microorganismos más simples y con un metabolismo más rápido. Resultados similares fueron obtenidos por Zara *et al.*, (2003) y Kam *et al.*, (2007) quienes ensayaron los efectos de las BAL sobre otras especies del género *Aspergillus*. Aryantha *et al.*, (2007) informaron que *Lactobacillus delbrueckii*, *L. fermentum* y *L. plantarum* podrían controlar el crecimiento y la producción de AFs por cepas de *A. flavus*.

Cuando los aislados fúngicos crecieron en presencia de las BAL, la acumulación de AFB₁ demostró la misma tendencia que la velocidad de crecimiento. Ninguna de las cepas de BAL estimuló la acumulación de AFB₁ *in vitro* en ninguna de las cepas fúngicas ensayadas. Además, la producción de la toxina *in vitro* fue inhibida totalmente por la mayoría de las BAL estudiadas. Es probable que la baja concentración de AFB₁ en presencia de las BAL pudiera deberse a la baja formación de biomasa micelial. La inhibición del crecimiento afectaría directamente la producción de AFB₁ debido a la baja síntesis de las enzimas involucradas en la producción de la toxina. Por otro lado, la AFB₁ es un metabolito secundario, el cual no es sintetizado durante el crecimiento primario del hongo, por ello, la inhibición del crecimiento podría reducir así su síntesis. Nuestros resultados coinciden con los de Zinedine *et al.*, (2005) quienes demostraron la habilidad de las BAL en reducir la concentración de AFB₁ en más de un 45 %. Otras investigaciones

demostraron que una cepa de *L. plantarum* redujo significativamente la producción de AFB₁ *in vitro* e *in situ* en granos de maíz contaminados con la toxina (Khanafari *et al.*, 2007a y Khanafari *et al.*, 2007b).

Este estudio presenta resultados promisorios con respecto a la inhibición del desarrollo de *Aspergillus* sección *Flavi* y la acumulación de AFB₁ *in situ* como así también la reducción del crecimiento fúngico y la producción de AFB₁ *in vitro* por las cepas lácticas. Además se demostró la presencia de *L. monocytogenes*, futuros estudios sobre la inhibición de *listeria* por BAL se están realizando por el grupo de investigación (datos no publicados). Las BAL aisladas de los residuos de cervecería son probablemente biocontroladoras naturales, las cuales son capaces de mejorar la seguridad microbiológica en estos alimentos alternativos destinados a la producción porcina en Argentina. Estas cepas bacterianas podrían ser una buena estrategia de control sobre el crecimiento fúngico y el de *L. monocytogenes*, como así también la producción de AFB₁ en los piensos almacenados antes de ser destinados a la alimentación animal. Debido a que *L. coryniformis* subsp. *coryniformis* L47 y *L. cellobiosus* L56 fueron las mejores cepas de BAL en inhibir *in vitro* el crecimiento y la producción de AFB₁, futuros estudios con estas cepas podrían realizarse para demostrar su efectividad *in situ* en estos sustratos alternativos destinados a la producción animal, como así también evaluar *in vitro* sus propiedades anti-*listeria*.

Literatura citada

- Amaefule KU, Onwudike OC, Ibe SN, Abasiokong SF. Performance, cost benefit, carcass quality and organ characteristics of pigs fed high graded levels of brewers' dried grain diets in the humid tropics. *Pakistan Journal of Nutrition* 2006; 5: 242-247.
- Aryantha INP, Lunggani AT. Suppression on the aflatoxin-B production and the growth of *Aspergillus flavus* by Lactic Acid Bacteria (*Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus fermentum* and *Lactobacillus plantarum*). *Biotechnology* 2007; 6: 257-262.
- Carlson, JC. Efficacy of European starling control to reduce *Salmonella enterica* contamination in a concentrated animal feeding operation in the Texas panhandle. *BioMed Central (BMC) Veterinary Research* 2011; 7: 9.

- Cotty P, García R. Influences of climate on aflatoxin producing fungi and aflatoxin contamination. *Journal of Food Microbiology* 2007; 119: 109-115.
- Dalié DKD, Deschamps DKD, Richard-Forget F. Lactic acid bacteria – Potential for control of mould growth and mycotoxins: A review. *Food Control* 2010; 21: 370-380.
- Geisen R. Multiplex polymerase chain reaction for the detection of potential aflatoxin and sterigmatocystin producing fungi. *Systematic and Applied Microbiology* 1996; 19: 388-392.
- Gerbaldo AG, Pereyra CM, Cavaglieri LR, Ruíz F, Pascual L, Dalcero AM, *et al.* Surveillance of aflatoxin and microbiota related to brewer's grain destined for swim feed in Argentina. *Veterinary Medicine International* 2011; 912480.
- Gerez CL, Torino MI, Rollán G, Font de Valdez G. Prevention of bread mould spoilage by using lactic acid bacteria with antifungal properties. *Food Control* 2009; 20: 144–148.
- Hitchins AD. *Listeria monocytogenes*. En: Food and drugs administrations. *Bacteriological Analytical Manual*. 8° ed. Arlington: Association of Official Analytical Communities (AOAC) international 1995; 10.01-11.08.
- Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, Staley JT, Williams ST. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Novena edición. United States: Williams and Wilkins, Baltimore, MD, 1994. 527- 570.
- Iheshiulor OOM, Esonu BO, Chuwuka OK, Omede AA, Okoli IC, Ogbuewu IP. Effects of Mycotoxins in Animal Nutrition: A Review. *Asian Journal of Animal Sciences* 2011; 5 (1): 19-33.
- Kam PV, Bianchini A, Bullerman LB. Inhibition of mold growth by sourdough bread cultures. *RURALS: Review of undergraduate research in agricultural and life sciences* 2007; 2(5): 1-12.
- Khanafari A, Soud H, Miraboufathi M, Karamei Osboo R. An in vitro investigation of Aflatoxin B1 biological control by *Lactobacillus plantarum*. *Pakistan Journal of Biological Science* 2007a; 10(15): 2553- 2556.
- Khanafari A, Soudi H, Miraboufathi M. Biocontrol of *Aspergillus Flavus* and aflatoxin B1 production in corn. *Iranian Journal of Environmental Health, science and Engineering* 2007b; 4(3): 163-168.
- Klich MA. *Identification of Common Aspergillus Species*. Utrecht, The Netherlands. 2002.
- Lowe DP, Arendt EK. The use and effects of lactic acid bacteria in malting and brewing with their relationships to antifungal activity, mycotoxins and gushing: A review. *Journal of Institute of Brewing* 2004; 110(3): 163-180.
- Oliveira M, Guerra M, Bernardo F. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in silages assessed by fluorescent *in situ* hybridization. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 2008; 60(1): 267-269.
- Reddy KRN, Raghavender CR, Salleh B, Reddy CS, Reddy BN. Potential of aflatoxin B1 production by *Aspergillus flavus* strains on commercially important food grains. *International Journal of Food Science and Technology* 2011; 46: 161-165.

- Rosa CAR, Keller KM, Keller LAM, González Pereyra ML, Pereyra CM, Dalcerro AM, *et al.* Mycological survey and ochratoxin A natural contamination of swine feedstuffs in Rio de Janeiro State, Brazil. *Toxicon* 2009; 53(2): 283-288.
- Schamberger GP, Phillips RL, Jacobs JL, Diez-Gonzalez F. Reduction of *Escherichia coli* O157:H7 populations in cattle by addition of colicin E7-Producing *E. coli* to feed. *Applied and Environmental microbiology* 2004; 70 (10): 6053-6060.
- Sitara U, Niaz I, Naseem J, Sultana N. Antifungal effect of essential oils on *in vitro* growth of pathogenic fungi. *Pakistan Journal of Botany* 2008; 40 (1): 409-414.
- Ström K, Sjögren J, Broberg A, Schnürer J. *Lactobacillus plantarum* MiLAB 393 produces the antifungal cyclic dipeptides cyclo(L-Phe-L-Pro) and cyclo(L-phe-*trans*-4-OH-L-Pro) and 3-Phenyllactic acid. *Applied and Environmental Microbiology* 2002; 68: 4322-4327.
- Trucksess MW, Pohland AE. Methods and method evaluation for mycotoxins. *Molecular Biotechnology* 2002; 22: 287-292.
- Urrego J, Díaz G. Aflatoxinas: Mecanismos de toxicidad en la etiología de cáncer hepático. *Revista de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia* 2006; 54(2): 108-116.
- Valerio F, Favilla M, De Bellis P, Sisto A, de Candia S, Lavermicocca P. Antifungal activity of strains of lactic acid bacteria isolated from a semolina ecosystem against *Penicillium roqueforti*, *Aspergillus niger* and *Endomyces fibuliger* contaminating bakery products. *Systematic and Applied Microbiology* 2009; 32: 438-448.
- Wang F, Nishino N. Ensiling of soybean curd residue and wet brewers grains with or without other feeds as a total mixed ration. *Journal of Dairy Science* 2008; 91: 2380-2387.
- Wang J, Ogata M, Hirai H, Kawagishi H. Detoxification of aflatoxin B1 by manganese peroxidase from the white-rot fungus *Phanerochaete sordid* YK-624. *FEMS Microbiological Letters* 2011; 314: 164-169.
- Yang VW, Clausen CA. Determining the suitability of Lactobacilli antifungal metabolites for inhibiting mould growth. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 2005; 21: 977-981.
- Zara ML, Belc N, Bahrim G, Vasile A. The study of antifungal action expressed by some bacterial selected strains. *Food Technology* 2003; 6: 80-84.
- Zinedine A, Faid M, Benlemlih M. *In vitro* reduction of aflatoxin B1 by strains of lactic acid bacteria isolated from Moroccan sourdough bread. *International Journal of Agriculture and Biology* 2005; 7(1): 67-70.