

# **UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL**

## **Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas**



Tesis para la obtención del Grado Académico de Doctor en Ciencias Biológicas

### **“DESARROLLO DE UN SISTEMA DE BIOPRESERVACIÓN PARA SANGRE AVIAR OBTENIDA EN MATADEROS”**

María Virginia Zbrun

Director de Tesis: Dr. Marcelo R. Rosmini

Co-Director de Tesis: Dr. Marcelo L. Signorini

Lugar de realización: Laboratorio de Análisis de Alimentos-  
Departamento de Salud Pública- Facultad de Ciencias Veterinarias

Universidad Nacional del Litoral

**-2013-**

## *Dedicatoria*

---

*A mi familia*

# *Agradecimientos*

---

- ✓ A mi Director, Dr. Marcelo R. Rosmini, por aceptar y cumplir su rol de manera excelente. Muchas gracias.
- ✓ A mi Co-Director, Dr. Marcelo L. Signorini, a quien le debo agradecer infinitamente por TODO lo compartido durante estos años.
- ✓ A las autoridades de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas por haber hecho posible la realización de mis estudios de posgrado.
- ✓ A la Facultad de Ciencias Veterinarias por haberme proporcionado el lugar físico para el desarrollo de esta tesis.
- ✓ A la Universidad Nacional del Litoral y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas por brindarme los recursos económicos para la realización de este trabajo experimental además de posibilitar mi formación académico-profesional.
- ✓ A las empresas que me permitieron el ingreso a sus plantas para realizar los muestreos de sangre, principalmente a la Sra. Gabriela Bernardi.
- ✓ A Meli y Emanuel, mis compañeros de mesada en este largo camino durante el cual no solo investigamos sobre bacterias, sino que también aprendimos a ayudarnos mutuamente y trabajar en equipo.
- ✓ A todos los chicos y profes del Departamento de Salud Pública, amigos de la vida, que todo el tiempo están a mi lado acompañándome en mi carrera profesional. Gracias por hacer que nuestro grupo sea una gran familia.
- ✓ A la Dra. Lorena Soto, mi amiga del Laboratorio, por compartir 8 horas de su vida conmigo.
- ✓ Al Dr. Laureano S. Frizzo, por ser el principal mentor en la carrera profesional que escogí para mi vida. Muchas gracias!

# *Producción Científica*

---

## **1- PRODUCCIÓN TECNOLÓGICA CON TÍTULO DE PROPIEDAD INTELECTUAL:**

Tipo de título de propiedad intelectual: Patente Internacional (en trámite)

Título: Bacterias ácido lácticas como bioconservantes de sangre aviar

Inventores: Zbrun María Virginia, Frizzo L.S., Soto L.P., Sequeira G.J., Signorini M.L., Rosmini M.R.

Fecha de solicitud: Julio 2013

## **2- ARTÍCULOS Y RESÚMENES PUBLICADOS EN REVISTAS CIENTÍFICAS:**

**2013- Zbrun, M.V.**, Altina, M.G., Bonansea, E., Frizzo, L.S., Soto, L.P., Romero-Scharpen, A., Rosmini, M.R., Sequeira, G.J., Signorini, M.L. Identification of lactic acid bacteria with potential biopreservative isolated from slaughterhouse avian blood. Archivos de Medicina Veterinaria 45, 273-282 (2013)

**2011- Zbrun, M.V.**; Altina M.G.; Bonansea, E.F; Signorini, M.L., Soto, L.P., Sequeira, G.J., Rosmini, M.R. & Frizzo, L.S. Preservation of avian blood from slaughterhouses: evaluation of different additives. Biocell, 35(2), A165.

**2010- Zbrun, M Virginia**; Altina, Melisa; Bonansea, Emanuel; Frizzo, Laureano; Soto, Lorena; Rosmini, Marcelo; Signorini, Marcelo. Identificación de bacterias ácido lácticas aisladas de sangre de matadero aviar. Revista Argentina de Microbiología, vol. 42 (Supl-1), 33

### 3- PRESENTACIONES A CONGRESOS Y JORNADAS:

**2011, Zbrun, M.V.**, Signorini, M.L., Soto, L.P., Rosmini, M.R., Frizzo, L.S. Sistema de bioconservación de sangre de matadero: Efecto de aditivos inhibidores de bacterias nocivas. XIII Congreso-XXXI Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Rosario. Rosario (Argentina), 1-2 de diciembre de 2011.

**2010- Zbrun, M.V.;** Altina M.G.; Bonansea, E.F; Signorini, M.L.; Soto, L.P.; Sequeira, G.J.; Rosmini, M.R.; Frizzo, L.S. Conservación de sangre aviar de matadero, evaluación del uso de distintos aditivos XII Congreso y XXX Reunión Anual. Sociedad de Biología de Rosario Lugar: Rosario, Santa Fe;

**2010- Zbrun, M. Virginia;** Altina, Melisa; Bonansea, Emanuel; Frizzo, Laureano; Soto, Lorena; Rosmini, Marcelo; Signorini, Marcelo. “Identificación de bacterias ácido lácticas aisladas de sangre de matadero aviar”. XII Congreso Argentino de Microbiología, VI Congreso de la Sociedad Argentina de Bacteriología, Micología y Parasitología Clínica (SADEBAC), I Congreso de Microbiología Agrícola y Ambiental (DIMAYA), Buenos Aires, 17 al 20 de octubre.

**2009- Zbrun, M.V.;** Welschen N., Soto, L.P.; Signorini M.L.; Rosmini M.R.; Frizzo, L.S. “Estudio de la microbiota mesófila en sangre aviar obtenida en mataderos.” X Jornadas de Divulgación Técnico-Científicas 2009. Facultad de Ciencias Veterinarias-Universidad Nacional de Rosario. Casilda, 16 de setiembre.

**2009- M. V. Zbrun,** N. Welschen, L.P Soto, M.L. Signorini, M.R. Rosmini; L.S. Frizzo. “Preliminary study of lactic acid bacteria in avian blood from slaughterhouses for use as biopreservative”. III Simposio Internacional de II Bacterias Lácticas Segundo Encuentro de la Red Argentina de Bacterias Lácticas (Red-BAL). 15-17 de Septiembre. San Miguel de Tucumán-Tucumán, Argentina.

# ***ÍNDICE***

---

<b><u>INDICE GENERAL</u></b>	Página
<b>Lista de abreviaturas</b> .....	1
<b>Resumen</b> .....	3
<b>Abstract</b> .....	4
<b>Introducción</b> .....	5
1- Justificación.....	6
2- Antecedentes bibliográficos.....	7
2-A. Aprovechamiento de Subproductos de la industria cárnica avícola.....	7
2-B. Productos obtenidos a partir del procesamiento de la sangre y derivados.....	8
2-C. Recolección y separación de la sangre de matadero.....	10
2-D. Sistemas de conservación de la sangre en los mataderos.....	13
2-E. Biopreservación de sangre obtenida en mataderos.....	15
<b>Objetivos</b> .....	20
<b>CAPÍTULO I</b> .....	23
I- Objetivo específico a alcanzar.....	24
I- Materiales y métodos.....	25
1. a) Toma de muestras y evaluación de las principales poblaciones bacterianas presentes en sangre aviar de matadero.....	25
1. b) Aislamiento y caracterización mediante pruebas fenotípicas/genotípicas de BAL presentes en sangre aviar obtenida en mataderos.....	27
1. b) 1- Aislamiento y caracterización fenotípica de las BAL.....	27
1. b) 2-Estudio genotípico de las BAL mediante la técnica de ARDRA (Amplified rDNA Restriction Analysis).....	28
1. c) Aislamiento y caracterización fenotípica-genotípica de microorganismos A/P aislados de de sangre aviar de matadero.....	30
1- c) 1-Aislamiento y caracterización fenotípica de las bacterias A/P autóctonas.....	30
1- c) 2- Caracterización genotípica de los microorganismos A/P autóctonos.....	32
I- Resultados.....	33

**Índice**

1. a) Evaluación de la microbiota presente en sangre de matadero aviar.....	33
1. b) Aislamiento y caracterización de las BAL mesófilas presentes en sangre recogida de frigoríficos de pollos mediante pruebas fenotípicas .....	34
1. b) 1- Aislamiento y caracterización fenotípica de BAL mesófilas .....	34
1. b) 2- Caracterización genotípica de BAL mediante la técnica de ARDRA (Amplified rDNA Restriction Analysis).....	35
1. c) Aislamiento y caracterización fenotípica/genotípica de microorganismos A/P aislados de sangre aviar obtenida en mataderos.....	38
I- Discusión.....	39
I- Conclusiones parciales.....	42
<b>CAPÍTULO II.....</b>	<b>43</b>
II- Objetivo específico a alcanzar.....	44
II- Materiales y métodos.....	46
2. Selección de los mejores exponentes de las BAL aisladas mediante técnicas in-vitro.....	46
2. a) Evaluación de la capacidad antagonista de las bacterias lácticas frente a microorganismos indicadores.....	46
2. b) Identificación de las BAL seleccionadas mediante técnicas moleculares.....	49
2. c) Estudio de la cinética de crecimiento de las BAL en caldo MRS.....	49
2. d) Evaluación de la termosensibilidad de los BAL seleccionadas para conformar el sistema de biopreservación.....	50
II- Resultados.....	51
2. Selección de los mejores exponentes de las BAL aisladas mediante técnicas in-vitro.....	51
2. a) Estudio de la capacidad antagonista de las BAL frente a microorganismos indicadores de colección.....	51
2. b) Identificación genotípica de las BAL seleccionadas con base en la capacidad inhibitoria frente a las cepas indicadoras y A/P autóctonas.....	54
2. c) Estudio de la cinética de crecimiento de las BAL en caldo MRS.....	55



**Índice**

2. d) Evaluación de la termosensibilidad de las BAL seleccionadas para conformar el sistema de biopreservación.....	58
II- Discusión.....	60
II- Conclusiones parciales.....	65
<b>CAPÍTULO III.....</b>	<b>66</b>
III- Objetivo específico a alcanzar.....	67
III- Materiales y métodos.....	68
3) Selección de aditivos a evaluar para luego incorporarlos al SB.....	68
3. a) Evaluación del efecto de los aditivos inhibidores seleccionados frente a los A/P en medio BHI.....	68
3. b) Evaluación del efecto de los aditivos seleccionados y sus combinaciones frente al desarrollo de las BAL y de los A/P en suero equino estéril.....	69
III- Resultados.....	71
3. a) Evaluación del efecto de los aditivos inhibidores seleccionados frente a los A/P en medio BHI.....	71
3. b) Evaluación del efecto de los aditivos seleccionados y sus combinaciones frente al desarrollo de las BAL y de los A/P en suero equino estéril.....	78
III- Discusión.....	82
III- Conclusiones parciales.....	85
<b>CAPÍTULO IV.....</b>	<b>86</b>
IV- Objetivo específico a alcanzar.....	87
IV- Materiales y métodos.....	88
4. a) Evaluación de la capacidad de inhibición del SB en sangre equina estéril frente a los microorganismos A/P autóctonos.....	88
4. b) Efecto del SB sobre los recuentos microbianos de las distintas poblaciones en sangre de matadero .....	91
4. c) Análisis de los efectos del SB sobre la sangre de mataderos.....	92
VI- Resultados.....	94
4. a) Evaluación de la capacidad de inhibición del SB frente a los microorganismos A/P autóctonos inoculados en sangre equina estéril.....	94

## Índice

4. b) Recuentos microbianos de las distintas poblaciones inoculadas en sangre de matadero con el SB.....	98
4. c) Análisis de los efectos de las BAL y sus metabolitos sobre la sangre.....	100
VI- Conclusiones parciales.....	107
<b>Discusión general.....</b>	<b>108</b>
<b>Conclusiones generales.....</b>	<b>111</b>
<b>Bibliografía.....</b>	<b>113</b>

**Índice****ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS**

<b>TABLAS</b>	<b>Página</b>
<b>Tabla 1:</b> Ejemplos del empleo de sangre animal en alimentos para humanos.....	9
<b>Tabla 2:</b> Especies de BAL asignadas a los aislamientos obtenidos de sangre aviar de mataderos.....	36
<b>Tabla 3:</b> Especies de bacterias A/P asignadas a los aislamientos obtenidos de sangre aviar de mataderos.....	38
<b>Tabla 4:</b> Porcentaje de ELC que inhibieron a las cepas indicadoras.....	52
<b>Tabla 5:</b> Espectro de inhibición de las cepas productoras de sustancias tipo bacteriocinas.....	54
<b>Tabla 6:</b> Genotipificación y características de BAL seleccionadas.....	55
<b>Tabla 7:</b> Evaluación de la sensibilidad de las cepas luego de la exposición a diferentes temperaturas y tiempos.....	58
<b>FIGURAS</b>	<b>Página</b>
<b>Figura 1:</b> Separación y usos de la sangre obtenida en mataderos.....	12
<b>Figura 2:</b> Recuentos de poblaciones microbianas presentes en sangre aviar de dos mataderos.....	33
<b>Figura 3:</b> Caracterización fenotípica de BAL aisladas de sangre de matadero aviar	34
<b>Figura 4:</b> Amplificación del gen ribosomal 16S.....	35
<b>Figura 5:</b> Perfiles de ARDRA detectados en los aislamientos.....	37
<b>Figura 6:</b> Halos de inhibición producidos por los ELC.....	51
<b>Figura 7:</b> Detección de la producción de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	53
<b>Figura 8:</b> Curvas de crecimiento en MRS de las BAL seleccionadas.....	55
<b>Figura 9:</b> Fase de latencia de las cepas evaluadas.....	56
<b>Figura 10:</b> Densidad final de células bacterianas.....	57
<b>Figura 11:</b> Tiempo de duplicación de las cepas evaluadas.....	57
<b>Figura 12:</b> Tasa máxima de crecimiento de las cepas evaluadas.....	58
<b>Figura 13:</b> Desarrollo de <i>E. coli</i> SA en caldo BHI con aditivos.....	71

## Índice

<b>Figura 14:</b> Efecto de los aditivos sobre los parámetros de crecimiento de <i>E. coli</i> SA.....	72
<b>Figura 15:</b> Desarrollo de <i>P. aeruginosa</i> SA en caldo BHI con aditivos.....	73
<b>Figura 16:</b> Efecto de los aditivos sobre los parámetros de crecimiento de <i>P. aeruginosa</i> SA.....	74
<b>Figura 17:</b> Desarrollo de <i>S. aureus</i> SA en caldo BHI con aditivos.....	75
<b>Figura 18:</b> Efecto de los aditivos sobre los parámetros de crecimiento de <i>S. aureus</i> SA.....	76
<b>Figura 19:</b> Desarrollo de <i>Salmonella</i> spp. SA en caldo BHI con aditivos.....	77
<b>Figura 20:</b> Efecto de los aditivos sobre los parámetros de crecimiento de <i>Salmonella</i> spp. SA.....	78
<b>Figura 21:</b> Efecto de la combinación de aditivos seleccionados sobre los parámetros de crecimiento de las BAL versus los microorganismos A/P .....	80
<b>Figura 22:</b> Efecto de los aditivos seleccionados (lactosa 2%, extracto de levadura 0,4%, citrato de amonio 0,4% y NaCl 1%) sobre los parámetros de crecimiento de las BAL evaluadas.....	81
<b>Figura 23:</b> Recuentos del co-cultivo de las dos BAL seleccionadas para el SB...	94
<b>Figura 24:</b> Prueba 1, puesta a punto del SB con <i>Salmonella</i> spp SA.....	95
<b>Figura 25:</b> Efecto del SB en sangre estéril sobre <i>Salmonella</i> spp. SA y <i>E. coli</i> SA.	96
<b>Figura 26:</b> Efecto del SB en sangre estéril sobre <i>P. aeruginosa</i> SA y <i>S. aureus</i> SA.....	97
<b>Figura 27:</b> Desarrollo de las BAL del SB junto a las bacterias A/P .....	98
<b>Figura 28:</b> Evolución de las poblaciones microbianas en los diferentes tratamientos luego de la incubación a 30 °C durante 48 h.....	99
<b>Figura 29:</b> Evolución de los valores de pH en los diferentes tratamientos luego de la incubación a 30 °C durante 48 h.....	100
<b>Figura 30:</b> Evolución de los valores de hemólisis en los diferentes tratamientos luego de la incubación a 30 °C por 48 h.....	101

**LISTA DE ABREVIATURAS Y SIGLAS**

<b>Abs</b>	Absorbancia
<b>A/P</b>	Alterantes/patógenos
<b>ARDRA</b>	Amplified Ribosomal DNA-Restriction Analysis
<b>A<sub>w</sub></b>	Actividad de agua
<b>BAL</b>	Bacterias Ácido Lácticas
<b>BHI</b>	Brain Heart Infusion
<b>BLAST</b>	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
<b>CA</b>	Citrato de amonio
<b>NaCl</b>	Cloruro de sodio
<b>CO<sub>2</sub></b>	Dióxido de Carbono
<b>CTAB</b>	Bromuro de Cetiltrimetilamonio
<b>DNA</b>	Deoxyribonucleic Acid
<b>DO</b>	Densidad Óptica
<b>DSP</b>	Departamento de Salud Pública
<b>DSPV</b>	Departamento de Salud Pública Veterinaria
<b>ELC</b>	Extracto Libre de Células
<b>ELC N</b>	Extracto Libre de Células Neutralizado
<b>ELC SN</b>	Extracto Libre de Células Sin Neutralizar
<b>f</b>	Forward
<b>FCV</b>	Facultad de Ciencias Veterinarias
<b>g</b>	Gramos
<b>GRAS</b>	<i>Generally Recognized As Safe</i>
<b>h</b>	Horas
<b>H<sub>2</sub>O</b>	Agua
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peróxido de Hidrógeno
<b>HRP</b>	Peroxidasa de Rábano
<b>M</b>	Molar
<b>mg</b>	Miligramos

<b>Mg<sup>2+</sup></b>	Iones magnesio
<b>min</b>	Minutos
<b>ml</b>	Mililitros
<b>mm</b>	Milímetros
<b>mM</b>	Milimolar
<b>MRS</b>	De Man, Rogosa y Sharpe, Medio de cultivo
<b>Mumax</b>	Tasa máxima de crecimiento
<b>NaOH</b>	Hidróxido de sodio
<b>NCBI</b>	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
<b>nm</b>	Nanómetros
<b>Nmax</b>	Densidad final de células bacterianas
<b>°C</b>	Grados Centígrados
<b>pb</b>	Pares de Bases
<b>PCR</b>	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
<b>pH</b>	Potencial de Hidrógeno
<b>r</b>	Reverse
<b>rpm</b>	Revoluciones Por Minuto
<b>SA</b>	Sangre Aviar
<b>SI</b>	Sustancia Inhibitoria
<b>TBE</b>	Tris-Borate-EDTA
<b>t-d</b>	Tiempo en horas que demora el microorganismo para duplicarse
<b>t-lag</b>	Fase de latencia
<b>TMB</b>	3, 3', 5, 5' tetrametil benzidina
<b>U</b>	Unidad de enzima
<b>UFC</b>	Unidades Formadoras de Colonias
<b>UNL</b>	Universidad Nacional del Litoral
<b>V</b>	Voltios
<b>µl</b>	Microlitros
<b>µM</b>	Micro Molar
<b>16S ADNr</b>	Acido Desoxiribonucleico 16S Ribosomal

## **RESUMEN**

La recuperación y utilización de proteínas provenientes de sangre animal obtenida en mataderos, considerando todas las especies que son faenadas anualmente, significa un volumen importante el cual podría ser utilizado para paliar la grave deficiencia de proteínas que existe a nivel mundial. Asimismo, la utilización de este subproducto impactaría de manera positiva en el ambiente ya que se evitaría la contaminación provocada por la sangre vertida a los lechos de agua sin tratamiento previo. El objetivo de este trabajo fue desarrollar un sistema de biopreservación (SB) de sangre aviar obtenida en mataderos conformado por Bacterias Ácido Lácticas (BAL) y aditivos que permita extender su vida útil reduciendo de esta forma la necesidad de procesamiento inmediato. Se realizaron aislamientos de BAL desde sangre aviar obtenida en matadero y se realizó una selección de las mismas con base en la capacidad de inhibir bacterias alterantes/patógenas (A/P) presentes en la misma. Luego se evaluó la capacidad de las BAL seleccionadas de desarrollarse en sangre con diferentes aditivos. De esta forma, el SB quedó conformado por *E. faecalis* DSPV 008SA y *L. salivarius* DSPV 032SA más los aditivos (lactosa bacteriológica 2%, extracto de levadura 0,4%, citrato de amonio 0,4% y cloruro de sodio 1%). Luego de incubar sangre de matadero con el SB durante 24 h a 30°C, se observaron menores recuentos de las poblaciones microbianas indicadoras (enterobacterias totales, coliformes, *Pseudomonas* spp. y *S. aureus*) que en la sangre de matadero utilizada como control. El descenso de pH colaboró con el pobre desarrollo de los microorganismos A/P pero a su vez fue controlado para evitar la coagulación de las proteínas evitando así una dificultad en el procesamiento tecnológico. Además se observó que en la sangre inoculada con el SB, el proceso de hemólisis fue menor indicando una mejora en la calidad del producto tratado. Con base en estos resultados se concluye que la aplicación del SB en sangre aviar obtenida en matadero reduce la carga microbiana contaminante/alterante extendiendo la vida útil, evitando que el procesamiento de la misma sea inmediato manteniendo de forma adecuada las características tecnológicas más importantes (bajo nivel de hemólisis y acidez).

## ***ABSTRACT***

The recuperation and utilization of animal blood proteins is of utmost importance if we consider the amount of bovine, porcine y poultry that are slaughtered annually and the high levels of protein deficiencies in the world. The use of this subproduct would impact positively on environment because the untreated slaughterhouse blood would not be eliminated into municipal sewage systems or rivers. The objective of this study was to investigate the use of indigenous lactic acid bacteria (LAB) and additives as slaughterhouse blood biopreservative system (BS) against spoilage/pathogen microbiota. Also, BS impact in blood pH and blood hemolysis was investigated. The BS was integrated by two LAB (*E. faecalis* DSPV 008SA, *L. salivarius* DSPV 032SA) and four additives (bacteriological lactose 2%; yeast extract 0.4%; ammonium citrate 0.4%; sodium chloride 1%). After 24 h at 30°C, lower counts of enterobacterias, coliforms, *Pseudomonas* spp., and *S. aureus* were obtained in blood containing BS in comparison with the non-inoculated blood. An ability of LAB to prevent blood's hemolysis was observed. Decrease in blood pH impacted directly on the reduced development of spoilage microorganisms; however pH blood must be controlled with the aim to prevent proteins coagulation. On the basis of these results it seems worthwhile to supplement blood with BS to avoid undesirable changes during storage and during the time before it is processing. The application of biopreservation system to blood could reduce the microbiological load, extending its shelf life, and thus avoiding immediate processing after blood collection.



# **INTRODUCCIÓN**

## **1- Justificación**

Los productos obtenidos a partir de la sangre de matadero están siendo aprovechados por una gran variedad de mercados. El empleo de plasma y hemoglobina es variado dado que estos son concentrados de proteínas y cuentan con propiedades gelificantes, emulsificantes, de absorción de agua y formación de espumas además de gran solubilidad (Zamora Rodriguez, 2003). Otra característica importante de la sangre es su valor nutritivo ya que contiene todos los aminoácidos esenciales para la nutrición humana y animal (Tybor y col., 1975) siendo solo deficiente en isoleucina y metionina.

Sin embargo, la sangre siempre ha sido un grave problema para los mataderos ya que es uno de los residuos con mayor poder contaminante. Tradicionalmente recibe el tratamiento como un efluente más en la industria frigorífica a pesar de que tiene, a diferencia de muchos de ellos, una alta demanda biológica de oxígeno (Tritt y Schuchardt, 1992). Esto trae como consecuencia tratamientos muy costosos sin que ello elimine el efecto negativo sobre el ambiente. Esta elevada carga orgánica provoca la disminución del oxígeno en disolución en el agua y la muerte de los organismos que la habitan.

Si se tiene en cuenta que la producción aviar ha aumentado considerablemente en los últimos años en nuestro país es posible estimar la cantidad de sangre que se recolecta en los mataderos utilizando datos suministrados por el Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca de la Nación (2012). En el año 2012, la cantidad de aves faenadas fue de 734.646.000, siendo Buenos Aires y Entre Ríos las provincias que concentraron el 80% de la faena, seguidas por Santa Fe en el tercer puesto. Teniendo en cuenta que a la cantidad media de sangre recogida por animal faenado de 2 kg promedio es de 0,2 litros (Ockerman y Hansen, 1994), podríamos estimar que la cantidad de sangre recolectada en los mataderos de pollos en el año 2012 fue de aproximadamente 147 millones de litros. Esta cantidad de sangre puede dimensionarse si consideramos que dicho volumen representa cerca de 60 piletas olímpicas de natación y, si además tenemos en cuenta que esto significa 26.500 toneladas de proteínas que podrían aprovecharse, el problema cobra mayor relevancia.

## **Introducción**

El inconveniente principal de la sangre obtenida en mataderos es la calidad microbiológica. En muchos países la sangre animal de matadero es colectada usando sistemas abiertos de recolección, lo que genera una carga bacteriana inicial de  $10^6$  UFC/ml (Carretero y Parés, 2000). La contaminación de la sangre se debe a la presencia de grupos bacterianos aerobios provenientes del estómago e intestino del animal faenado (Ockerman y Hansen, 1994), situación que se reduce cuando el proceso se realiza en condiciones estrictamente higiénicas y con sistemas cerrados de recolección.

Una posibilidad de controlar o reducir la microbiota alterante/patógena de la sangre puede ser mediante cultivos biopreservadores. La biopreservación se define como la extensión de la vida útil e incremento de la seguridad de los alimentos utilizando su microbiota natural o sus metabolitos (Aymerich y Hugas, 1998). En este sentido, las bacterias ácido lácticas (BAL) son las candidatas ideales a utilizar como cultivos biopreservadores. Por lo tanto, la biopreservación con BAL es un método biotecnológico que promete tener un alto impacto en diferentes áreas de la industria alimentaria (Ross y col., 2002).

Por lo tanto, un uso adecuado de la sangre aviar obtenida en mataderos considerada como un desecho de la producción de carne, no solamente redundaría en beneficio de la producción pecuaria ya que se utilizaría como fuente proteica, sino que también contribuiría a una mejor protección del ambiente, al evitar que sea vertido a los arroyos y ríos sin ninguna consideración sanitaria previa o, en dado caso, aumentando considerablemente los costos de los establecimientos para tratar sus efluentes en forma eficiente.

## **2- Antecedentes bibliográficos**

### **A- Aprovechamiento de subproductos de la industria cárnica avícola**

La generación de subproductos y la transformación de residuos provenientes de las industrias alimentarias se consideran parte de la cadena de producción. En la industria cárnica, la naturaleza y cantidad de estos materiales varían con la etapa de producción. Así,

## **Introducción**

los productos derivados de la faena de animales para carne pueden dividirse en 4 categorías: 1) la carne propiamente dicha (producto de alto valor), 2) componentes que pueden ser utilizados por otras industrias (cueros, huesos, garras y sangre), 3) componentes de bajo valor (harina de carne, menudencias), 4) componentes no utilizados y eliminados como residuos (contenido del tracto digestivo, efluentes) (Fallows and Verner Wheelock, 1982).

En este sentido, las empresas encargadas de procesar las aves de corral poseen diferentes tecnologías que le permiten utilizar el animal en su totalidad. Así, tanto las plumas como las vísceras son transformadas en harina para su reincorporación a la cadena como subproducto proteico en alimentos para animales. Por otro lado, las crestas y garras son considerados subproductos comestibles los cuales son importados en un 88% por China, Hong Kong y Sudáfrica (SAGPyA, 2010).

Respecto a la sangre obtenida del degüello de los animales, antiguamente era desechada conjuntamente con los demás efluentes (Halliday, 1973) y otras veces era eliminada sin tratamiento previo generando efectos negativos sobre la ecología de los lechos de agua debido a su alta DBO. Con el advenimiento de nuevos procesos y controles, la sangre comenzó a ser procesada como un efluente independiente para su posterior eliminación lo que generó un nuevo costo para la industria faenadora (Liu, 2002).

Actualmente y como se ha mencionado previamente, la sangre de los mataderos debido a su alto contenido de proteínas de alto valor biológico, comenzó a ser aprovechada por determinadas industrias para la elaboración de diferentes productos y de esta forma dejó de ser considerada un residuo para transformarse en un subproducto altamente revalorizable (Ofori y Hieh, 2012).

### **B- Productos obtenidos a partir del procesamiento de la sangre y derivados**

Actualmente, la sangre de mataderos no solo se utiliza para la fertilización de cultivos y nutrición animal sino que también ha sido empleada en otros productos

**Introducción**

relacionados a la industria de los alimentos humanos. Estudios previos (Tabla 1) han demostrado que la sangre y sus subproductos tienen la capacidad de mejorar las propiedades tecnológicas durante la elaboración de diferentes productos destinados al consumo humano.

*Tabla 1: Ejemplos del empleo de sangre animal en alimentos para humanos*

<b>Fración de sangre</b>	<b>Función</b>	<b>Alimentos donde se utiliza</b>	<b>Referencia</b>
Sangre entera animal	Fuente de proteína	Morcilla española	Santos y col. 2003
Hemoglobina bovina	Fuente de hierro	Galletitas	Walter y col. 2003
Plasma y globina bovina	Sustituto de grasa	Paté de jamón	Viana y col. 2005
Plasma animal	Sustituto de grasa	Salame Bologna (fermentado)	Cofrades y col 2000
Transglutaminasa, fibrinogeno y trombina porcina	Aglutinante	Reestructuración de productos cárnicos	Tseng y col. 2006
Plasma Porcino	Inhibidor de proteasas	Surimi	Visessanguam y col 2000
Plasma de pollos	Inhibidor de proteasas	Surimi	Rawdkuen y col. 2004
Plasma Bovino	Sustituto de clara de huevo	Tortas	Myhara and Kruger 1998

*Fuente: Bah y col., 2013.*

Además de la utilización de este subproducto como fuente proteica y por la capacidad de estabilizar-emulsificar, etc., también es utilizada, principalmente la fracción sérica, para estimular el sistema inmune de los animales y humanos. Existe en el mercado un producto concentrado de suero (Immunolin<sup>®</sup>) proveniente de plasma de bovino el cual contiene inmunoglobulinas, transferrina, factor de crecimiento mitogénico y citokinas inmunomoduladoras. Este producto es añadido a barras de cereales o bebidas generando un alimento con alto valor agregado (Bah y col., 2013).

Otros productos comercializados y de interés para dimensionar el uso de la sangre son el Harimix P<sup>®</sup> y Prolican 70<sup>®</sup>. El primero consiste en hemoglobina y es utilizado como colorante natural para los productos cárnicos. Prolican 70<sup>®</sup> es un producto formulado con sangre entera deshidratada la cual es utilizada como emulsificante y gelificante para su incorporación en alimentos (Bah y col., 2013).

Además de las aplicaciones en alimentación humana y animal, la sangre obtenida en mataderos puede ser utilizada en otras áreas. Por ejemplo, sangre entera proveniente de

## **Introducción**

bovinos, cerdos y pollos se incorporan a los alimentos para mascotas como fuente de proteína económica. Por otro lado y en otra escala, se pueden utilizar compuestos con alto valor médico como trombina y plasmina recuperados directamente de sangre animal (Bah y col., 2013).

Pierce y col. (2005), evaluaron los efectos producidos tras la incorporación de plasma bovino y de cerdo incorporado a la dieta de lechones de 14 a 21 días de edad. Los resultados indicaron que el consumo de estos productos benefició la performance de los lechones durante la primera semana post-destete y este efecto se lo atribuyeron a la fracción Ig G del plasma la cual impactó directamente sobre el crecimiento y el consumo de alimentos.

Además de estos ejemplos de utilización de sangre y derivados, los cuales llevan varios años empleándose, actualmente existe un área nueva de investigación que es la obtención de péptidos bioactivos a partir de sangre obtenida en matadero (Wanasundara y col., 2002; Nedjar-Arroume y col., 2008; Wei y Chiang, 2009; Toldrá y col., 2012). Los resultados de estos trabajos indican que la sangre obtenida en mataderos es fuente de numerosas sustancias como: péptido inhibidor de la enzima convertidora de la angiotensina (IECA), péptidos con actividad antioxidante, con propiedades antimicrobianas y algunas con actividades similares a los opiáceos.

Todas estas aplicaciones de la sangre obtenida desde mataderos de animales indican que existen diferentes alternativas para su procesamiento, generando diferentes productos nutricionales y constituyéndose en una fuente de ingresos económicos para el sector cárnico promoviendo a su vez el cuidado del ambiente.

### **C- Recolección y separación de la sangre de matadero.**

Una vez degollados los animales durante la faena, la sangre debe ser recolectada para su posterior procesamiento. Para ello existen dos metodologías diferentes, la más utilizada es mediante un sistema de recolección abierto donde la sangre cae directamente en recipientes destinados para tal fin. Dado que no se toman grandes precauciones para su

## **Introducción**

extracción, no es un producto de alto valor. Normalmente presenta sustancias extrañas y, además, evidencia un alto grado de contaminación microbiológica (Zamora Rodríguez, 2003).

El otro método de recolección es un sistema cerrado que consta de un cuchillo o cánula hueca que se introduce en el animal y que va conectado a través de un conducto flexible de plástico a un tanque y a una bomba de vacío que succiona la sangre. Ésta se extrae directamente del torrente sanguíneo, la cual es transportada mediante conductos cerrados a hasta un recipiente diseñado para su conservación. Esto reduce la contaminación física y biológica, permitiendo la obtención de productos de un valor añadido superior (Rodríguez, 1994). Esta sangre presenta características adecuadas para ser utilizada por la industria alimentaria destinada principalmente al consumo humano. Sin embargo, esta técnica insume mayores costos y disminuye considerablemente la velocidad de la línea de matanza provocando que el matadero deba faenar menos animales diariamente (Wismer-Pedersen, 1988).

Por otro lado, la sangre constituye entre el 3 al 5% del peso vivo del animal (Halliday, 1973). Es un fluido rojo conformado por agua, células, enzimas, proteínas que puede ser separado en dos partes, la fracción celular y el plasma. El segmento celular corresponde al 30-40% del peso húmedo de la sangre disuelto en la fracción líquida que representa el plasma.

Las células más importantes comprendidas en la fracción roja o celular son los eritrocitos, leucocitos y plaquetas. La hemoglobina también forma parte de esta fracción y se encuentra constituida por cuatro globinas, las cuales poseen cada una un grupo hemo conteniendo hierro (Wismer-Pedersen, 1988). Éste es capaz de unirse a una molécula de oxígeno y de esta forma participar en el transporte del mismo por el organismo del animal vivo.

Por su parte, el plasma contiene de 6 a 8% de proteínas las cuales consisten en albumina, globulinas, fibrinógeno y otras proteínas pequeñas. Esta fracción es la de mayor valor económico ya que es utilizada en la mayoría de los productos mencionados previamente. El suero sanguíneo, si bien es similar al plasma, es cualitativamente diferente

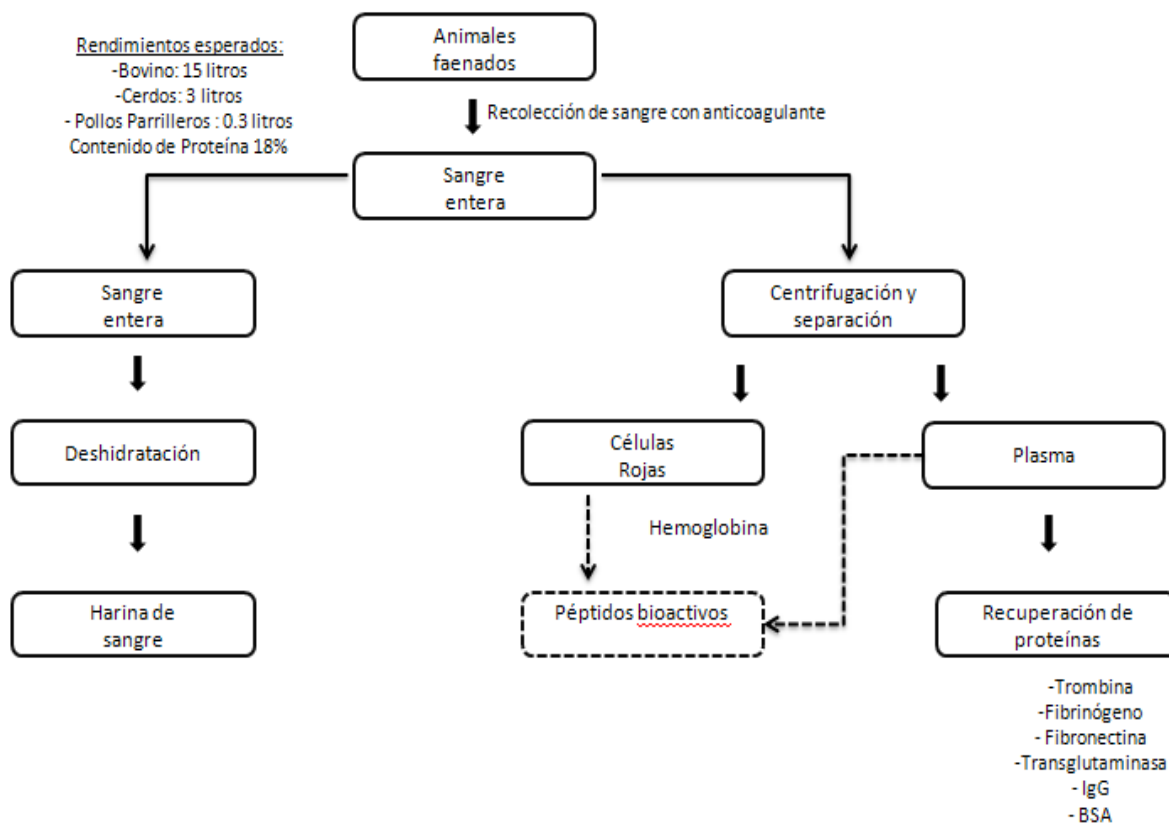
## Introducción

ya que no cuenta con el fibrinógeno que es el que participa en la formación del coagulo y además lleva consigo otras proteínas (Lundblad, 2005).

Con el objeto de obtener estas fracciones por separado existen dos mecanismos. El primero es la capacidad propia y natural que tiene este fluido para coagular, permitiendo el exudado del suero. La otra metodología, utilizada frecuentemente por la industria, es el agregado de una sustancia anticoagulante lo que permite, posterior a un proceso de centrifugación, dividir a este producto en la fracción roja y el plasma (Bah y col., 2013).

Esta separación de las fracciones permite la utilización de las mismas en la elaboración de los productos mencionados en el apartado previo (Tabla 1). Asimismo, la sangre puede ser utilizada como producto íntegro mediante la desecación e incorporación a alimentos para mascotas. La principal ventaja de la utilización de este producto entero es el aprovechamiento de los grupos hemo los cuales poseen altas cantidades de hierro.

*Figura 1 Separación y usos de la sangre obtenida en mataderos*



*Fuente: Bah y col., 2013.*



## **Introducción**

Si bien no hay datos a nivel mundial de la faena de pollos de engorde, FAOSTAT (2012) menciona que si solo tenemos en cuenta los bovinos y porcinos faenados, el volumen obtenido de sangre en el año 2010 fue de 4,56 billones de litros, lo que indica que este subproducto es una fuente con potencialidad de desarrollo a futuro.

Asimismo, los mataderos de bovinos generan un volumen diario mayor de sangre que el de otras especies, aunque existen limitaciones para el uso de la misma en países con presencia de casos de Encefalopatía Espongiforme Bovina (EEB) (Ofori y Hieh, 2012). Esta enfermedad puede ser vehiculizada mediante la sangre de los bovinos por lo cual las otras especies como el cerdo, el equino y las aves tienen ventaja por encima de esta. Además, y reforzando lo anterior, la Agencia Federal de Drogas y Medicamentos de los Estados Unidos de América (FDA por sus siglas en inglés) manifiesta que el riesgo de transmisión de esta enfermedad a través de estas especies es mínimo lo que revaloriza a las empresas que procesan animales no rumiantes (Ofori y Hieh, 2012).

Por otro lado, la sangre obtenida en mataderos tiene un alto contenido de sólidos (18%) con una alta demanda de oxígeno ( $DBO = 500.000 \text{ mg O}_2/\text{L}$ ) lo que afecta de manera directa al ambiente si es eliminado sin tratamiento previo (Del Hoyo y col., 2007). En este sentido, previamente la sangre era utilizada como fertilizante esparcida sobre los cultivos o eliminada directamente a los cursos de agua, práctica que hoy se encuentra prohibida debido a su alto poder contaminante (Nowak y Von Mueffling, 2006). Por esto actualmente, las empresas faenadoras poseen dos opciones: 1) utilizan metodologías para eliminarla de manera tal que no afecte la ecología del ambiente (esto impacta en los costos de la empresa, ya que insume la puesta a punto de nuevos procesos recayendo directamente en un mayor precio de los productos cárnicos) (Liu, 2002); 2) la conservan para luego venderla a la industria procesadora la cual la transformará en productos a incorporar en la industria agroalimentaria.

### **D- Sistemas de conservación de la sangre en los mataderos.**

La conservación de la sangre es un proceso muy dificultoso ya que la misma posee muchos nutrientes disponibles para el desarrollo microbiano. Si bien se conoce que la sangre en el animal sano vivo es estéril (Dávila, 2007), una vez faenado y degollado la

## Introducción

sangre cae en recipientes los cuales suelen estar abiertos y expuestos al ambiente de los frigoríficos.

Los niveles de contaminación microbiana encontrados en diferentes sitios de un matadero señalan que la piel del animal, el piso y el contenido intestinal poseen altas poblaciones microbianas y son las principales fuentes de contaminación de la sangre (Parés y Carretero, 1997). Dentro de estos, el intestino del animal es la fuente que aporta la mayor proporción de microorganismos contaminantes de la sangre los cuales algunos solo pueden provocar la alteración del producto y otros además resultar patógenos. Entre los microorganismos que normalmente se pueden encontrar en la sangre recolectada en sistemas abiertos se mencionan: *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas* spp. y *Bacillus* spp. (Ribot, 2006).

Existen pocos datos que indiquen las concentraciones bacterianas en los mataderos de animales. Estudios previos donde caracterizaron microbiológicamente sangre porcina de seis mataderos industriales (Parés, 1995; Carretero y Parés, 2000) observaron que los recuentos de bacterias aerobias mesófilas oscilaron entre  $10^5$  y  $10^6$  UFC/ml. El recuento de estos microorganismos suele ser utilizado como indicador de carga microbiana general y nos orienta sobre la longevidad, la seguridad potencial y las condiciones higiénicas de obtención.

Por otro lado, investigaciones realizadas sobre sangre aviar obtenida en mataderos (Bonansea, 2010) detectaron valores de entre 6 a 9 logaritmos de UFC/ml de microorganismos mesófilos en dos empresas diferentes. Así, la población de enterobacterias entre estas dos industrias también osciló entre 5 y 8 unidades logarítmicas de UFC/ml y la de coliformes entre 4 y 7 logaritmos de UFC/ml (Bonansea, 2010). Estos datos sugieren que la microbiota presente en este subproducto es muy compleja y se encuentra estrechamente relacionada con las medidas de manejo durante la faena de los animales.

En este sentido, existen varias técnicas capaces de reducir la carga microbiana para controlar el deterioro de la sangre provocado por la contaminación, entre ellas la microfiltración (con pasteurización o sin ella), la bactofugación y el tratamiento con alta presión, como alternativa a los tratamientos térmicos convencionales, los cuales no podrían

## **Introducción**

utilizarse sin afectar negativamente las propiedades funcionales del producto (Zamora Rodríguez, 2003). Si bien es cierto que estos sistemas podrían ser muy eficientes desde el punto de vista de calidad microbiológica, su instalación en la línea de sacrificio en los mataderos produciría muchas dificultades técnicas e impactaría en los costos del producto final.

Por otro lado, la sangre puede ser almacenada por un periodo de 4 a 6 días cuando es refrigerada entre 0 y 2 °C (Zamora Rodríguez, 2003). En el caso de pretender conservar las fracciones sanguíneas por períodos más prolongados a los descritos anteriormente es preciso aplicar otras tecnologías como la deshidratación o la congelación. El inconveniente que presentan estos sistemas actualmente en uso es el elevado costo de la instalación, mantenimiento y funcionamiento de los equipos de frío y deshidratación (Liu, 2002).

Otra forma de conservación es el agregado de aditivos tales como ácido láctico o citrato que actúan como inhibidores de la flora alterante/patógena o agentes antifúngicos como el ácido sórbico o el propiónico (Ockerman y Hansen, 1994). En la actualidad, se han identificado serios problemas relacionados directamente con las limitadas formas de conservación de los alimentos frescos, sumado al hecho de la continua exigencia de disminuir y prohibir cada vez más el uso de preservantes y aditivos químicos en los alimentos, debido a los efectos adversos que pueden causar en la salud del consumidor (Alzamora y col., 1998). Lo anterior obliga a la búsqueda de metodologías alternativas para conservar los alimentos. En este sentido se han desarrollado procedimientos complementarios de conservación, que consiguen aumentar la vida útil y garantizar la calidad sanitaria, entre ellos la biopreservación.

### **E- Biopreservación de sangre obtenida en mataderos.**

La biopreservación es un método de conservación que permite extender la vida útil y aumentar la seguridad de los alimentos por medio del uso de la microbiota natural o añadida y de sus productos antimicrobianos (Schnürer y Magnusson, 2005). Es decir, aprovechando la capacidad de los microorganismos autóctonos para inhibir o reducir el crecimiento y actividad potencial de bacterias deteriorantes o patógenos (Zamora Rodríguez, 2003).

## Introducción

El uso empírico de los microorganismos y/o sus productos naturales en la conservación de los alimentos ha sido una práctica común en la historia de la humanidad (Ross y col., 2002). Un cultivo biopreservador ha sido definido como un cultivo bacteriano capaz de aumentar la seguridad microbiológica de los alimentos (Zamora Rodríguez, 2003). En este sentido, las BAL son comúnmente utilizadas como tales. Asimismo, este grupo de microorganismos son consideradas “seguros” o GRAS (por sus siglas en inglés, reconocidas generalmente como seguras) por la FDA de EE.UU.

Las BAL han sido utilizadas en la elaboración de alimentos fermentados con el objetivo de proporcionar sabor, color y aroma característicos durante la fermentación (Botina y col., 2008). Además, se reconoce que poseen un efecto benéfico en el consumidor si son utilizadas como microorganismos probióticos. En este sentido, algunas bacterias lácticas han estado relacionadas con acciones anticancerígenas y con la regulación del tránsito intestinal (Gilliland, 1990).

Por lo general, las BAL son bacterias mesófilas, pero también son capaces de crecer a temperaturas que van desde 5 a 45 °C y además pueden tolerar ambientes ácidos y alcalinos (Wood y Holzapfel, 1996). Las BAL son débilmente proteolíticas y lipolíticas, y requieren la presencia de aminoácidos libres, bases nitrogenadas y vitaminas para su normal crecimiento (Jay, 1996).

Schillinger y Lücke (1987) propusieron una división de las BAL en tres grupos de acuerdo con sus características fermentativas: a) las homofermentativas estrictas, b) heterofermentativas estrictas y c) las heterofermentativas facultativas. Las BAL homofermentativas estrictas degradan las hexosas exclusivamente a ácido láctico y no fermentan las pentosas o el gluconato. Las heterofermentativas estrictas degradan las hexosas a ácido láctico, ácido acético, etanol y CO<sub>2</sub> y las pentosas a ácido láctico y ácido acético. Las facultativas heterofermentativas fermentan las hexosas a ácido láctico y pueden producir CO<sub>2</sub> a partir del gluconato, pero no de la glucosa. Éstas también fermentan las pentosas para producir ácido láctico y acético (Cabeza Herrera, 2006).

Por otro lado, el principal efecto antimicrobiano ejercido por las BAL se debe a la producción de ácido láctico con la consiguiente reducción del pH. Otros ejemplos de metabolitos secundarios producidos por BAL que poseen actividad antagonista incluyen

## Introducción

compuestos como la reuterina (Axelsson y col., 1989) y el antibiótico reuteriicina (Ganzle y col., 2000; Holtzel y col., 2000), ambos producidos por cepas de *Lactobacillus reuteri*. Además, las BAL producen otros componentes antimicrobianos tales como peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), diacetilo y bacteriocinas. Cada una de ellas puede antagonizar el crecimiento de algunas bacterias patógenas y deteriorantes de los alimentos (Ammor y col., 2006).

Como se mencionó anteriormente, algunas BAL tienen la propiedad de sintetizar sustancias antimicrobianas como parte de un mecanismo de defensa y de competencia ante otros microorganismos. Estas sustancias, conocidas como bacteriocinas, han despertado el interés de muchos investigadores debido a su carácter de antimicrobiano natural, con potencial aplicación para el control de microorganismos A/P presentes en alimentos. Sumado a esto, el origen proteico de las mismas representa una ventaja adicional, ya que durante el paso por el tracto digestivo son inactivadas por las proteasas presentes en el estómago, evitando así problemas de resistencia o inhibición de la microbiota normal del tracto gastrointestinal (Schneider, 2005).

Por lo tanto, las BAL mediante sus diferentes mecanismos de inhibición podrían ser utilizadas como biopreservadoras de sangre obtenida en matadero. No obstante, se conoce que este producto es una fuente económica de sustancias nitrogenadas pero carente de azúcares simples por lo que algunos microorganismos pueden ver afectado su desarrollo. Sin embargo, muchos grupos bacterianos, especialmente los A/P, son capaces de utilizar las sustancias presentes en la sangre afectando las características intrínsecas del producto.

En este sentido, se han desarrollado investigaciones donde el agregado de diferentes sustancias a la sangre mejoraron el desarrollo de BAL. Hyun y Shin (1998) evaluaron el desarrollo de *Lactobacillus* sp. en un medio basado en proteínas plasmáticas de sangre bovina suplementado con glucosa y trazas de minerales no detectando diferencias en el desarrollo de biomasa comparando el crecimiento en este medio y el medio de cultivo MRS (medio selectivo para BAL).

Por otro lado y si bien este grupo microbiano es considerado GRAS (reconocidas como seguras) y utilizado en innumerables alimentos, existen trabajos donde se demuestra que algunas especies pueden actuar como patógenos oportunistas. Por ejemplo, algunos

## Introducción

lactobacilos han sido asociados a casos aislados de infecciones causando bacteriemia y endocarditis en humanos, pero también a casos de infecciones localizadas (Vesterlund y col., 2007). Kołozyn-Krajewska y col. (2011) estudiaron los riesgos involucrados en el consumo de alimentos cárnicos con probióticos concluyendo que los factores de riesgo del consumidor parecen jugar un papel clave en el establecimiento de una infección por BAL, por lo que el contacto de las personas en riesgo con estas bacterias debe ser minimizado.

Otro género involucrado en infecciones en humanos es el *Enterococcus*. En las últimas décadas se ha incrementado la incidencia en las infecciones nosocomiales provocadas por este grupo así como el aumento en la resistencia a los antibióticos adquirida por estas bacterias (Kayser, 2003). Asimismo, estudios recientes indican que las cepas de enterococos portadoras de caracteres de virulencia forman un grupo genómico diferente de la mayoría de las cepas aisladas de alimentos (Abriouel y col., 2008; Vancanneyt y col., 2002)

Por otro lado, los enterococos son utilizados comúnmente en la industria de los alimentos. Las especies de este género se aíslan con frecuencia a partir de alimentos, incluyendo gran parte de aquellos elaborados mediante métodos tradicionales de fermentación (Giraffa, 2002; Foulquié-Moreno y col., 2006). Estos juegan un papel importante contribuyendo al desarrollo de las propiedades organolépticas durante los procesos de maduración de muchos alimentos. También los enterococos son microorganismos de interés debido a su reconocida capacidad de producir diferentes tipos de bacteriocinas (Franz y col., 2007).

Si bien algunas BAL pueden ser potencialmente patógenas, como se mencionó anteriormente, los efectos y propiedades de las mismas para biopreservar alimentos son invaluable. De esta forma una posible estrategia que permita asegurar que la sangre pueda conservar sus propiedades pero sin representar un riesgo para la salud tanto animal como humana, es seleccionar BAL que sean termosensibles ya que el procesamiento final de la sangre en la industria procesadora es la deshidratación mediante secado por spray. Si bien las BAL son capaces de tolerar temperaturas entre 50-55°C (Gouesbet y col., 2001; Christiansen y col., 2006) la tolerancia térmica está directamente relacionada a la cepa (Simpson y col., 2000).

## **Introducción**

Otra cuestión a tener en cuenta en la selección de los microorganismos a utilizar en la preservación de los alimentos es la detección de bacterias dominantes en la sangre obtenida en mataderos. Elegir las especies predominantes en el sustrato en el que luego pretende aplicarse el cultivo, indica que la misma tiene una capacidad de desarrollo que la beneficia frente al resto de las bacterias relacionadas. Asimismo, es importante el estudio de cepas de la misma especie o de especies estrechamente relacionadas ya que está comprobado que las capacidades probióticas, tecnológicas y viabilidad en el sustrato son dependientes de cepa (Higginbotham y col., 1998; Erkkilä y Petäjä, 2000; Toldrá y Reig, 2011).

## **OBJETIVOS**



Objetivo general:

Desarrollar un sistema de biopreservación (SB) para sangre aviar obtenida en mataderos que evite las reacciones indeseadas provocadas por la microbiota autóctona alterante. Esto favorecerá la conservación de la sangre durante las primeras horas posteriores a la recolección permitiendo estandarizar el proceso de fermentación microbiana.

Objetivos específicos:

1- Estudiar la microbiota presente en sangre aviar obtenida en mataderos

- a) Estimar la concentración bacteriana de las diferentes poblaciones microbianas presentes en sangre obtenida en diferentes mataderos aviares.
- b) Aislar y caracterizar BAL mediante pruebas fenotípicas y genotípicas.
- c) Aislar e identificar genotípicamente bacterias A/P.

2- Seleccionar BAL para conformar el SB de sangre aviar obtenida en mataderos.

- a) Evaluar la capacidad antagonista de las BAL frente a microorganismos indicadores de colección y bacterias A/P autóctonas.
- b) Estudiar la cinética de crecimiento de las BAL seleccionadas en caldo MRS.
- c) Estimar la termosensibilidad de las BAL seleccionadas.
- d) Identificar las BAL seleccionadas mediante técnicas moleculares.

3- Seleccionar aditivos para incluir al SB y evaluar el efecto de los mismos frente a las BAL seleccionadas y a los microorganismos A/P autóctonos.

- a) Determinar el efecto de diferentes concentraciones de aditivos inhibidores frente las bacterias A/P autóctonas.
- b) Estudiar el efecto de los aditivos y concentraciones seleccionadas previamente sobre las BAL y la población alterante/patógena.

4- Investigar la actividad antagonista del SB en sangre.

- a) Evaluar el impacto individual del SB inoculado en sangre estéril sobre cada una de las bacterias A/P.
- b) Estudiar el efecto del SB sobre las diferentes poblaciones presentes en sangre aviar obtenida en matadero.

**Organización de la presente tesis doctoral:**

Con el objeto de lograr una mejor comprensión de este trabajo se procedió a dividir los ensayos experimentales en cuatro capítulos. Estos contienen los materiales y métodos utilizados para lograr cada uno de los objetivos planteados, además de los resultados de mayor relevancia, la discusión de los mismos y conclusiones parciales. Por último, se incluye una discusión general y conclusión final del trabajo.

Todos los ensayos fueron realizados en el Laboratorio de Análisis de Alimentos del Departamento de Salud Pública de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional del Litoral (DSP-FCV, UNL)

# **CAPÍTULO I**

***Objetivo específico a alcanzar:***

- 1- Estudiar la microbiota presente en sangre aviar obtenida en mataderos
  - a) Estimar la concentración bacteriana de las diferentes poblaciones microbianas presentes en sangre obtenida en diferentes mataderos aviares.
  - b) Aislar y caracterizar BAL mediante pruebas fenotípicas y genotípicas.
  - c) Aislar e identificar genotípicamente bacterias A/P.

En esta primera parte del trabajo experimental se realizó una evaluación de las características microbiológicas de la sangre aviar obtenida en mataderos. Esto permitió conocer las poblaciones microbianas presentes en la sangre de los frigoríficos de la zona, así como la concentración de los grupos bacterianos a los cuales el SB deberá enfrentar.

Además, en esta sección se incluye la caracterización de las BAL mediante pruebas fenotípicas las cuales fueron planteadas estratégicamente con base en características relacionadas a la aplicación tecnológica del SB. Asimismo, se utilizó una técnica de biología molecular para investigar las especies de BAL presentes en sangre obtenida en mataderos con el objeto de estimar la diversidad microbiana.

Por último, las muestras obtenidas en los mataderos fueron utilizadas para realizar los aislamientos de las bacterias A/P de sangre aviar obtenida en mataderos.

**CAPÍTULO I*****Materiales y métodos******1. a) Toma de muestras y evaluación de las principales poblaciones bacterianas presentes en sangre aviar de matadero***

Con el objeto de conocer la diversidad microbiana presente en sangre aviar de matadero, se analizaron microbiológicamente 10 muestras de sangre aviar obtenidas de dos mataderos-frigorífico, 6 fueron tomadas en el frigorífico A y 4 en el matadero B. Ambos establecimientos contaban con un sistema abierto de recolección de sangre.

El establecimiento A se encontraba en la provincia de Santa Fe con una faena de 20.000 animales diariamente proveniente de 11 granjas de la zona. El matadero B se ubicaba en la provincia de Entre Ríos y el número de animales faenados a diario era de aproximadamente 200.000.

Las muestras fueron recolectadas desde marzo a octubre de 2010 en recipientes estériles desde el tanque de almacenamiento de sangre del frigorífico ubicado separado de la línea de faena. Las mismas fueron trasladadas refrigeradas hasta el Laboratorio de Análisis de Alimentos (DSP-FCV) con el agregado de anticoagulante 1% v/v (citrato sódico). El volumen total recolectado fue de 100 ml, los cuales fueron utilizados para preparar diluciones en Ringer  $\frac{1}{4}$  para luego realizar los recuentos (UFC/ml) de las siguientes poblaciones bacterianas:

*- Microorganismos mesófilos:*

Para determinar el número de mesófilos totales en las muestras se utilizó Agar para el Recuento en Placa (Britania<sup>®</sup>). El medio fue preparado como indica el fabricante y reservado en baño termostático a 50 °C hasta su utilización. Las diluciones fueron sembradas por triplicado (1ml en profundidad). La incubación se realizó en aerobiosis a 37 °C durante 48 h.

*- Enterobacterias totales y coliformes*

## CAPÍTULO I

### Materiales y métodos

El recuento de estas poblaciones se realizó utilizando Agar Violeta Rojo Bilis Glucosa (VRBG, Britania<sup>®</sup>) para las enterobacterias totales y Agar Violeta Rojo Bilis (VRB, Britania<sup>®</sup>) para las bacterias coliformes. Las diluciones de las muestras en Ringer ¼ fueron sembradas por triplicado (1 ml en profundidad). La incubación se realizó en aerobiosis a 37 °C durante 24 h para VRBG y 24 h a 42 °C para VRB.

#### *- Mohos y levaduras*

La población fúngica fue evaluada utilizando el medio Hongos y Levaduras (HyL, Britania<sup>®</sup>). Las diluciones fueron sembradas de igual manera que las poblaciones anteriores e incubadas durante 3 a 5 días a 22 °C.

#### *- Bacterias ácido lácticas*

Se utilizaron dos medios para el evaluar las BAL, caldo MRS (MRS, Britania<sup>®</sup>) y agar Lambav. Al primer medio de cultivo se le agregó 1,5 % de Agar-agar (Britania<sup>®</sup>) para solidificarlo. El agar Lamvab (Hartemink y col., 1997) fue preparado de la siguiente manera (volumen total: 350 ml):

#### *- Paso 1, Solución A:*

Se pesaron 17,9 g de caldo MRS en erlenmeyer de 250 ml, se le agregó 0,00875 g de Verde de Bromocresol (Anedra<sup>®</sup>) y 0,0875 g de Clorhidrato de Cisteína (Anedra<sup>®</sup>). Los componentes se disolvieron en 175 ml de agua destilada calentando lentamente. Luego se enfrió para ajustar el pH a 5 con ácido ortofosfórico (Cicarrelli<sup>®</sup>) y se esterilizó en autoclave durante 15 min a 121 °C. Se reservó en baño termostático a 50 °C hasta su utilización.

#### *- Paso 2, Solución B:*

En un erlenmeyer de 500 ml se pesaron 7 g de Agar-agar (Britania<sup>®</sup>) los que fueron colocados en 175 ml de agua destilada calentándose lentamente hasta disolución completa. Posteriormente fue esterilizado en autoclave durante 15 min a 121 °C y luego reservado en baño termostático a 50 °C.

-

## CAPÍTULO I

### Materiales y métodos

- Paso 3:

Se agregaron 7 mg de Clorhidrato de Vancomicina (50 mg/ml, Richet<sup>®</sup>) a la solución A y luego se mezcló con la solución B a 50 °C en el recipiente del agar. Se homogeneizó lentamente y 15 ml de medio se dispensaron en placas de petri estériles.

La siembra de ambos medios (MRS y Lamvab) se realizó por triplicado colocando 100 µl de las diluciones en la superficie de los mismos. La distribución homogénea de la muestra se realizó con espátula de Drigalsky. La incubación se realizó 72 h a 37 °C en anaerobiosis.

Luego de la incubación de los medios de las distintas poblaciones, se procedió al recuento en aquellas placas en donde el crecimiento osciló entre 30 y 300 colonias. Los valores de las distintas poblaciones bacterianas fueron utilizados para comparar los recuentos entre frigoríficos. Para ello se utilizó un análisis de T de student, mediante el software estadístico InfoStat<sup>®</sup> (Universidad Nacional de Córdoba).

#### ***1. b) Aislamiento y caracterización mediante pruebas fenotípicas/genotípicas de BAL presentes en sangre aviar obtenida en mataderos.***

##### ***1. b) 1- Aislamiento y caracterización fenotípica de las BAL***

Las BAL fueron aisladas a partir de los medios de cultivo descriptos en el apartado anterior (agar MRS y agar Lamvab). Se utilizaron las 10 muestras obtenidas para los recuentos.

Los aislamientos se realizaron a partir de las placas seleccionando aquellas colonias que presentaban morfologías diferentes. Cada colonia fue repicada en caldo MRS e incubada 24 h a 37 °C en aerobiosis. Posteriormente los caldos fueron sembrados en placas de agar MRS por agotamiento e incubadas 72 h a 37 °C en anaerobiosis. Parte de este cultivo fue utilizado para determinar si las bacterias aisladas pertenecían a la familia de las BAL. Para ello se realizaron dos pruebas: tinción de Gram y catalasa. Esta última, se realizó en portaobjetos colocando una gota de suspensión bacteriana sobre una alícuota de agua oxigenada al 30%. Los microorganismos catalasa negativos (sin producción de

## CAPÍTULO I

### Materiales y métodos

burbujas) y Gram positivos fueron conservados a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  en un medio crioprotector estéril (caldo MRS adicionado con un 30% de glicerol v/v).

Otra parte del cultivo puro de cada microorganismo fue utilizado para evaluar dos características fenotípicas de importancia tecnológica relacionadas al uso de cultivos biopreservadores: a) tipo de metabolismo (homo o heterofermentación) e b) hidrólisis del aminoácido arginina. Para la primera prueba, se inoculó cada microorganismo en un caldo MRS conteniendo una campana de Durham y se incubó durante 24 h a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  bajo condiciones de aerobiosis. Si luego del período de incubación se observó gas en el interior de la campana de Durham, se consideró que el microorganismo presentaba un metabolismo heterofermentativo. En caso contrario el microorganismo fue considerado como homofermentativo.

Para evaluar la hidrólisis de la arginina (Schillinger y Lucke, 1987) se preparó un medio de cultivo específico conteniendo: peptona de caseína (0,5 % p/v, Britania<sup>®</sup>), extracto de levadura (0,3 % p/v Britania<sup>®</sup>), glucosa (0,1 % p/v Anedra<sup>®</sup>), púrpura de bromocresol (0,0016 % p/v Mallinckrodt<sup>®</sup>) y arginina (0,5 % p/v Mallinckrodt<sup>®</sup>). Este fue inoculado con un cultivo fresco de cada uno de los aislamientos y se incubó a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 24 h en aerobiosis. La prueba resultó positiva (hidrólisis de la arginina) cuando el tubo viró del color violeta al amarillo (utilización de la glucosa) y luego al violeta nuevamente (utilización de la arginina). Los tubos de los microorganismos incapaces de utilizar este aminoácido permanecieron de color amarillo.

#### 1. b) 2- *Estudio genotípico de las BAL mediante la técnica de ARDRA (Amplified rDNA Restriction Analysis)*

Con el objeto de realizar una estimación aproximada de las especies de BAL presentes en sangre aviar de mataderos de la zona se utilizó la técnica de ARDRA (Soto y col., 2010). Este estudio se realizó únicamente para conocer la diversidad de especies presentes. Para ello, como la técnica resulta ser costosa, se seleccionaron al azar aproximadamente un 50% de los aislamientos obtenidos inicialmente.



## CAPÍTULO I

### Materiales y métodos

#### - Extracción de ADN y amplificación del gen ribosomal 16S

Se extrajo el ADN genómico mediante la técnica de CTAB (Murray y Thompson, 1980) y se amplificó el gen 16S ADNr de acuerdo a Kim y Chun (2005) utilizando los cebadores universales 27f (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3') y 1492r (5'-ACG GTT ACC TTG TTA CGA CTT-3'). La reacción fue conformada utilizando 20-50 ng de ADN en 25 µL conteniendo 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM de cada deoxinucleotido (Promega<sup>®</sup>), 0,4 µM de cada cebador (27f y 1492r) y 1U de *Taq* polimerasa (GoTaq, Promega<sup>®</sup>) en 1X de buffer de la *Taq* (Promega<sup>®</sup>). Las muestras fueron colocadas en un termociclador (MJ Research<sup>®</sup>) y las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 94 °C 5 min; 30 ciclos de 94 °C 1 min, 55 °C 1 min y 72 °C 1 min y un paso de extensión final de 72 °C 7 min.

Los fragmentos obtenidos fueron separados en geles de agarosa al 1% p/v por electroforesis en buffer TBE 1X. La tinción del gel se realizó con Gel Red Nucleic Acid Stain (BIOTIUM<sup>®</sup>). Cada pocillo del gel de agarosa fue sembrado con 5 µl de cada producto de PCR y posteriormente se realizó una corrida electroforética a 80 V constante durante 30 min. Se utilizó un control negativo de la reacción de amplificación a cuya mezcla no se le agregó ADN molde. El peso molecular estimado de los amplicones del gen 16S ADNr fue de 1500 pb. Las bandas reveladas fueron comparadas con un marcador de peso molecular comercial (100 pb DNA Ladder, Promega<sup>®</sup>).

#### - Restricción enzimática y análisis de los perfiles de restricción

Luego de la amplificación del gen 16S ADNr, se realizó la restricción enzimática para lo cual se utilizaron 45 µl de cada producto amplificado y se distribuyeron en partes iguales en tres viales, los cuales contenían las enzimas de restricción preparadas según las indicaciones del fabricante (Fermentas<sup>®</sup>): *Hinf* I, *Hae* III y *Msp* I (Soto y col., 2010). Las muestras fueron incubadas 3 h a 37 °C, tiempo requerido para la acción de las enzimas.

Los fragmentos obtenidos (perfiles de bandas) fueron separados en geles de agarosa al 2 % p/v por electroforesis en buffer TBE 1X. La tinción del gel se realizó con Gel Red Nucleic Acid Stain. Cada pocillo del gel de agarosa fue sembrado con 5 µl de cada producto de PCR y posteriormente se realizó una corrida electroforética a 80 V durante 60

## CAPÍTULO I

### Materiales y métodos

min.

A partir del perfil diferencial de bandas generado por cada una de las enzimas se construyó una matriz de 0 y 1, analizando cada cepa individualmente, colocando un 0 en ausencia del fragmento y un 1 en presencia del mismo (Jackson y col., 1989). Una vez obtenida la matriz para cada una de las 3 enzimas por cada una de las cepas, fueron combinadas en una sola matriz por cepa para ser analizada utilizando el programa TREECONW (Versión 1.3b) mediante el algoritmo UPGMA (*Unweighted Pair Group Method*) el cual compara los fragmentos de restricción de cada microorganismo para estimar distancias filogenéticas entre dichas cepas.

De esta forma, el gen 16S ADN<sub>r</sub> de un representante de cada perfil de bandas diferente fue amplificado nuevamente y purificado con el kit Wizard PCR SV Gel & PCR Clean-Up System (Promega<sup>®</sup>) para su posterior secuenciación (Macrogen Inc., Korea). Las secuencias obtenidas fueron comparadas con aquellas depositadas en la base de datos del GenBank usando el algoritmo de BLAST (Benson y col., 2000) Esta comparación permitió definir la especie a la cual pertenecían las bacterias aisladas. Posteriormente las secuencias nucleotídicas fueron incorporadas al banco de genes GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>;1).

#### ***1. c) Aislamiento y caracterización fenotípica-genotípica de microorganismos A/P aislados de de sangre aviar de matadero.***

##### *1- c) 1- Aislamiento y caracterización fenotípica de las bacterias A/P autóctonas.*

Las cepas estudiadas como posibles A/P fueron: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp. y *Pseudomonas aeruginosa* (Zamora Rodriguez, 2003). Para aislarlas de la sangre obtenida en mataderos se utilizaron medios de cultivos selectivos para cada uno de ellos partiendo de diluciones en Ringer ¼.

–Aislamiento y caracterización fenotípica de *E. coli*:

## CAPÍTULO I

### Materiales y métodos

Para aislar *E. coli* se sembraron placas de agar VRB en superficie (0,1 ml de la dilución) y se incubaron en aerobiosis 24 h a 42 °C. Posteriormente, se repicaron colonias lactosa positivas en caldo Mac Conkey (Britania<sup>®</sup>), el cual fue incubado durante 24 h a 37 °C. Los caldos con crecimiento se sembraron en agar EMB (Britania<sup>®</sup>) en superficie mediante estría por agotamiento y se colocaron en estufa por 24 h a 37 °C en aerobiosis.

Las colonias presuntivas se repicaron en Caldo BHI (Britania<sup>®</sup>) y se incubaron durante 24 h a 37 °C para luego observar la morfología del microorganismo aislado, realizar tinción de Gram y pruebas bioquímicas específicas para dicha especie (agar TSI, agar Simons Citrato, SIM).

#### –Aislamiento y caracterización fenotípica de *S. aureus*:

Para *S. aureus* las diluciones fueron sembradas en superficie (0,1 ml) de placas conteniendo agar Baird Parker (Britania<sup>®</sup>), incubándose a 37 °C durante 24 h. Las colonias presuntivas se repicaron en caldo BHI durante 24 h a 37 °C. Una vez transcurrido el tiempo de incubación se realizó la tinción de Gram y se observó la morfología para verificar que se correspondiese con las características de la especie buscada. Posteriormente, para confirmar, se realizó la prueba de la Coagulasa empleando plasma de conejo (Cadness-Graves y col., 1943).

#### –Aislamiento y caracterización fenotípica de *Salmonella* spp.:

Para el aislamiento de *Salmonella* spp. se colocaron 25 ml de sangre en 225 ml de Agua Peptonada Bufferada (Britania<sup>®</sup>) y se incubó a 37 °C durante 18 h. Posteriormente, se inoculó 0,1 ml del cultivo anterior en 10 ml de caldo Rappaport (24 h, 42 °C) y 1 ml en 10 ml de caldo Selenito Cistina (Britania<sup>®</sup>) (24 h, 37 °C). Transcurrido el período de incubación las 2 muestras se sembraron en superficie en tres medios sólidos para determinar la presencia del microorganismo: agar XLD (OXOID<sup>®</sup>), agar Salmonella Shigella (SS) (Britania<sup>®</sup>) y agar BPLS (Merck<sup>®</sup>). Estos fueron incubados durante 24 h a 37 °C.

## CAPÍTULO I

### Materiales y métodos

Las colonias presuntivas aisladas de cada medio sólido fueron repicadas en caldo BHI e incubadas durante 24 h a 37 °C. Transcurrido el tiempo de incubación se realizó la tinción de Gram y se observó la morfología para verificar la concordancia con las características del género buscado. Posteriormente, se realizó la prueba de aglutinación en placa con antígenos específicos (OS-A, OS-B, provistos por el Instituto C. G. Malbrán) para el género *Salmonella*.

–Aislamiento y caracterización fenotípica de *P. aeruginosa*:

Para el aislamiento de *P. aeruginosa* se sembraron las diluciones mediante estría por agotamiento en agar Pseudomonas P (Britania®) las cuales se incubaron a 37 °C durante 24 h. Desde dicho medio se aislaron colonias presuntivas las cuales se repicaron en caldo nutritivo durante un tiempo variable entre 24 y 48 h a 37 °C. Una vez transcurrido el tiempo de incubación se realizó la tinción de Gram y la prueba de oxidasa.

Todos los microorganismos A/P aislados de sangre aviar de matadero fueron conservados a -80 °C en un medio crioprotector (caldo BHI adicionado con un 30% de glicerol v/v) e identificados como *Escherichia coli* SA, *Staphylococcus aureus* SA, *Salmonella* spp. SA y *Pseudomonas aeruginosa* SA.

*1- c) 2- Caracterización genotípica de los microorganismos A/P autóctonos.*

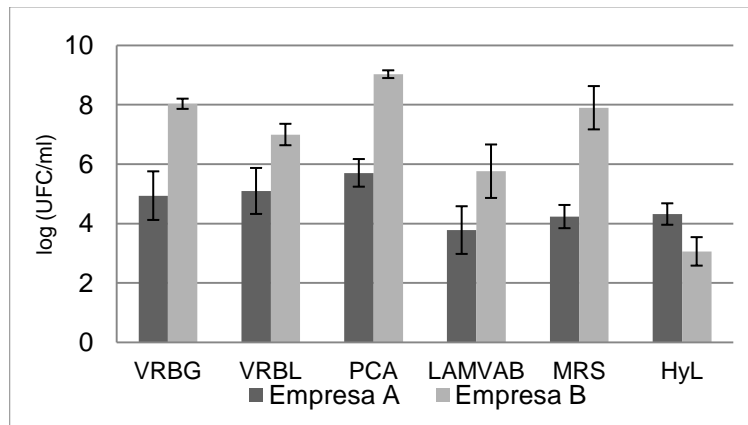
La extracción de ADN genómico de los aislamientos presuntivos se realizó mediante la técnica de CTAB (Murray y Thompson, 1980) y se amplificó el 16S ADNr siguiendo el protocolo de Kim y Chun (2005) mencionado anteriormente. Posteriormente, el gen 16S ADNr de cada microorganismo A/P aislado fue purificado con el kit Wizard PCR SV Gel & PCR Clean-Up System (Promega®) para su secuenciación (Macrogen Inc., Korea). Las secuencias obtenidas fueron comparadas con las depositadas en la base de datos del GenBank usando el algoritmo de BLAST (Benson y col., 2000). Posteriormente las secuencias nucleotídicas fueron incorporadas al banco de genes GenBank.

## Resultados

### 1.a) Evaluación de la microbiota presente en sangre de matadero aviar.

Los recuentos evaluados en los dos frigoríficos resultaron ser diferentes en cinco de los seis grupos bacterianos objetos de estudio, siendo la empresa B la que presentó la mayor carga microbiana (Figura 2).

Figura 2: Recuentos de poblaciones microbianas presentes en sangre aviar de dos mataderos



Referencias: los medios de cultivo específicos para cada grupo bacteriano fueron VRBG para enterobacterias, VRB para coliformes, PCA para mesófilos totales, LAMVAB para lactobacilos, MRS para BAL totales y HyL para hongos y levaduras.

Inicialmente, evaluando los microorganismos mesófilos totales se detectaron valores de 6 unidades logarítmicas de UFC/ml de sangre para el frigorífico A a diferencia del frigorífico B ( $p < 0,05$ ) que presentó valores de 9 log UFC/ml de sangre. Respecto a las enterobacterias se observó una diferencia de aproximadamente 3 unidades logarítmicas de UFC/ml de sangre ( $p < 0,05$ ) entre los mataderos. En ambas empresas los coliformes constituyeron una gran proporción de la población total de enterobacterias, aunque se evidenció que la sangre obtenida en el establecimiento A contenía aproximadamente 2 log UFC/ml de sangre más que la empresa B. En el caso de la población de BAL en ambos medios utilizados se detectaron diferencias ( $p < 0,05$ ) entre los frigoríficos, representando

**CAPÍTULO I**  
**Resultados**

los lactobacilos una parte importante de la población de BAL en ambas empresas. En contraposición, para mohos y levaduras los valores hallados fueron similares en las muestras de ambos frigoríficos ( $p > 0,05$ ).

***1. b) Aislamiento y caracterización de las BAL mesófilas presentes en sangre recogida de frigoríficos de pollos mediante pruebas fenotípicas***

*1. b) 1- Aislamiento y caracterización fenotípica de BAL mesófilas*

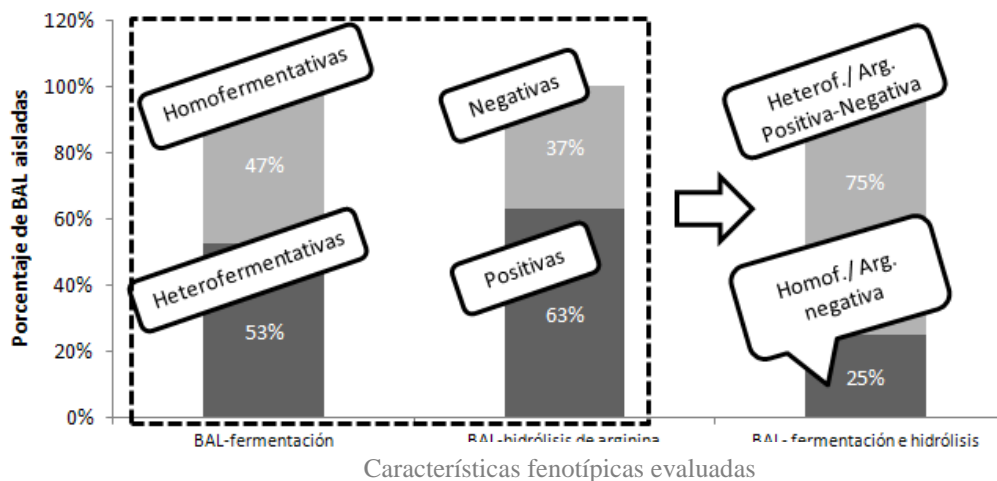
El número de BAL aisladas a partir de los medios de cultivos utilizados fue de 232 bacterias las cuáles fueron todas catalasa negativa y Gram positivas.

Respecto a la caracterización fenotípica, inicialmente se analizó el tipo de fermentación presentado por cada bacteria, detectándose que el 53% ( $n=123$ ) de las cepas fueron homofermentativas y el resto heterofermentativas, produciendo  $\text{CO}_2$  como principal producto de su metabolismo. Posteriormente, se detectó que el 63% ( $n=146$ ) de las BAL aisladas eran capaces de degradar el aminoácido arginina.

Una vez detectadas estas dos características consideradas previamente como importantes desde el punto de vista tecnológico se procedió a combinar estos caracteres fenotípicos con el objeto de seleccionar microorganismos que pudieran ser aplicados en un sistema de biopreservación. Inicialmente se identificaron las bacterias homofermentativas e incapaces de hidrolizar la arginina, las cuales representaron el 25% ( $n= 58$ ) de los microorganismos aislados (Figura 3).

*Figura 3: Caracterización fenotípica de BAL aisladas de sangre de matadero aviar.*

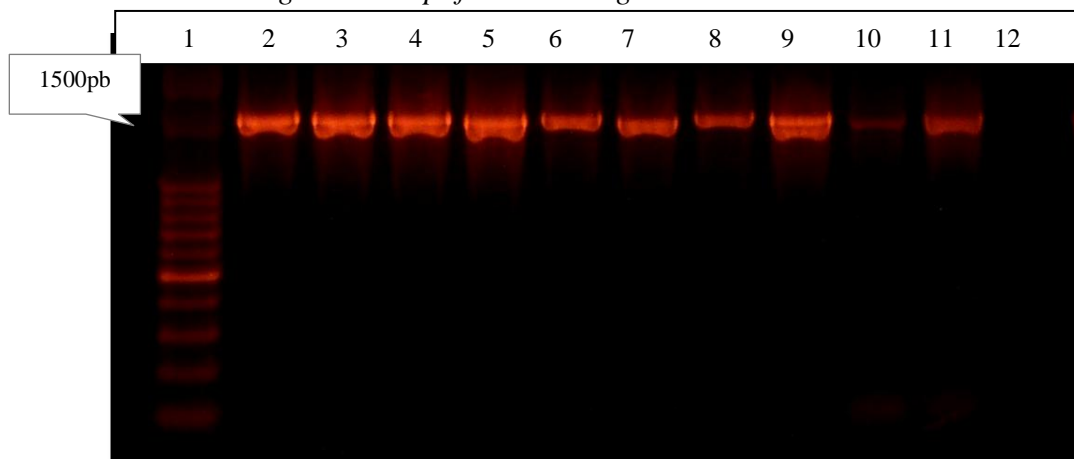
## CAPÍTULO I Resultados



### 1. b) 2- Caracterización genotípica de BAL mediante la técnica de ARDRA (Amplified rDNA Restriction Analysis)

Las BAL seleccionadas para este ensayo fueron aproximadamente el 50% de los aislamientos (N=110). En todos los casos fue posible detectar el amplicon de 1500 pb correspondiente al gen buscado (Figura 4).

Figura 4: Amplificación del gen ribosomal 16S.



Referencias: Calles: 1, MPM; 2 a 11, amplicon de 1500 pb de BAL aisladas; 12, control negativo de la amplificación.

## CAPÍTULO I Resultados

De las cepas evaluadas pertenecientes a muestras de sangre obtenidas en diferentes días se detectaron 31 perfiles de restricción. Si bien algunos de estos perfiles fueron similares (compartieron la mayoría de las bandas) la secuenciación posterior de los mismos indicó que correspondían a 11 especies diferentes de BAL (Tabla 2). Esto demostró que algunos de los perfiles que se consideraron diferentes, por medio de la secuenciación se determinó que pertenecían a la misma especie.

*Tabla 2: Especies de BAL asignadas a los aislamientos obtenidos de sangre aviar de mataderos*

Aislamientos	Especie bacteriana	Grupo ARDRA	Valor Identidad <sup>a</sup>	Muestras de sangre	Número de acceso Genbank
DSPV 001SA	<i>Enterococcus durans</i>	1	94%	4	JQ322216
DSPV 002SA	<i>Enterococcus faecalis</i>	2	97%	8	JQ322217
DSPV 003SA	<i>Enterococcus faecalis</i>	2	99%	2	JQ322220
DSPV 004SA	<i>Enterococcus faecalis</i>	2	99%	1	JQ322221
DSPV 005SA	<i>Enterococcus faecalis</i>	2	99%	3	JQ322222
DSPV 006SA	<i>Enterococcus faecalis</i>	2	97%	4	JQ322212
DSPV 007SA	<i>Enterococcus faecalis</i>	2	98%	10	JQ322214
DSPV 008SA	<i>Enterococcus faecalis</i>	2	100%	5	JQ322228
DSPV 009SA	<i>Enterococcus faecium</i>	3	99%	6	JQ322238
DSPV 010SA	<i>Enterococcus faecium</i>	3	99%	4	JQ322235
DSPV 011SA	<i>Enterococcus faecium</i>	3	95%	7	JQ322213
DSPV 012SA	<i>Lactobacillus brevis</i>	4	94%	4	JQ322211
DSPV 013SA	<i>Lactobacillus crispatus</i>	5	98%	7	JQ322240
DSPV 014SA	<i>Lactobacillus plantarum</i>	6	99%	3	JQ322237
DSPV 016SA	<i>Lactobacillus reuteri</i>	7	99%	9	JQ322218
DSPV 017SA	<i>Lactobacillus reuteri</i>	7	99%	10	JQ322219
DSPV 018SA	<i>Lactobacillus reuteri</i>	7	99%	8	JQ322226
DSPV 019SA	<i>Lactobacillus reuteri</i>	7	99%	5	JQ322227
DSPV 020SA	<i>Lactobacillus reuteri</i>	7	99%	6	JQ322209
DSPV 021SA	<i>Lactobacillus salivarius</i>	8	100%	2	JQ322239
DSPV 022SA	<i>Lactobacillus salivarius</i>	8	98%	4	JQ322236
DSPV 023SA	<i>Lactobacillus salivarius</i>	8	99%	9	JQ322241
DSPV 024SA	<i>Lactobacillus salivarius</i>	8	99%	10	JQ322242
DSPV 025SA	<i>Lactobacillus salivarius</i>	8	99%	1	JQ322225
DSPV 026SA	<i>Lactobacillus salivarius</i>	8	99%	5	JQ322229
DSPV 027SA	<i>Lactobacillus salivarius</i>	8	99%	6	JQ322208
DSPV 015SA	<i>Pediococcus acidilactici</i>	9	99%	3	JQ322207
DSPV 028SA	<i>Pediococcus acidilactici</i>	9	99%	4	JQ322215
DSPV 029SA	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	10	99%	1	JQ322223
DSPV 030SA	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	10	99%	10	JQ322224
DSPV 031SA	<i>Weissella paramesenteroides</i>	11	96%	6	JQ322210

Referencias: <sup>(a)</sup> Valor de identidad hace referencia a uno de los parámetros que utiliza BLAST para comparar el aislamiento propuesto con los genes del banco. 100% indica que las secuencias son iguales.

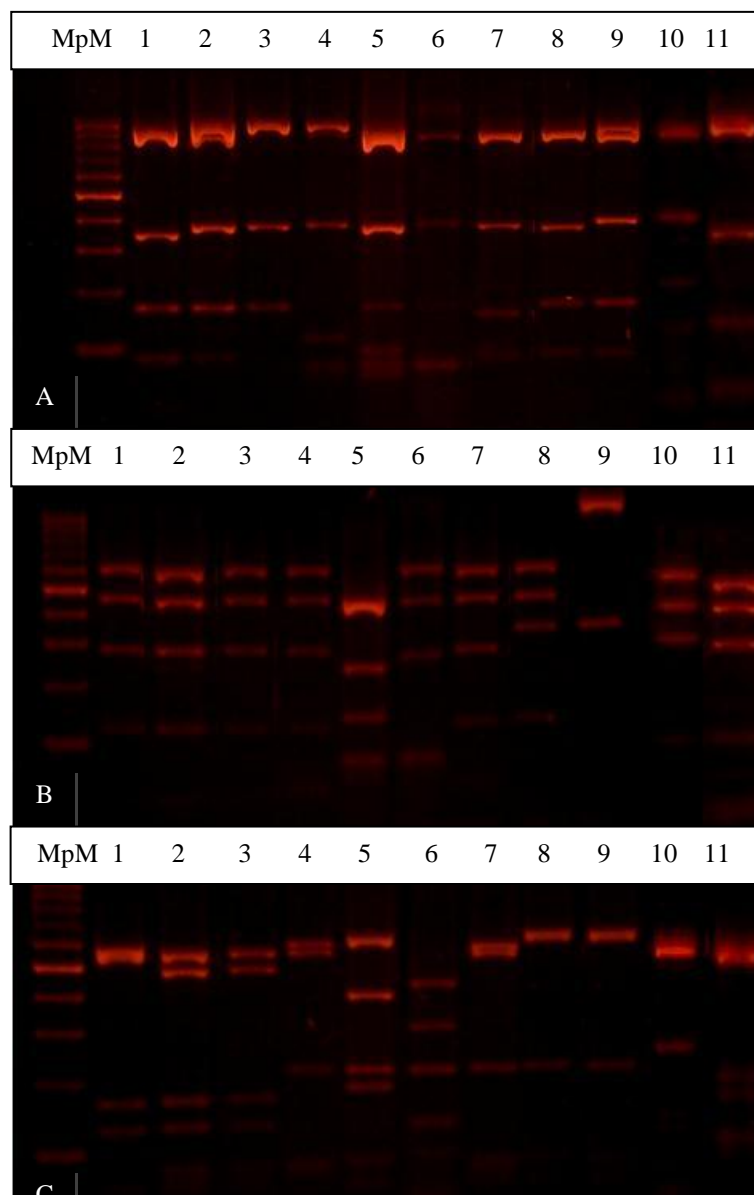


## CAPÍTULO I

### Resultados

Asimismo, analizando los perfiles de restricción generados por cada una de las enzimas individualmente (Figura 5), todos presentaron de 3 a 6 fragmentos de restricción de 60 a 1000 pb. Adicionalmente, se determinó que la enzima *Msp* I fue la que presentó el más alto poder de discriminación generando la mayor cantidad de perfiles de restricción diferentes

Figura 5: Perfiles de ARDRA detectados en los aislamientos



Referencias: Calle 1, marcador de peso molecular (MpM,100 pb). Calles 2 a 12 corresponden a los fragmentos de restricción de los 11 perfiles diferentes. Fragmentos de restricción obtenidos con cada enzima: **A** = *Hinf* I, **B** = *Hae* III y **C** = *Msp* I.

## CAPÍTULO I

### Resultados

De esta forma, con los datos obtenidos de la restricción enzimática, se observó que las especies mayormente detectadas en las muestras de sangre analizadas de matadero aviar fueron *Lactobacillus salivarius* y *Enterococcus faecalis* (7 de las 10 muestras de sangre obtenida en mataderos presentaron estos microorganismos) seguidas por *Lactobacillus reuteri* y *Enterococcus faecium*.

#### **1. c) Aislamiento y caracterización fenotípica/genotípica de microorganismos A/P aislados de sangre aviar obtenida en mataderos.**

Utilizando los medios de cultivos específicos para cada microorganismo se aislaron colonias presuntivas de las bacterias planteadas como A/P (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp., *Pseudomonas aeruginosa*) desde muestras de sangre aviar de matadero.

Una vez realizadas las pruebas bioquímicas para cada una de las especies, se determinó que todas coincidían con los resultados esperados para cada bacteria. En el caso de *Salmonella* spp., el género de la misma fue confirmado mediante la prueba de aglutinación con antisueros específicos.

Una vez obtenidas las secuencias del gen 16S ADNr fueron comparadas con las depositadas en el GenBank confirmando que los aislamientos presuntivos pertenecían a las bacterias A/P buscadas (Tabla 3).

*Tabla 3: Especies de bacterias A/P asignadas a los aislamientos obtenidos de sangre aviar de mataderos*

<i>Aislamientos</i>	<i>Especie bacteriana</i>	<i>Valor Identidad<sup>a</sup></i>	<i>Número de acceso Genbank</i>
DSPV 001PSA	<i>Escherichia coli</i>	99%	JQ322230
DSPV 002PSA	<i>Salmonella sp</i>	99%	JQ322231
DSPV 004PSA	<i>Staphylococcus aureus</i>	99%	JQ322233
DSPV 005PSA	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	100%	JQ322234

Referencias: <sup>(a)</sup> Valor de identidad hace referencia a uno de los parámetros que utiliza BLAST para comparar el aislamiento propuesto con los genes del banco. 100% indica que las secuencias son iguales.

**CAPÍTULO I*****Discusión***

La microbiota presente en sangre obtenida en mataderos con sistemas abierto de recolección se encuentra compuesta predominantemente por microorganismos del tracto gastrointestinal de los animales faenados y, en menor porcentaje, por bacterias del ambiente (Parés y Carretero, 1997). Debido a esto, estudiar las poblaciones presentes en la sangre en el matadero es de suma importancia si se pretende utilizar microorganismos benéficos autóctonos con posible potencial de biopreservación.

Si bien no hay suficiente información sobre las características microbiológicas de la sangre obtenida en mataderos de aves, sí se posee información de la microbiota presente en distintos puntos del procesamiento de la carne (Bailey y col., 1987; Kotula y Pandya, 1995; Goksoy y col., 2004).

Asimismo, en investigaciones previas se han detectado diferencias entre frigoríficos cuando se evalúan las concentraciones de las poblaciones microbianas. En este sentido, Goksoy y col. (2004), al estudiar la microbiota presente en dos mataderos, encontraron diferencias en el número de enterobacterias, sin embargo el resto de las poblaciones (coliformes, mesófilos, *Staphylococcus/Micrococcus*) presentaron las mismas unidades logarítmicas. A diferencia de lo anterior, en este trabajo se detectaron diferencias en los recuentos de 5 de las 6 poblaciones evaluadas (solo Hongos y Levaduras se halló en la misma carga en los dos mataderos).

El hecho de hallar diferencias en los recuentos de las poblaciones microbianas puede atribuirse a varios factores: a) los sistemas de recolección de sangre (Parés y Carretero, 1997), b) la contaminación presente en los diferentes lugares de los mataderos (Mead, 1989) y c) la microbiota del tracto gastrointestinal en las aves previo al sacrificio (Bailey y col., 1987). Este último punto, se relaciona directamente con los sistemas de producción aviar que implican el manejo realizado en la granja, así como la alimentación y sanidad de los animales. De esta forma, los sistemas de producción son propios de cada zona, región o empresa, lo que impacta sobre la microbiota hallada en mataderos de diferentes localidades (Bonansea, 2010).

**CAPÍTULO I**  
Discusión

Respecto al estudio de las características fenotípicas de las BAL aisladas desde sangre, muchas de ellas presentaron metabolismo de tipo heterofermentativo. Si bien unos de los productos finales es el gas CO<sub>2</sub>, cuya actividad suele considerarse inhibitoria sobre algunos grupos bacterianos (Katusic, 2002), el uso de bacterias con este tipo de metabolismo en la fermentación de los alimentos no es recomendado debido a los inconvenientes que provocan en la textura de los mismos (Cabeza Herrera, 2006).

Por otro lado, la descarboxilación de algunos aminoácidos llevada a cabo por las BAL puede provocar la presencia de concentraciones altas de aminas biogénicas en los alimentos, de forma que tras su ingestión pasan a la circulación sanguínea desde donde ejercen diversos efectos tóxicos (Brink y col., 1990; Mariné-Font y col., 1995; Bover-Cid y Holzapfel, 1999). Asimismo, estos compuestos pueden reaccionar con los nitritos presentes en dichos alimentos y transformarse en nitrosaminas las cuales son compuestos cancerígenos (Dierick y col., 1974).

Particularmente, el aminoácido arginina presenta diferentes vías catabólicas, por ejemplo, la más conocida es mediante la arginina deiminasa (ADI) (Konings y col., 1995, Liu y col., 1995). El producto final de esta vía es la ornitina la cual se transforma en putrescina mediante una reacción de descarboxilación y es la responsable de los olores pútridos de la fase avanzada de alteración de determinados alimentos. Asimismo, el catabolismo de arginina por bacterias lácticas del vino se ha relacionado con la producción de etilcarbamato, una sustancia cancerígena que se forma a partir de la citrulina o de la urea (Liu y col., 1995).

Todas estas formas de utilizar la arginina por algunas BAL demuestran que los productos finales son indeseables tanto para la salud como para los procesos tecnológicos. De esta forma, en este ensayo se evaluó la capacidad de hidrolizar este aminoácido para luego poder descartar las BAL que resultaran positivas a esta reacción.

Si bien las características fenotípicas de las bacterias permiten determinar algunos exponentes de utilidad para la utilización en alimentos, la genotipificación implica la identificación a nivel de género y especie aportando mayor información sobre el aislamiento. De las diversas técnicas de genotipificación, la técnica utilizada en este trabajo

**CAPÍTULO I**  
Discusión

(ARDRA) fue capaz de diferenciar especies del mismo género, ya que se detectaron patrones de bandas diferentes dentro de los dos grupos predominantes (*Lactobacillus* spp. y *Enterococcus* spp.). Esto soporta los resultados de trabajos previos (Hall y col., 2001; Guan y col., 2003; Kim y Chun, 2005, Soto y col., 2010) donde se concluye que la técnica de ARDRA es una herramienta que permite discriminar entre especies de BAL permitiendo agrupar los aislamientos por especie y luego realizar la secuenciación de algunos de los exponentes de cada grupo. Otras ventajas de la técnica son la reproducibilidad, el poco tiempo que consume realizarla y la factibilidad de analizar gran número de aislamientos (Ziemer y col., 2004; Soto y col., 2010).

La mayor parte de los géneros y especies encontradas en este trabajo resultaron de interés, dado que en estudios previos demostraron tener características probióticas y tecnológicas adecuadas para la aplicación como cultivos biopreservadores. Muchos de los géneros como *Lactobacillus*, *Enterococcus* y *Bacillus* han sido utilizados en la biopreservación de productos alimenticios tanto para humanos como para animales (Chukeatirote, 2003; Kolozyn-Krajewska y Dolatowski, 2012; Delavenne y col., 2013).

Asimismo, las BAL poseen mecanismos que las hacen capaces de inhibir una gran variedad de microorganismos contaminantes, patógenos y/o deteriorantes como *Escherichia coli*, *Pseudomonas*, *Salmonella* y *Staphylococcus* (Adams y Halls, 1988; De Vuyst y Vandamme, 1994). Estos géneros bacterianos fueron aislados desde sangre de matadero y caracterizados por Parés (1995) indicando la presencia de estos en dicho producto. En el presente trabajo, estos microorganismos también fueron obtenidos con suma facilidad demostrando que se hallan presentes y además, el hallazgo de los mismos permite relacionarlos con la deficiente calidad del producto obtenido mediante sistemas abiertos de recolección de sangre.

**CAPÍTULO I***Conclusiones parciales*

✓ Las poblaciones bacterianas evaluadas demostraron que la sangre aviar obtenida en mataderos mediante sistemas abiertos de recolección es un producto altamente contaminado. Asimismo, las bacterias consideradas A/P fueron aisladas sin dificultad corroborando su presencia en dicho subproducto.

✓ La diversidad y cantidad de microorganismos presentes en sangre obtenida en mataderos se relaciona de manera directa con el manejo que se realiza dentro de los establecimientos faenadores, el sistema productivo aviar y la zona donde se localizan las granjas y frigoríficos de pollos.

✓ Se obtuvieron 232 BAL de las cuales el 75% presentó características fenotípicas indeseables (heterofermentación e hidrólisis de arginina) para la conformación del SB. Esto demuestra que es necesario contar con un número inicial alto de aislamientos que permitan seleccionar los mejores exponentes.

✓ La familia de BAL obtenidas desde sangre aviar de mataderos es diversa ya que se detectaron 4 géneros y 11 especies diferentes, siendo *L. salivarius* y *E. faecalis* las bacterias aisladas con mayor frecuencia.

## **CAPÍTULO II**

### ***Objetivo específico a alcanzar***

2- Seleccionar BAL para conformar el sistema de biopreservación de sangre aviar obtenida en mataderos.

- a) Evaluar la capacidad antagonista de las BAL frente a microorganismos indicadores de colección y bacterias A/P autóctonas.
- b) Identificar las BAL seleccionadas mediante técnicas moleculares.
- c) Estudiar la cinética de crecimiento de las BAL en caldo MRS.
- d) Estimar la termosensibilidad de las BAL aisladas.

En esta sección, se describe la metodología utilizada con el objetivo de detectar BAL capaces de inhibir bacterias A/P presentes en sangre aviar de matadero. Para evaluar la capacidad inhibitoria, solo se utilizaron aquellas BAL que en el capítulo anterior presentaron un metabolismo de tipo homofermentativo e incapacidad de hidrolizar la arginina. Posteriormente se analizaron los parámetros de crecimiento microbiano de los microorganismos (m.o) seleccionados para determinar cual o cuales BAL presentaban mejores condiciones de desarrollo en medio de cultivo. Por último se evaluó la resistencia a diferentes temperaturas.

Para ello, el capítulo se organizó de la siguiente manera:

- en una primera etapa las BAL homofermentativas e incapaces de hidrolizar la arginina fueron evaluadas con base en su capacidad para producir sustancias inhibitoras (ácidos, peróxido de hidrógeno, bacteriocinas) frente a una colección de cepas indicadoras del Laboratorio de Análisis de Alimentos (DSPV-FCV, UNL) para luego enfrentarlas a las bacterias A/P aisladas directamente desde sangre aviar obtenida en mataderos. Las BAL con mayor poder inhibitorio fueron pre-seleccionadas e identificadas genotípicamente.

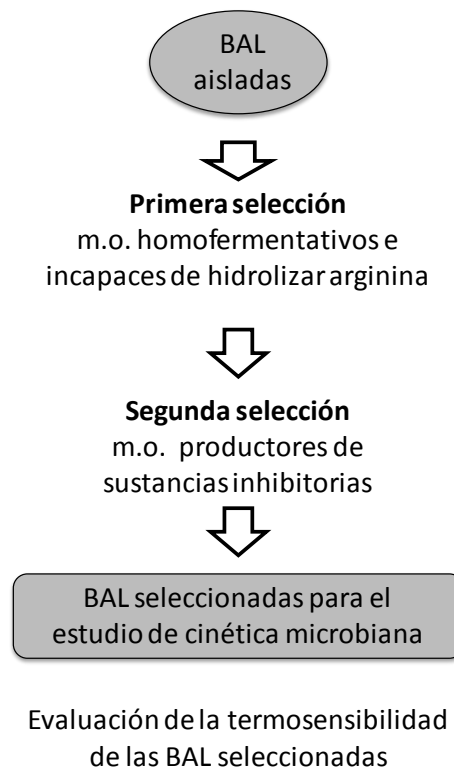
-



- en una segunda etapa, se evaluaron las curvas de crecimiento de las BAL pre-seleccionadas en medios selectivos (MRS) con el objeto de estudiar la capacidad de desarrollo de cada una.

- finalmente, se analizó la sensibilidad térmica de las BAL pre-seleccionadas para determinar si la temperatura elevada afectaba la viabilidad. Se consideró de suma importancia que estas fueran sensibles a las altas temperaturas para, de este modo, asegurar su inactivación en el momento en que la sangre sea sometida a los procesos habituales (ej.: Secado por Spray) antes de su utilización en el resto de las industrias.

A modo de resumen, se presenta el siguiente gráfico donde constan las etapas de selección de los mejores exponentes de BAL para conformar el SB:



## ***Materiales y métodos***

### ***2. Selección de los mejores exponentes de las BAL aisladas mediante técnicas in-vitro***

#### ***2. a) Evaluación de la capacidad antagonista de las bacterias lácticas frente a microorganismos indicadores.***

Las BAL poseen diferentes mecanismos de inhibición frente a microorganismos A/P. En la presente tesis se evaluó la capacidad de inhibir mediante la producción de los siguientes compuestos: ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno y bacteriocinas. Para ello, se utilizaron las BAL que presentaron metabolismo homofermentativo e incapacidad de hidrolizar el aminoácido arginina (n= 58).

#### **–Producción de ácidos orgánicos**

Para evaluar el potencial antagonista de las BAL productoras de ácidos orgánicos se utilizó el ensayo de difusión en agar (Schillinger y Lücke, 1987). Para detectar las BAL productoras de estas sustancias las mismas fueron enfrentadas a microorganismos indicadores pertenecientes al Laboratorio del DSP (FCV-UNL) que ya han sido empleados en ensayos previos realizados por el grupo de investigación. Los microorganismos utilizados fueron *Escherichia coli* DSPV, *Salmonella dublin* DSPV, *Pseudomonas aeruginosa* DSPV, *Lactobacillus casei* DSPV, *Lactobacillus plantarum* DSPV, *Enterococcus faecium* DSPV y *Lactobacillus acidophilus* DSPV.

Las BAL aisladas desde sangre fueron reactivadas en caldo MRS mediante 3 pasajes sucesivos e incubados a 37 °C durante 24 h. El último repique se realizó en 10 ml de caldo MRS. Posteriormente, los cultivos fueron centrifugados a 3500 rpm durante 15 min. Se tomaron 1,5 ml de cada sobrenadante, los cuales fueron transferidos a microtubos de 2 ml y centrifugados nuevamente a 10000 rpm durante 15 min para eliminar completamente cualquier resto celular. Seguidamente, 1,5 ml de cada sobrenadante fue distribuido en

Capítulo II  
Materiales y métodos

microtubos estériles, previamente rotulados como extracto libre de células sin neutralizar (ELC SN) y con la identificación del aislamiento correspondiente. Los 8,5 ml restantes del sobrenadante inicial fueron transferidos a tubos de 15 ml. Posteriormente, se ajustó el pH entre 6–6,5 con NaOH 3 M. Luego, 1,5 ml de cada sobrenadante fueron transferidos a otro microtubo de 2 ml para ser centrifugado a 10000 rpm durante 15 min. Se procedió de igual manera que para los ELC SN desde este paso rotulando cada microtubo como extracto libre de células neutralizado (ELC N) y con la identificación de cada cepa. De esta manera se obtuvieron 1,5 ml de ELC SN y 1,5 ml de ELC N por cada cepa, los cuales fueron congelados a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Al neutralizar los ELC se buscó evaluar la inhibición de las BAL mediante la producción de otras sustancias inhibitorias (SI) diferente a los ácidos orgánicos.

Para realizar el ensayo de difusión en agar se utilizaron las cepas indicadoras de colección mencionadas anteriormente las cuales fueron enfrentadas con los ELC obtenidos. *E. coli* DSPV, *Salmonella dublin* DSPV y *P. aeruginosa* DSPV fueron incubadas durante 24 h a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  en caldo BHI, mientras que las 4 bacterias restantes (BAL) fueron incubadas bajo las mismas condiciones pero en caldo MRS. Transcurrido el tiempo de incubación, se preparó una suspensión de los mismos en agua estéril con el objeto de medir la absorbancia (Abs). El valor de DO (Densidad Óptica) utilizado en este ensayo fue entre 0,2 y 0,3 medido a 620 nm, lo que correspondió a una población estimativa del orden de  $10^8$  UFC/ml (Zamora Rodríguez, 2003).

Posteriormente, 50  $\mu\text{l}$  de cada cepa tapiz con ese valor de Abs, fue inoculado en cada tubo con el agar correspondiente previamente acondicionado. Para ello, tanto el agar MRS como el agar BHI fueron fraccionados en porciones de 17 ml, luego esterilizados y mantenidos en baño termostático a  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de la siembra de la cepa tapiz. Cada uno de estos medios de cultivo fue preparado con un 0,8% de Agar-Agar lo que permitió generar un medio menos sólido y más suave con el objeto de permitir una mejor difusión de la SI.

De esta forma, cada agar inoculado fue homogeneizado rápidamente en vórtex y dispensado en placa de Petri estéril, previamente rotulada. Una vez que el medio agarizó (1

Capítulo II  
Materiales y métodos

h a 4°C), fueron realizados 5 hoyos de 5 mm de diámetro por cada placa, utilizando sacabocados estériles. Una vez preparadas las placas de Petri con las cepas tapiz, fueron colocados en cada hoyo 30 µl de los ELC a analizar, trabajando siempre bajo flujo laminar. Después de tapar y dejar reposar las placas durante 1 h a 4 °C para permitir que los ELC difundieran en el medio agarizado, se incubaron a 37 °C durante 24 h en aerobiosis.

Finalizado el período de incubación se observó la presencia o ausencia de halos de inhibición de crecimiento del microorganismo tapiz. Al evaluar los ELC SN y ELC N se separaron aquellas cepas de BAL que produjeron ácidos orgánicos (inhibición por ELC SN) de las que inhibieron a las cepas tapices por otras SI (ELC N). Los halos considerados positivos fueron los que presentaron un diámetro igual o mayor a 1 mm (Schillinger y Lucke., 1987), sin tener en cuenta el diámetro del hoyo efectuado con el sacabocado estéril.

–Producción de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

Aquellas cepas cuyos ELC N presentaron halos de inhibición en el ensayo descrito previamente fueron estudiadas con el fin de determinar si el halo fue producido por peróxido de hidrógeno como principal SI.

Para esto, cada BAL a evaluar fue sembrada en superficie sobre agar MRS suplementado con 0,25 mg/ml de 3',3',5',5' Tetrametil Benzidina (TMB, Sigma<sup>®</sup>) y 0,01 mg/ml de Peroxidasa de Rábano (HRP, Sigma<sup>®</sup>), incubando las placas a 37 °C por 48 h bajo condiciones anaeróbicas. Luego de ese tiempo, las placas fueron expuestas al aire durante 30 min (McGroarty y col., 1992). Las colonias productoras de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> luego de la exposición al aire presentaron una coloración azul.

–Producción de sustancias de tipo bacteriocinas

Las cepas que presentaron halos de inhibición para los ELC N pero que no fueron positivas a la prueba de peróxido de hidrógeno fueron evaluadas con el objetivo de determinar la producción de SI de origen proteico tipo bacteriocinas.

En primer lugar, para confirmar la composición proteica de estas sustancias

Capítulo II  
Materiales y métodos

indicativas de bacteriocinas, las mismas fueron sometidas a un tratamiento enzimático. Por este motivo, los ELC N de las cepas productoras fueron incubados a 37 °C durante 30 min en presencia de Proteinasa K 1 mg/ml (Sigma®) y luego del tratamiento se evaluó si persistía el efecto inhibitorio frente a las cepas indicadoras mediante la prueba de difusión en gel de agar descripta anteriormente.

–Evaluación del espectro de inhibición de las BAL productoras de sustancias tipo bacteriocinas frente a las cepas indicadoras de colección del laboratorio del DSP y A/P aislados desde sangre aviar de matadero.

Para caracterizar el espectro de inhibición de las cepas productoras, estas sustancias fueron enfrentadas a los A/P autóctonos aislados de sangre aviar de matadero (*E. coli* SA, *Salmonella* spp. SA, *P. aeruginosa* SA y *S. aureus* SA). La evaluación del poder inhibitorio se realizó mediante la prueba de inhibición en agar mencionada en los apartados anteriores y posteriormente los resultados se compararon con los detectados frente a las cepas indicadoras de la colección del laboratorio del DSP.

*2. b) Identificación de las BAL seleccionadas mediante técnicas moleculares.*

Las BAL seleccionadas por sus efectos inhibitorios fueron genotipificadas para determinar la especie a la que correspondían. Para ello se procedió a la extracción del ADN, amplificación del gen ribosomal 16S, purificación y secuenciación del mismo como se describió anteriormente en el *Capítulo I*.

*2. c) Estudio de la cinética de crecimiento de las BAL en caldo MRS*

Las BAL seleccionadas para este ensayo fueron las productoras de sustancias tipo bacteriocina y además se agregaron aquellos microorganismos cuyos ELC presentaban un amplio espectro de inhibición sobre los microorganismos evaluados.

Para realizar los ensayos de cinética de crecimiento microbiano se utilizó un equipo automatizado diseñado para tal fin, capaz de realizar lecturas de densidad óptica (DO) en diferentes momentos a lo largo del período de incubación (Bioscreen®).

Capítulo II  
Materiales y métodos

Las condiciones evaluadas fueron las siguientes: se sembró cada pocillo de la placa del Bioscreen con 350  $\mu$ l de caldo MRS el cual fue inoculado al 1% con cultivos frescos de 18 h de cada una de las BAL. La incubación se realizó durante 24 h a 30 °C. Las lecturas se realizaron a 600 nm de Abs cada 30 min con agitación previa. Las muestras fueron procesadas por triplicado y el promedio de los valores de DO fue analizado mediante el soporte informático MicroFit<sup>®</sup>. Con esta herramienta, se analizó la curva de crecimiento de cada microorganismo evaluando los siguientes parámetros: *t-lag*: fase de latencia, *Mumax*: tasa máxima de crecimiento, *Nmax*: densidad final de células bacterianas, *t-d*: tiempo en horas que demora el microorganismo para duplicarse.

*2. d) Evaluación de la termosensibilidad de las BAL seleccionadas para conformar el sistema de biopreservación.*

Se utilizó un cultivo en MRS de 18 h de incubación de cada una de las cepas con una densidad óptica correspondiente a 8 log UFC/ml. El mismo fue dividido en tres partes iguales, las cuales fueron sometidas a diferentes temperaturas y tiempos. Una de las alícuotas fue colocada en baño termostático a 55 °C durante 7,5; 15 y 30 min. Otra fracción fue colocada a 65 °C respetando los mismos tiempos de lectura y la tercera alícuota fue conservada a temperatura ambiente (22 °C).

En cada uno de los tres tiempos evaluados se realizó una siembra en agar MRS mediante estría por agotamiento y las placas fueron incubadas 72 h a 37 °C en anaerobiosis con el objetivo de detectar presencia o ausencia de crecimiento.

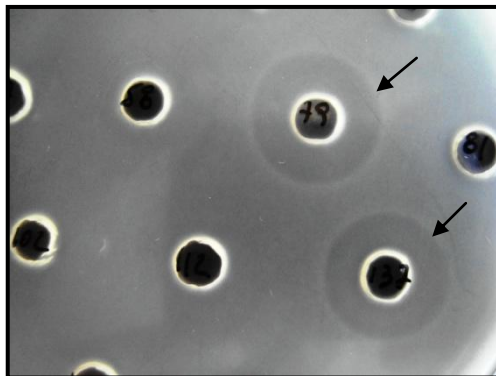
## *Resultados*

### **2. Selección de los mejores exponentes de las BAL aisladas mediante técnicas *in-vitro***

#### *2. a) Estudio de la capacidad antagonista de las BAL frente a microorganismos indicadores de colección.*

De los aislamientos evaluados (n=58), el 14% no produjo halos de inhibición, el 75% fue capaz de inhibir alguna de las cepas indicadoras mediante el ELC SN y el 11% inhibió a través del ELC N (Figura 6).

*Figura 6: Halos de inhibición producidos por los ELC.*



Referencias: las flechas indican los halos de inhibición producidos por ELC sobre el microorganismo indicador.

Además, los resultados obtenidos permitieron determinar que *L. casei* DSPV, a diferencia del resto de las cepas, no fue afectada por ningún ELC (Tabla 4).

Tabla 4: Porcentaje de ELC que inhibieron a las cepas indicadoras

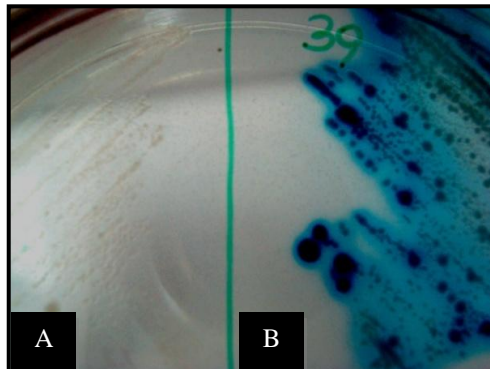
Cepas	ELC SN	ELC N
<i>L. casei</i> DSPV	0%	0%
<i>L. plantarum</i> DSPV	10%	5%
<i>E. faecium</i> DSPV	38%	1%
<i>L. acidophilus</i> DSPV	8%	1%
<i>E. coli</i> (247) DSPV	47%	1%
<i>P. aeruginosa</i> DSPV	42%	7%
<i>S. dublin</i> DSPV	43%	3%

Por su parte, *L. plantarum* DSPV resultó ser la bacteria que presentó mayor inhibición por parte de los ELC N. Las bacterias tapices Gram negativas demostraron ser más sensibles que las BAL a los ELC SN ya que *E. coli* DSPV, *S. dublin* DSPV y *P. aeruginosa* DSPV se vieron afectadas por el 47%, 43% y 42% respectivamente de los extractos con bajo pH.

#### –Producción de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ )

Esta prueba se realizó con las BAL que presentaron actividad inhibitoria en sus ELC N (6 aislamientos). Las mismas fueron incubadas en el medio específico para evaluar la producción de peróxidos (Figura 7) y luego de realizar la incubación se detectó que 4 microorganismos fueron positivos al ensayo, es decir, produjeron la sustancia coloreada indicativa de la producción de peróxidos. Por lo tanto las restantes dos BAL fueron señaladas como productoras presuntivas de bacteriocinas.



Figura 7: Detección de la producción de  $H_2O_2$ .

Referencias: A- microorganismo no productor, B- microorganismo productor.

#### –Producción de sustancias tipo bacteriocinas

El resultado obtenido luego del tratamiento enzimático con Proteinasa K de los ELC N de las 2 cepas presuntamente productoras de bacteriocinas (BAL DSPV 008SA y BAL DSPV 0027SA), fue la pérdida de poder inhibitorio frente a las cepas indicadores. Esto demostró el origen proteico confirmando la presencia de sustancias tipo bacteriocinas.

–Evaluación del espectro de inhibición de las BAL productoras de sustancias tipo bacteriocinas

Se realizó la prueba de inhibición en agar y se observaron diferencias entre los espectros de inhibición. Respecto a las cepas indicadoras de colección (Tabla 5), BAL DSPV 008SA solo fue capaz de inhibir a *P. aeruginosa* DSPV. BAL DSPV 0027SA, en contraposición no pudo inhibir a *P. aeruginosa* DSPV pero su espectro fue mayor ya que logró impedir el desarrollo de dos BAL y dos bacterias patógenas de la colección del DSP.

Tabla 5: Espectro de inhibición de las cepas productoras de sustancias tipo bacteriocinas

Cepas de colección DSPV	BAL DSPV 027SA	BAL DSPV 008SA
	ELC N	ELC N
<i>L. casei</i> DSPV	-	-
<i>L. acidophilus</i> DSPV	18mm	-
<i>L. plantarum</i> DSPV	10mm	-
<i>E. faecium</i> DSPV	-	-
<i>E. coli</i> DSPV	8mm	-
<i>P. aeruginosa</i> DSPV	-	9mm
<i>S. dublin</i> DSPV	8mm	-
Cepas autóctonas aisladas de sangre aviar de mataderos	BAL DSPV 027SA	BAL DSPV 008SA
	ELC N	ELC N
<i>E. coli</i> (SA)	-	-
<i>Salmonella</i> sp.(SA)	7mm	9mm
<i>P. aeruginosa</i> (SA)	8mm	8mm
<i>S. aureus</i> (SA)	-	-

Referencias: (mm) representa el diámetro del halo de inhibición incluyendo el hoyo (5mm) donde fue colocada la SI.

Por otra parte, las dos cepas productoras fueron capaces de inhibir a las mismas cepas autóctonas aisladas de sangre aviar de matadero (*P. aeruginosa* SA y *Salmonella* spp. SA).

2. b) Identificación genotípica de las BAL seleccionadas con base en la capacidad inhibitoria frente a las cepas indicadoras y A/P autóctonas.

Finalmente, las BAL seleccionadas fueron siete, las dos productoras de sustancias tipo bacteriocinas (BAL DSPV 027SA, BAL DSPV 008SA) y cinco que presentaron el espectro más amplio de inhibición frente a los microorganismos indicadores (BAL DSPV 032SA, BAL DSPV 033SA, BAL DSPV 034SA, BAL DSPV 035SA, BAL DSPV 036SA). De esta forma, estos microorganismos fueron sometidos a la identificación molecular y comparación con las secuencias del Genbank arrojando los siguientes resultados (Tabla 6):

Tabla 6: Resultados de la genotipificación de las BAL seleccionadas

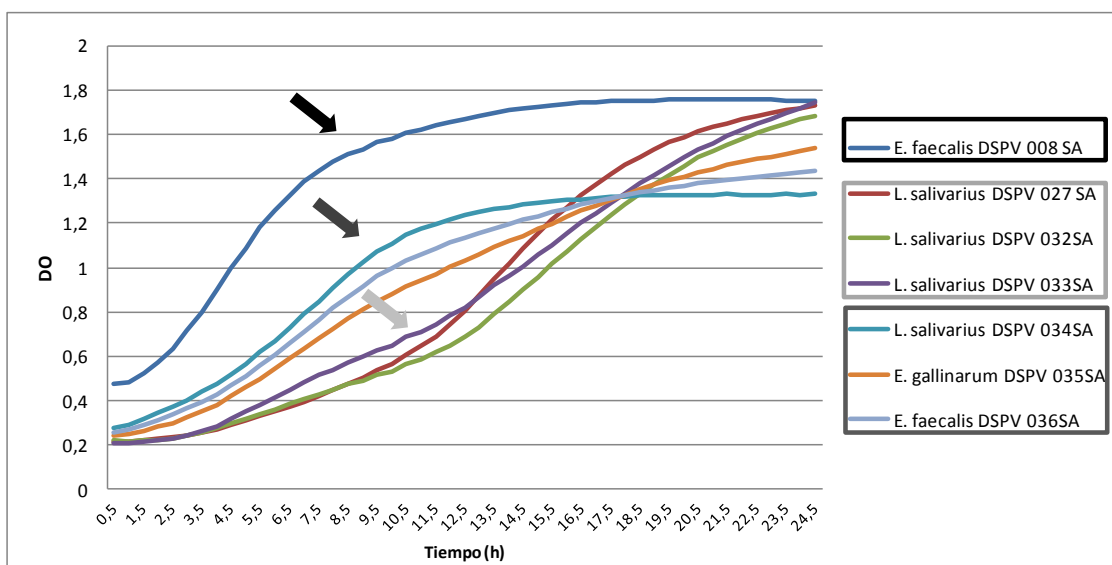
BAL	Bac <sup>+</sup>
<i>L. salivarius</i> DSPV 032SA	-
<i>L. salivarius</i> DSPV 033SA	-
<i>L. salivarius</i> DSPV 034SA	-
<i>E. gallinarum</i> DSPV 035SA	-
<i>E. faecalis</i> DSPV 036SA	-
<i>L. salivarius</i> DSPV 027SA	+
<i>E. faecalis</i> DSPV 008SA	+

Referencias: En la columna correspondiente a Bac<sup>+</sup> con el signo "+" se señalan las bacterias productoras de sustancias tipo bacteriocinas.

### 2. c) Estudio de la cinética de crecimiento de las BAL en caldo MRS

Para este ensayo se utilizaron las BAL descritas en la tabla 6. Los resultados obtenidos de DO fueron graficados con el objeto de evaluar el desarrollo microbiano (Figura 8). Las curvas obtenidas permitieron diferenciar claramente tres grupos, donde las fases de crecimiento fueron particulares para cada uno de ellos.

Figura 8: Curvas de crecimiento en MRS de las BAL seleccionadas

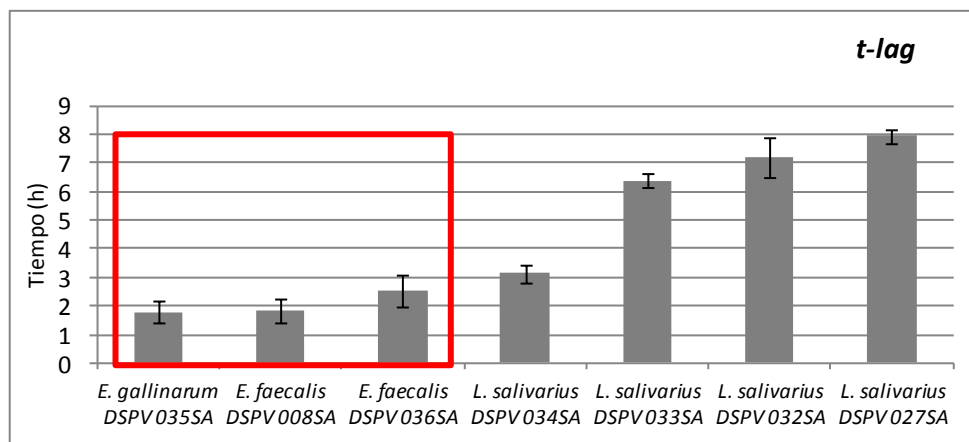


Referencias: las flechas indican 3 grupos definidos de desarrollo en los cuales se agrupan las bacterias evaluadas.

Se puede destacar principalmente que *E. faecalis* DSPV 008SA evidenció una adaptación y un desarrollo microbiano mayor que el resto. Asimismo, los *L. salivarius* DSPV 027SA, 032SA y 033SA también se adaptaron relativamente rápido al medio, pero el desarrollo final medido en DO fue menor que el tercer grupo, donde se observó exactamente lo contrario, ya que demoraron más en adaptarse para luego generar mayor DO al terminar el experimento.

Respecto a los parámetros microbianos evaluados, se observó que las bacterias pertenecientes al género *Enterococcus* presentaron una menor fase de latencia (t-lag), en promedio 2,06 h a diferencia de los *Lactobacillus* que fue de 6,15 h (Figura 9). Dentro de este último grupo sin embargo, el *L. salivarius* DSPV 034SA presentó una t-lag de 3,13 h la cual se asemejó más a los valores de los enterococos que a las especies de su mismo género.

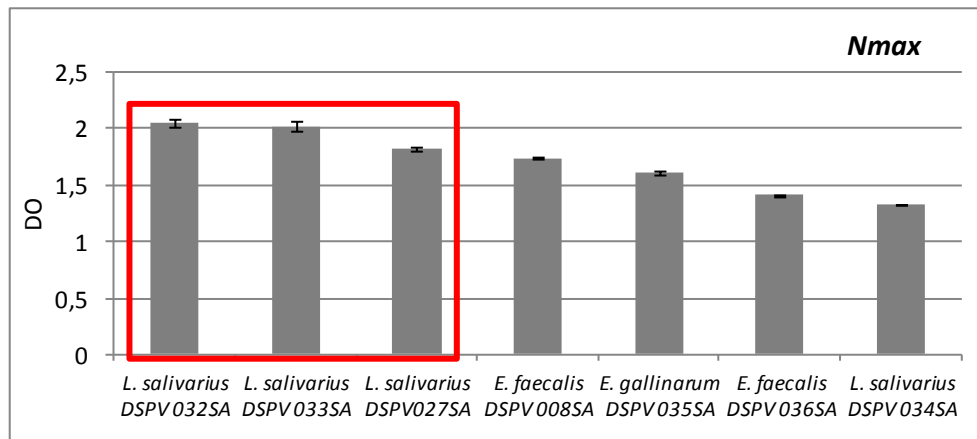
Figura 9: Fase de latencia de las cepas evaluadas



Referencias: el recuadro rojo indica las cepas con menor tiempo de latencia.

Sin embargo y en contraposición, los lactobacilos (excepto *L. salivarius* DSPV 034SA) tuvieron los valores más altos de células bacterianas al finalizar el ensayo (Figura 10). Esto indica que el desarrollo bacteriano final fue mayor en este género a comparación de los enterococos.

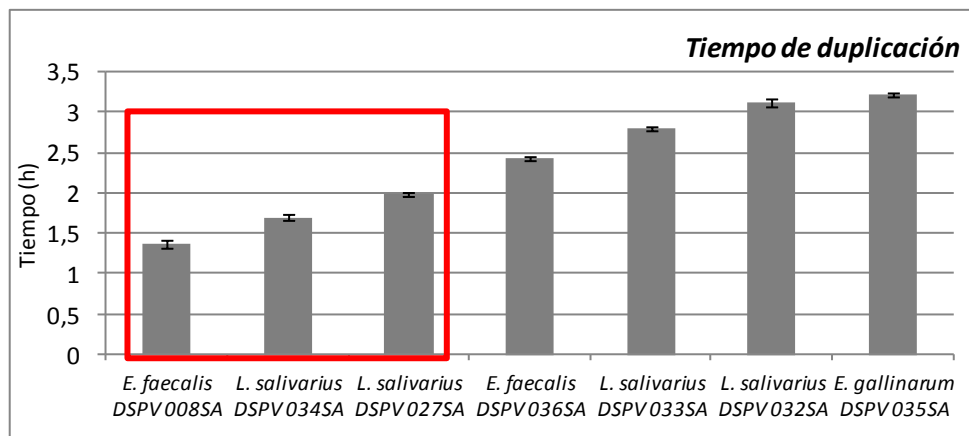
Figura 10: Densidad final de células bacterianas



Referencias: el recuadro rojo indica las cepas con mayor Nmax.

Con respecto al tiempo de duplicación (t-d) los resultados reflejaron (Figura 11) que *E. faecalis* DSPV 008SA, *L. salivarius* DSPV 034SA y *L. salivarius* DSPV 027SA demoraron 2 h o menos para aumentar su biomasa al doble.

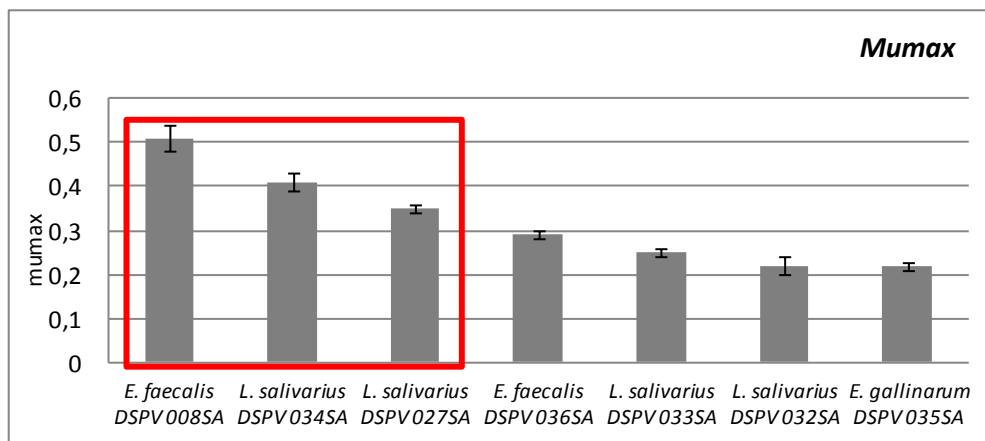
Figura 11: Tiempo de duplicación de las cepas evaluadas



Referencias: el recuadro rojo indica las cepas con menor tiempo de duplicación.

Asimismo, estas tres cepas fueron las que presentaron la tasa máxima específica de crecimiento (Mumax) (Figura 12). El resto de los microorganismos mostraron valores cercanos a la mitad de lo alcanzado por *E. faecalis* DSPV 008SA que fue la bacteria con la mayor tasa de desarrollo.

Figura 12: Tasa máxima de crecimiento de las cepas evaluadas



Referencias: el recuadro rojo indica las cepas con mayor Mumax.

2. d) Evaluación de la termosensibilidad de las BAL seleccionadas para conformar el sistema de biopreservación.

Las bacterias evaluadas presentaron distintos grados de sensibilidad a las temperaturas estudiadas (Tabla 7).

Tabla 7: Evaluación de la sensibilidad de las cepas luego de la exposición a diferentes temperaturas y tiempos

Cepas	Temperatura y tiempos								
	22°C			55°C			65°C		
	7.5 min	15 min	30 min	7.5 min	15 min	30 min	7.5 min	15 min	30 min
<i>L. salivarius</i> DSPV 032SA	+	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>L. salivarius</i> DSPV 033SA	+	+	+	+	+	-	-	-	-
<i>L. salivarius</i> DSPV 034SA	+	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>E. gallinarum</i> DSPV 035SA	+	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>E. faecalis</i> DSPV 036SA	+	+	+	+	+	+	+	-	-
<i>L. salivarius</i> DSPV 027SA	+	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>E. faecalis</i> DSPV 008SA	+	+	+	+	+	+	-	-	-

Referencias: El signo (+) indica que la bacteria pudo desarrollarse luego del tratamiento. El signo (-) indica ausencia de crecimiento.

Capítulo II  
Resultados

Todas las cepas, a excepción de *L. salivarius* DSPV 033SA, crecieron luego del tratamiento a 55 °C en todos los tiempos evaluados, pero ninguna excepto *E. faecalis* DSPV 036SA pudo desarrollarse luego de la exposición a 65 °C durante 7,5 min.

## ***Discusión***

Las bacterias ácido lácticas son las candidatas ideales para conformar cultivos biopreservadores. Existen diversas formas de seleccionar bacterias para conformar un cultivo de este tipo, así los mismos pueden estar constituidos por una o múltiples cepas. Para ello, es de suma importancia conocer características de las cepas a utilizar que se relacionen con la preservación del alimento como por ejemplo la inhibición de bacterias A/P presentes en el mismo. Por esto, en este trabajo se evaluó la capacidad de las BAL de producir sustancias inhibitorias con impacto directo sobre las poblaciones no deseadas.

Si bien se conoce que las BAL pueden inhibir a otras bacterias mediante diferentes mecanismos (competencia por nutrientes, producción de ácidos orgánicos, producción de peróxido de hidrógeno y bacteriocinas) (Bredholt y col., 1999; Devlieghere y col., 2004; Vermeiren y col., 2004), algunos de ellos pueden impactar de manera negativa sobre las características sensoriales del alimento.

La mayoría de las BAL analizadas fueron capaces de inhibir a más de una cepa indicadora mediante la producción de ácidos orgánicos (ELC SN). Sobre esta característica ampliamente estudiada (Axelsson, 1990; Piard y Desmazeaud, 1991; De Vuyst y Vandamme, 1994) es importante tener en cuenta que dichos ácidos provocan un descenso marcado del pH lo cual puede afectar directamente la conformación de las proteínas (Signorini y col., 2006; Dávila y col., 2007). Como se ha mencionado previamente, la sangre es un compuesto rico en proteínas, por lo cual un exceso de ácidos podría hacer descender el pH hasta valores cercanos al punto isoeléctrico de las mismas, causando efectos indeseados como la coagulación de las proteínas. Por lo tanto, el manejo de la acidez causada por las BAL es de suma importancia para la aplicación de las mismas en este sustrato.

Posteriormente, se estudiaron los aislamientos que produjeron inhibición mediante su ELC neutralizado. Esto indicó que dichas bacterias podían afectar a los microorganismos indeseados mediante la liberación de peróxido de hidrógeno o alguna sustancia tipo bacteriocina. De esta forma, se detectó que un bajo porcentaje de los aislamientos eran



productores de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Si bien se estudió ampliamente el efecto negativo que tiene esta sustancia sobre algunos microorganismos patógenos (Eschenbach y col., 1989; Lindgren y Dobrogosz., 1990; Klebanoff y col., 1991) también se reportó el impacto sobre las características organolépticas de los alimentos (Min y Ahn, 2005; Signorini y col., 2006).

El peróxido de hidrógeno es capaz de interferir en las propiedades sensoriales de los productos cárnicos mediante el aumento de la rancidez y cambio de color del producto final. La interacción de la mioglobina con el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> genera cambios oxidativos en el grupo hemo, transformándola en metamioglobina la cual es responsable de los cambios de color de los productos cárnicos (de rojo a marrón oscuro), contribuyendo además a la oxidación de los lípidos (Min y Ahn, 2005; Signorini y col., 2006). Estos mismos efectos pueden observarse en la sangre obtenida en mataderos, principalmente el cambio de color, por lo cual sería necesario evaluar las ventajas y desventajas de la bacteria productora de esta sustancia antes de utilizarla en el SB. Una opción propuesta que permite aprovechar la inhibición de los H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> controlando los efectos indeseados (Kołożyn Krajewskaa y Dolatowski, 2012) es la utilización de un antioxidante junto a la cepa productora.

Asimismo, en este trabajo se buscaron cepas capaces de inhibir mediante sustancias de tipo bacteriocinas. En este sentido, se identificaron dos aislamientos productores: *E. faecalis* DSPV008 y *L. salivarius* DSPV027. Las especies del género *Enterococcus* han sido ampliamente estudiadas en este sentido. Las más importantes son *E. faecium* y *E. faecalis* (Klein, 2003) y, si bien han sido evaluadas en diferentes productos alimenticios, su uso está siendo cuestionado por la detección de cepas productoras de endocarditis, septicemia e infecciones del tracto urinario (Franz y col., 1999; Kayser, 2003).

Los enterococos producen distintos tipos de bacteriocinas clasificadas en cuatro grupos (Franz y col., 2007) y se caracterizan por poseer efectos inhibitorios sobre microorganismos relacionados genéticamente y además sobre bacterias gram positivas A/P de los alimentos (Cotter y col, 2005). En este sentido, la cepa aislada desde sangre *E. faecalis* DSPV008 demostró capacidad inhibitoria sobre *P. aeruginosa* DSPV, *P. aeruginosa* SA y *Salmonella* spp. SA. Estos resultados la postulan como candidata a conformar el SB de sangre aviar de matadero ya que las bacterias a las cuales controla son

reconocidos A/P de los alimentos.

La producción de bacteriocinas por *L. salivarius* ha sido reportada previamente. Por ejemplo, ABP 118 producida por *L. salivarius* subsp. *salivarius* UCC118 aislado desde la región ileocecal del tracto gastrointestinal humano (Flynn y col., 2002), salivaricina P producida por *Lb. salivarius* DPC6005 aislado desde el intestino porcino con actividad anti-listeria (Barrett y col., 2007) y salivaricina CRL 1328 producida por *L. salivarius* 1328 aislado desde la vagina humana (Vera Pingitore y col., 2009). Sin embargo, ninguna de éstas demostró tener actividad contra bacterias Gram negativas.

Estudios recientes detectaron cepas de *L. salivarius* aisladas desde el sistema gastrointestinal de pollos las cuales producen bacteriocinas con capacidad de inhibir *Campylobacter* termotolerantes. Estas fueron OR-7 producida por *L. salivarius* 101 NRRL B-30514 y L-1077 producida por *L. salivarius* 1077 (NRRL B-50053) (Stern y col., 2006). Recientemente, Svetoch y col. (2011) demostraron que la inoculación de la bacteriocina L-1077 en pollos infectados con *C. jejuni* y *S. enteritidis* logró disminuir en más de 4 decimales el número de estas bacterias por gramo del contenido cecal comparado con los controles.

Asimismo, otra bacteriocina producida por *L. salivarius* SMXD51 (Messaoudi y col., 2012) demostró capacidad de inhibir varios patógenos como *L. monocytogenes*, *S. aureus* y *Salmonella* sin afectar microorganismos relacionados genéticamente (BAL). En este sentido, *L. salivarius* DSPV 027 aislado desde sangre aviar obtenida en mataderos también demostró capacidad de inhibir bacterias A/P como *E. coli* DSPV, *S. Dublin* DSPV *Salmonella* SA y *P. aeruginosa* SA. Sin embargo, cuando se evaluó el efecto de esta cepa sobre las otras BAL se observó que inhibía a la mitad de las bacterias estudiadas indicando que dicho efecto puede impactar también sobre la microbiota benéfica.

Otra propiedad importante a tener en cuenta en la elección de cepas para conformar el SB es la capacidad de adaptarse y desarrollarse adecuadamente en el medio de cultivo (Holzapfel y col., 1995). Por esto, el estudio de los parámetros de crecimiento microbiano permitieron seleccionar microorganismos con capacidad de adaptarse rápidamente al medio de cultivo y que al final del tiempo evaluado generaron un alto número de bacterias.

En este sentido, las cepas evaluadas por sus parámetros de crecimiento bacteriano pudieron dividirse en grupos los cuales presentaron características diferentes. En general, los enterococos fueron los que se adaptaron mucho más rápido al medio y su fase lag fue considerablemente menor a la de los lactobacilos. Sin embargo, estos últimos fueron los que mayor biomasa generaron al final del tiempo evaluado. Es importante aclarar que la temperatura de incubación de las bacterias fue de 30°C, elegida estratégicamente para luego poder utilizar el SB en los mataderos de la zona que no cuentan con sistemas refrigerados para el almacenamiento y conservación de sangre.

Los enterococos y los lactobacilos crecen de forma óptima a 37 °C, aunque la mayoría de las especies puede hacerlo en un rango de 10 a 45 °C (Abriouel y col., 2008). Esto indicaría que las diferencias observadas entre estos dos géneros permitirían combinarlos en un mismo SB con el objeto de complementar su desarrollo microbiano y efectos.

Por otro lado, la sensibilidad de las BAL a las altas temperaturas es un factor sumamente importante que determina la supervivencia a diferentes técnicas de conservación en la industria alimentaria. Es ejemplo de lo anterior la deshidratación de la sangre mediante el secado por spray donde ocurre el contacto de las bacterias con altas temperaturas (Meng y col., 2008; Simpson y col., 2005).

Previamente se han reportado BAL con capacidad de tolerar temperaturas de hasta 55 °C (Gouesbet y col., 2001; Christiansen y col., 2006). Sin embargo, Zamora Rodriguez (2006) demostró que los efectos de las altas temperaturas varían dependiendo la cepa en estudio, detectando que luego de someter a *L. garviae* a un proceso de secado por spray la misma presentó el 100% de células viables a diferencia de dos cepas de la misma especie donde la recuperación fue tan solo del 4%. A su vez, estos resultados coincidieron con las investigaciones realizadas por Lian y col. (2002) y Carvalho y col. (2002, 2004), donde reportaron que bajo condiciones comparables, distintas cepas de la misma especie se comportaron diferentes luego del tratamiento de secado por spray.

En este ensayo, se determinó que las cepas evaluadas perdieron la totalidad de su viabilidad luego de ser sometidas a temperaturas de 65 °C. Solo *E. faecalis* DSPV 036

Capítulo II  
Discusión

mantuvo células viables luego de 7,5 min a esta temperatura. De acuerdo a lo mencionado anteriormente y a los resultados hallados, las bacterias previamente seleccionadas en este trabajo fueron sensibles a las temperaturas evaluadas. En esta tesis, las bacterias a añadir a la sangre solo tienen como objetivo preservar el producto antes de su procesamiento y el interés de evaluar su termosensibilidad radica en evitar que las mismas sobrevivan a los tratamientos con altas temperaturas asegurando de esta manera la pérdida de viabilidad luego del procesamiento en la industria procesadora de sangre.

### *Conclusiones parciales*

✓ Se detectó que 75% de las BAL fueron capaces de inhibir a los microorganismos indicadores mediante ácidos orgánicos, solo el 10% lo hizo a través de la producción de peróxido de hidrógeno y únicamente dos bacterias produjeron sustancias de tipo bacteriocinas

✓ Siete BAL fueron pre-seleccionadas con base en: a) producción de bacteriocinas y b) amplio espectro de inhibición mediante la producción de ácidos orgánicos. Las mismas fueron identificadas genéticamente: cuatro correspondieron a la especie *L. salivarius*, dos a *E. faecalis* y una a *E. gallinarum*.

✓ Los parámetros de crecimiento de las BAL seleccionadas demostraron que existen diferencias entre las especies, presentando menor tiempo de latencia los *E. faecalis* en general, pero los Lactobacilos generan mayor biomasa al finalizar el ensayo

✓ Todas las BAL seleccionadas fueron sensibles a la temperatura de 65°C, excepto *E. faecalis* DSPV 036SA que mantuvo su viabilidad luego de 7 min y 5 segundos bajo esa condición.

## **CAPÍTULO III**

**Capítulo III***Objetivo específico a alcanzar*

3- Seleccionar aditivos para incluir al SB y evaluar el efecto de los mismos frente a las BAL elegidas y a los microorganismos A/P autóctonos.

- a) Determinar el efecto de diferentes concentraciones de aditivos inhibidores frente las bacterias A/P autóctonas.
- b) Estudiar el efecto de los aditivos y concentraciones seleccionadas previamente sobre las BAL y la población alterante/patógena.

En esta sección de la tesis, se evalúan diferentes aditivos a agregar en sangre y el impacto de los mismos sobre las BAL y las bacterias A/P. Para ello se evaluaron sustancias inhibidoras de los microorganismos A/P y luego se analizó el efecto de aditivos sobre el desarrollo de las BAL. El principal objetivo fue lograr que las BAL se adapten con mayor velocidad durante las primeras horas tras la inoculación de la sangre, evitando o retrasando el crecimiento de las bacterias A/P.

Finalmente, el sistema de biopreservación fue conformado a partir de las BAL con mejores parámetros de crecimiento microbianos en la sangre con una combinación de aditivos que afectó principalmente el desarrollo de las bacterias A/P.

**Capítulo III***Materiales y métodos***3) Selección de aditivos a evaluar para luego incorporarlos al SB**

Los aditivos estudiados para mejorar el desarrollo de las BAL fueron sustancias nutritivas, específicamente lactosa y extracto de levadura. Además se utilizaron otros elementos seleccionados con base en el efecto inhibitorio que podrían ejercer sobre la población A/P autóctona. Para la elección de los mismos se tuvieron en cuenta inhibidores clásicos de las enterobacterias y además la composición del medio de cultivo MRS, ya que se consideró que éste es selectivo para las BAL lo que permite realizar aislamientos a partir de una muestra compleja. Primero se evaluaron los inhibidores de los A/P y luego en conjunto con los demás aditivos.

**3. a) Evaluación del efecto de los aditivos inhibidores seleccionados frente a los A/P en medio BHI.**

Se evaluaron dos sustancias: cloruro de sodio (NaCl) y citrato de amonio (CA). El primero de ellos fue elegido por su reconocida actividad inhibitoria sobre las enterobacterias y su efecto fue evaluado a una concentración de 1% p/v. El otro aditivo fue elegido con base en su uso en el medio de cultivo MRS como inhibidor de la flora Gram negativa. En este caso (CA), se evaluaron dos concentraciones: 0,2% y 0,4% p/v.

Nuevamente, fue utilizado el lector de microplacas Bioscreen<sup>®</sup> sembrando cada pocillo de la misma manera que fue descrito anteriormente (350 µl de caldo BHI inoculado al 1% con cultivos frescos de 18 h de cada una de las bacterias A/P autóctonas). Previo a la siembra de la placa, el caldo BHI estéril fue dividido en 4 tubos, de los cuales uno fue utilizado como control de crecimiento, a otro se le agregó 1% de NaCl, a otro 0,2% de CA y al último 0,4% de CA. De esta forma, los aditivos fueron evaluados por separado. La incubación se realizó durante 24 h a 30 °C. Las lecturas se realizaron a 600 nm de Abs cada 30 min con agitación previa. Las muestras fueron procesadas por triplicado.



### Capítulo III

#### Materiales y métodos

Para evaluar los resultados se tuvieron en cuenta los valores de DO, se calculó la diferencia entre el valor inicial y valor final de cada tratamiento aplicado a cada una de las bacterias. Se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) y en caso de hallar diferencias significativas se empleó la prueba de Duncan como test de comparaciones múltiples. El objeto de este análisis fue detectar diferencias entre los tratamientos con los aditivos respecto al control para determinar cual generó mayor impacto sobre las bacterias A/P.

Posteriormente, los valores (DO) de las curvas de crecimiento fueron analizados mediante el soporte informático MicroFit<sup>®</sup> con el objetivo de determinar qué fases del desarrollo microbiano fueron afectadas por el agregado de los aditivos.

*3. b) Evaluación del efecto de los aditivos seleccionados y sus combinaciones frente al desarrollo de las BAL y de los A/P en suero equino estéril.*

Una vez evaluado el efecto de los aditivos inhibidores testeados frente a los A/P se procedió a la evaluación en conjunto con las sustancias seleccionadas para mejorar el desarrollo de las BAL en sangre. Para esto último, se utilizó extracto de levadura y lactosa bacteriológica.

De esta forma, los aditivos y concentraciones evaluadas fueron: lactosa (0%, 1% y 2%), extracto de levadura (0% y 0,4%), NaCl (0% y 1%) y citrato de amonio (0% y 0,4%). Se realizaron todas las combinaciones posibles (24 totales) para evaluar la existencia de un factor y/o nivel que favorezca el desarrollo de las BAL y reduzca el desarrollo de los microorganismos A/P.

Por lo tanto, para este ensayo se prepararon 24 tubos con 15 ml de suero equino estéril a los cuales se les agregaron los aditivos en las diferentes combinaciones. En este ensayo se utilizó suero en vez de sangre entera debido a que las curvas de crecimiento para evaluar el efecto de las sustancias añadidas se realizaron mediante el equipo automatizado Bioscreen<sup>®</sup>, el cual no fue capaz de detectar DO en muestras de sangre entera. Además, se utilizó suero equino estéril porque para realizar las repeticiones necesarias para los test estadísticos fue necesario contar con un volumen inicial importante. En el caso de las aves,

### **Capítulo III**

#### **Materiales y métodos**

es imposible contar con una cantidad suficiente de sangre estéril que permita realizar este tipo de ensayo.

Las bacterias utilizadas fueron las BAL seleccionadas en el capítulo II (Tabla 6) y las cepas A/P autóctonas aisladas desde sangre aviar de matadero (Tabla 3). Las condiciones de siembra e incubación fueron iguales a las mencionadas en el punto anterior con la salvedad de que los 350  $\mu$ l correspondieron a cada uno de los 24 tratamientos. Las lecturas (DO, 600nm) se realizaron cada 30 min durante 24 h con agitación previa. Cada una de las muestras se evaluó por triplicado.

Los valores de DO obtenidos a lo largo del ensayo fueron utilizados para construir las curvas de crecimiento. Además, teniendo en cuenta estos datos de DO, se obtuvo la diferencia entre el valor inicial ( $V_i$ ) y valor final ( $V_f$ ) de cada tratamiento aplicado a cada una de las bacterias. Esta diferencia se utilizó para realizar comparaciones entre los tratamientos aplicados sobre las bacterias con el objeto de determinar qué factor o nivel resultó beneficiar el desarrollo de las BAL e inhibir en algún grado a las cepas de bacterias A/P. Las comparaciones fueron realizadas mediante pruebas estadísticas (ANOVA, Test de Duncan) utilizando el programa InfoStat<sup>®</sup> (UNC).

Por otro lado, los valores obtenidos de las curvas de crecimiento (DO) de cada microorganismo con sus 24 tratamientos fueron evaluados mediante la aplicación informática (MicroFit<sup>®</sup>).

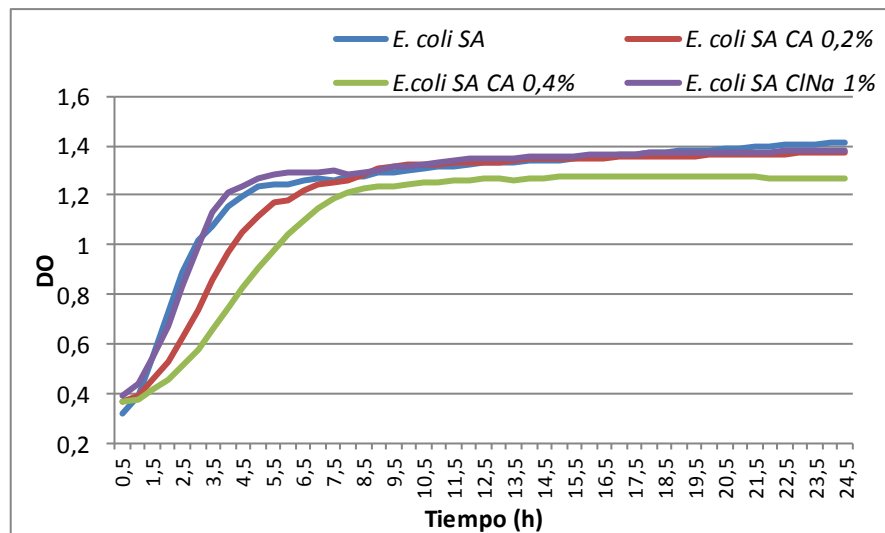
## Resultados

3. a) Evaluación del efecto de los aditivos inhibidores seleccionados frente a los A/P en medio BHI.

De manera general y considerando todos los tratamientos analizados se observó que la adición de CA al 0,4% fue el aditivo que mayor impacto generó sobre el desarrollo de este grupo de bacterias ( $p < 0,05$ ). Sin embargo, cada microorganismo respondió de manera diferente.

Para el caso particular de *E. coli* SA, al evaluar la DO final menos la DO inicial, se detectó que los dos inhibidores utilizados afectaron el desarrollo de la bacteria ( $p < 0,05$ ) siendo CA 0,4% el que impactó en mayor medida (Figura 13).

Figura 13: Desarrollo de *E. coli* SA en caldo BHI con aditivos



Referencia: DO indica el valor de densidad óptica medida a 600nm.

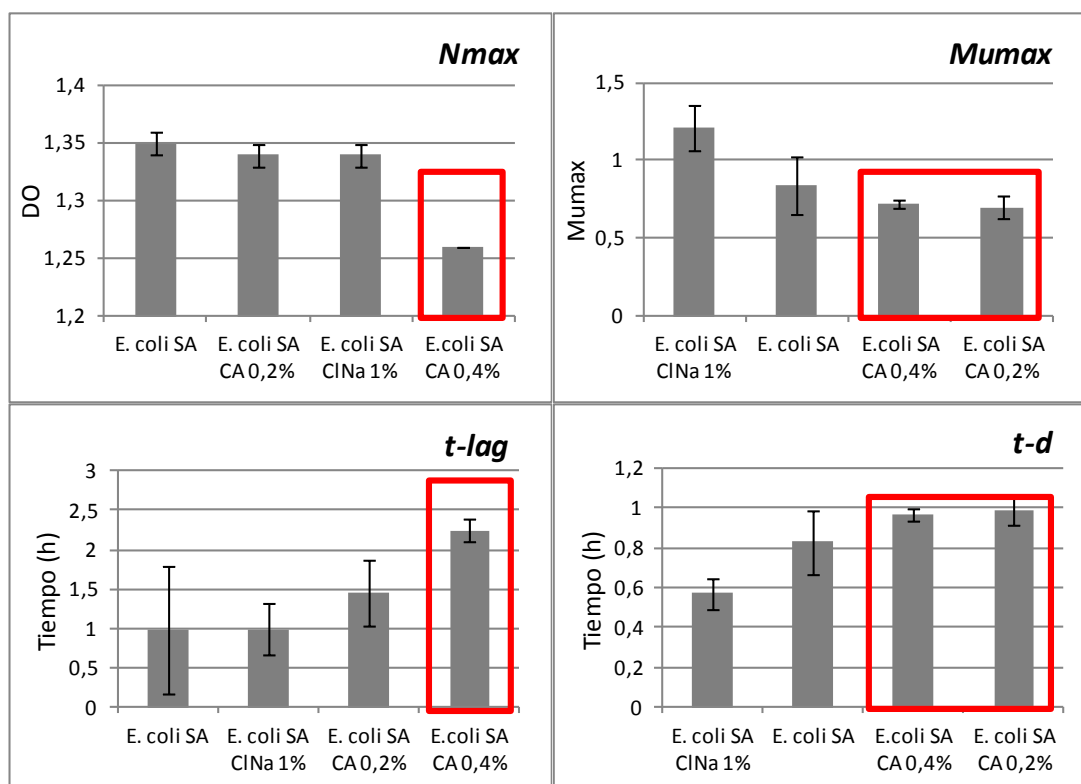
Teniendo en cuenta los parámetros microbianos analizados (Figura 14), únicamente la adición de NaCl 1% no afectó la t-lag de este microorganismo, comportándose de la misma manera que en el caldo BHI sin la adición de los aditivos. Además, la adición de

### Capítulo III

#### Resultados

NaCl al 1% generó que la tasa de crecimiento ( $M_{\text{umax}}$ ) fuera mayor y el tiempo de duplicación menor ( $t-d$ ) en este tratamiento respecto a *E. coli* SA en caldo sin aditivos, favoreciendo de esta forma el desarrollo del mismo.

Figura 14: Efecto de los aditivos sobre los parámetros de crecimiento de *E. coli* SA



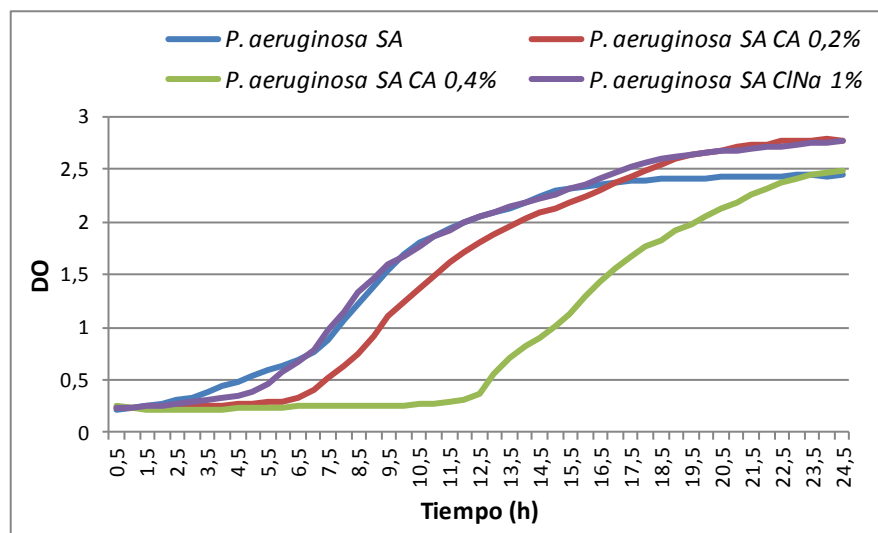
Referencias: el recuadro rojo indica el o los aditivo/s con mayor impacto en la fase de desarrollo microbiano evaluada.

Como se observa en la figura anterior mediante los recuadros rojos, la adición de CA 0,4% afectó todas las fases de crecimiento de *E. coli* SA retrasando el desarrollo de la misma. En este caso, la  $M_{\text{umax}}$  fue menor con el agregado del aditivo, lo que generó que la densidad total de células ( $N_{\text{max}}$ ) al finalizar el ensayo fuera de un punto logarítmico menos que en el tratamiento sin los aditivos. Además, la fase de latencia ( $t\text{-lag}$ ) se duplicó por la adición de dicha sustancia lo que también afectó el tiempo de duplicación de la bacteria a casi el doble.

### Capítulo III Resultados

Analizando lo ocurrido con *P. aeruginosa* SA y teniendo en cuenta la diferencia de DO final menos la inicial, todos los tratamientos fueron diferentes ( $p < 0,05$ ) con respecto al control (Figura 15).

Figura 15: Desarrollo de *P. aeruginosa* SA en caldo BHI con aditivos



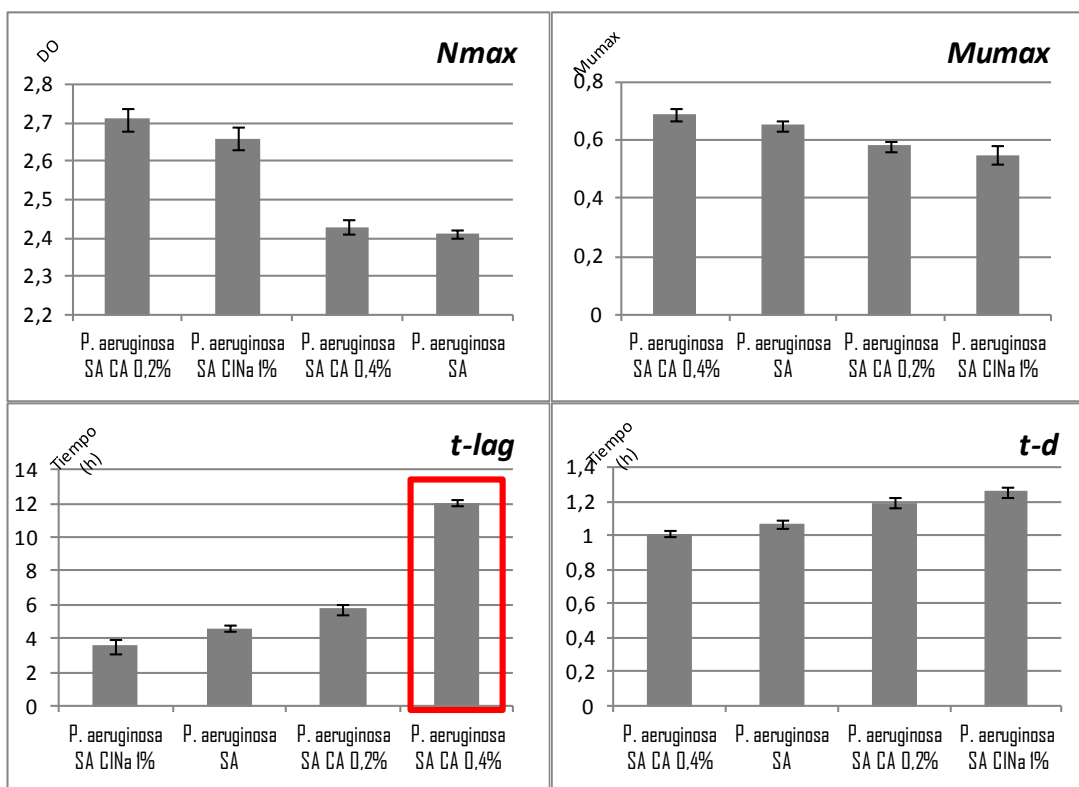
Referencia: DO indica el valor de densidad óptica medida a 600nm.

Sin embargo, evaluando los parámetros de crecimiento se pudo corroborar que tanto los valores de  $N_{max}$  como  $M_{umax}$  fueron mayores o similares entre la bacteria en BHI y la misma con la adición de los aditivos, sugiriendo que algunas de estas sustancias mejoraron estos parámetros. Asimismo, ninguno de los aditivos logró afectar de manera significativa el tiempo de duplicación bacteriana.

Como punto destacable, el parámetro microbiano de crecimiento que se vio considerablemente afectado en *P. aeruginosa* SA fue la principalmente luego de la adición de CA 0,4% ya que pasó de 4,6 h a 12,1 h, triplicando de esta forma el tiempo de adaptación al medio con dicho aditivo (Figura 16).

### Capítulo III Resultados

Figura 16: Efecto de los aditivos sobre los parámetros de crecimiento de *P. aeruginosa* SA

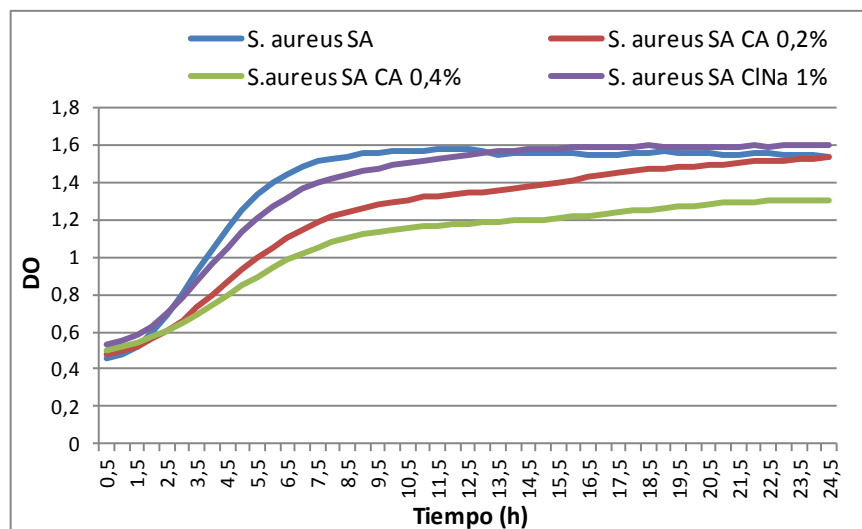


Referencias: el recuadro rojo indica el o los aditivo/s con mayor impacto en la fase de desarrollo microbiano evaluada.

Respecto a *S. aureus* SA los resultados obtenidos de la diferencia de DO final e inicial arrojaron como resultados que únicamente la adición de CA al 0,4% afectó de manera significativa ( $p < 0,05$ ) a esta bacteria respecto a los demás tratamientos (Figura 17).

### Capítulo III Resultados

Figura 17: Desarrollo de *S. aureus* SA en caldo BHI con aditivos



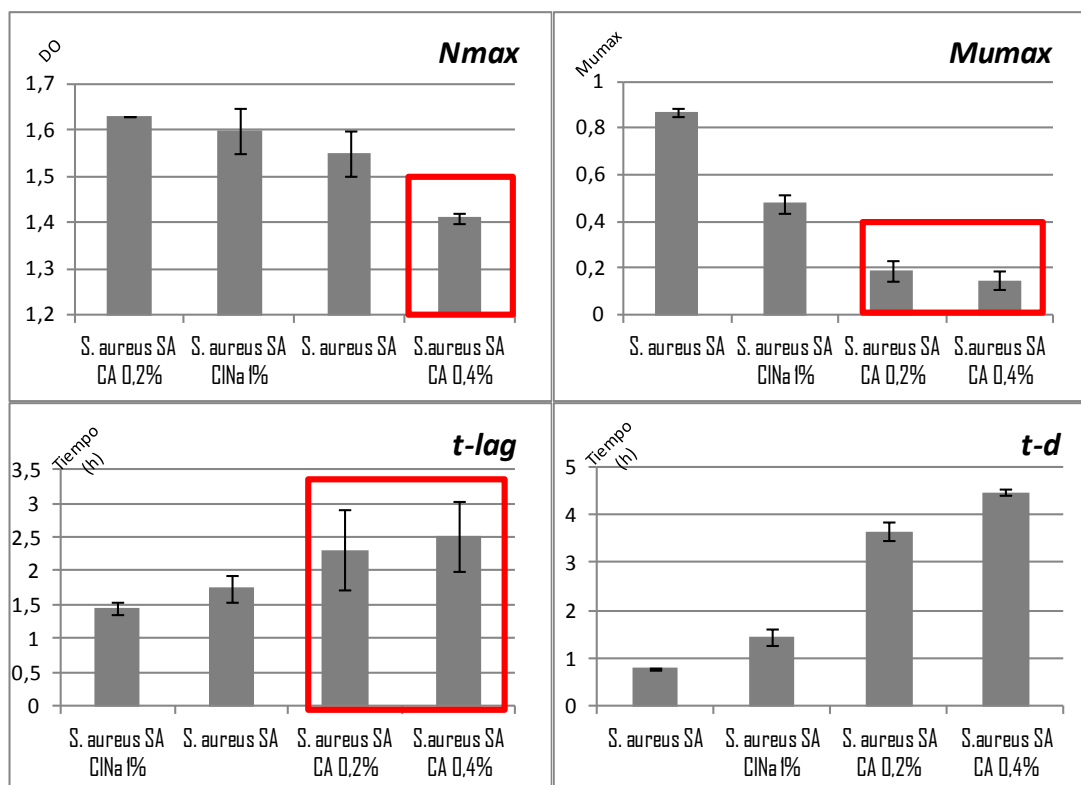
Referencia: DO indica el valor de densidad óptica medida a 600nm.

Analizando particularmente las fases del desarrollo microbiano (Figura 18), la densidad máxima bacteriana se vio afectada por todos los tratamientos, resultando la adición de CA 0,4% el aditivo que generó menor crecimiento final ( $p < 0,05$ ).

Respecto a la tasa de desarrollo (Mumax), se observó que las concentraciones de CA afectaron de manera similar a la bacteria disminuyendo cuatro veces dicho parámetro comparado con el microorganismo sin la sustancia. Asimismo, el NaCl al 1% también afectó la tasa provocando una disminución del desarrollo de la bacteria. Con respecto a la fase de latencia (t-lag) ocurrió lo mismo, el agregado de CA afectó de manera importante este parámetro aumentando la fase de latencia en promedio de 1,6 h a 2,4 h respecto al resto de los tratamientos. Sin embargo, el tiempo de duplicación de esta bacteria solo aumentó con el agregado de los aditivos.

### Capítulo III Resultados

Figura 18: Efecto de los aditivos sobre los parámetros de crecimiento de *S. aureus* SA



Referencias: el recuadro rojo indica el o los aditivo/s con mayor impacto en la fase de desarrollo microbiano evaluada.

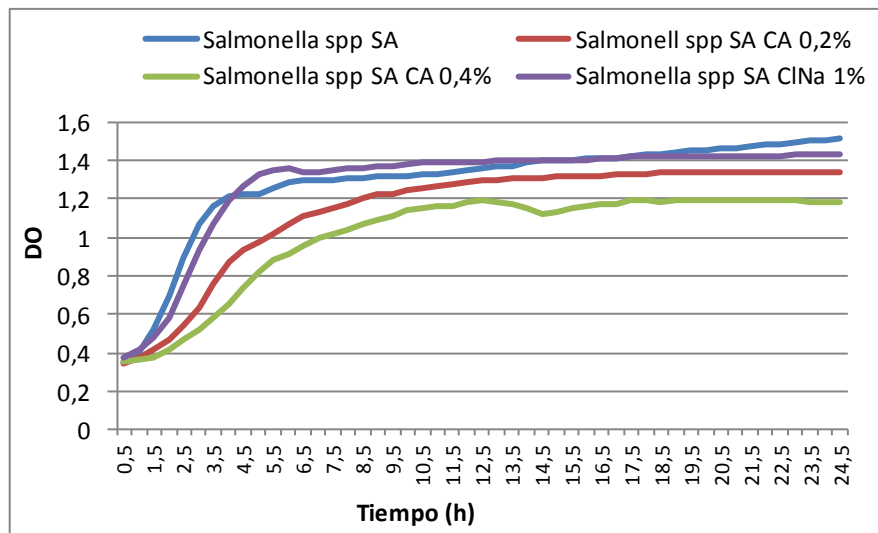
La última bacteria estudiada fue *Salmonella* spp. SA. En este caso también se encontraron diferencias significativas cuando se evaluó la diferencia de DO final versus la inicial. Todos los tratamientos afectaron el desarrollo de esta bacteria ( $p < 0,05$ ) siendo CA 0,4% el que causó menor crecimiento seguido por CA al 0,2% y por último la adición de NaCl 1% (Figura 19).



### Capítulo III

### Resultados

Figura 19: Desarrollo de *Salmonella* spp. SA en caldo BHI con aditivos



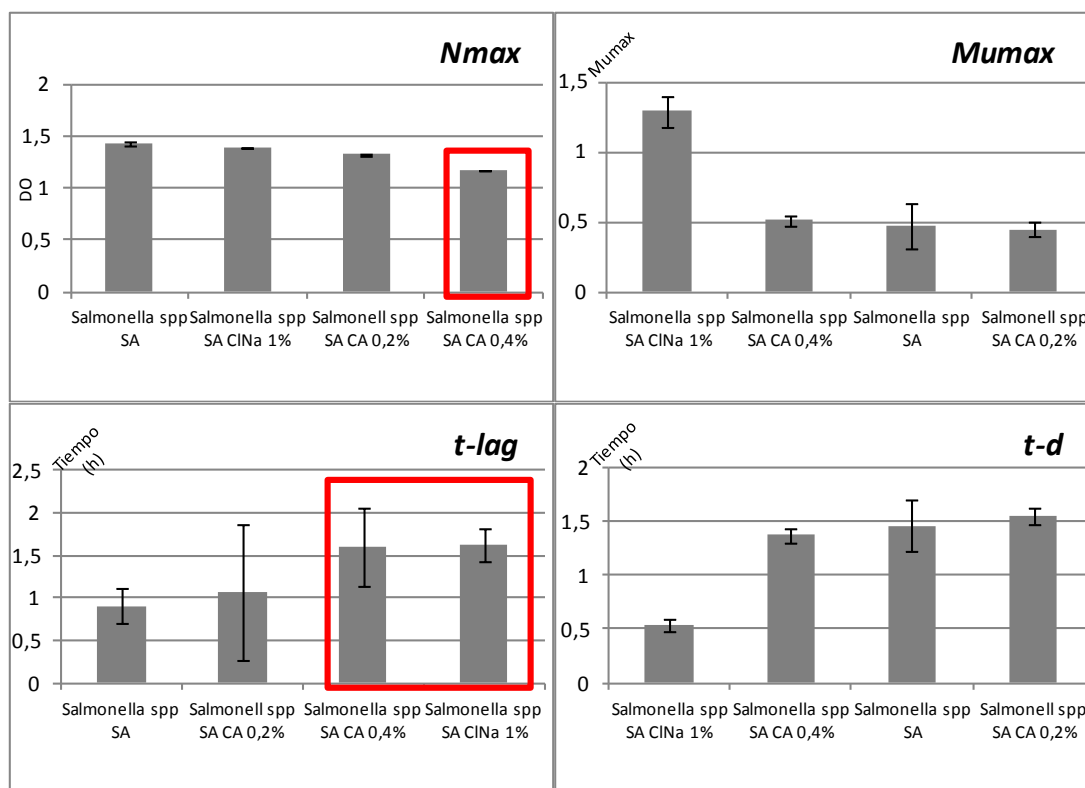
Referencia: DO indica el valor de densidad óptica medida a 600nm.

Analizando los parámetros de crecimiento microbiano en detalle, los tratamientos generaron diferentes efectos sobre  $N_{max}$ ,  $M_{umax}$  y  $t-d$ . Sin embargo, observando detenidamente la Figura 20, solo en el caso de la densidad total de células se evidencia que CA 0,4% es el aditivo que impactó en mayor medida, reduciendo 0,26 puntos de DO respecto a la bacteria sin sustancias añadidas.

### Capítulo III Resultados

Figura 20: Efecto de los aditivos sobre los parámetros de crecimiento de *Salmonella* spp.

SA



Referencias: el recuadro rojo indica el o los aditivo/s con mayor impacto en la fase de desarrollo microbiano evaluada.

Respecto a la fase de latencia, el agregado de CA 0,4% y NaCl 1% lograron que esta etapa de adaptación al medio pasara de, en promedio, 0,9 h a 1,6 h. Por su parte, el agregado de CA 0,2% afectó en menor medida esta etapa bacteriana (solo la demoró 0,1 h).

3. b) *Evaluación del efecto de los aditivos seleccionados y sus combinaciones frente al desarrollo de las BAL y de los A/P en suero equino estéril.*

De modo general, fue posible establecer que las BAL se vieron afectadas en alguna medida por el citrato de amonio y por el cloruro de sodio en forma independiente y así como por la interacción de ambos. Asimismo, hubo tres de las BAL seleccionadas (*L. salivarius* DSPV 033SA, *L. salivarius* DSPV 034SA y *E. gallinarum* DSPV 035SA) que

### Capítulo III

#### Resultados

no generaron curvas de crecimiento en suero equino con los aditivos seleccionados, por lo cual fueron descartadas para conformar el SB.

Respecto al NaCl, las BAL presentaron menor crecimiento en los grupos que contenían este aditivo ( $p < 0,05$ ). Por otro lado, el agregado de lactosa sobre las BAL no produjo diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre los grupos. No obstante, los valores de DO obtenidos fueron más altos en los tratamientos que poseían lactosa al 2%.

También se evaluó el efecto del extracto de levadura, no encontrándose diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre los tratamientos aplicados al grupo de las BAL y a los A/P. A diferencia de los anterior, el citrato de amonio presentó diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los tratamientos que lo poseían y los que no, afectando de manera negativa la adición de dicha sustancia el desarrollo tanto de las BAL como de los A/P.

El agregado de lactosa generó diferentes efectos sobre las bacterias A/P. *P. aeruginosa* SA y *S. aureus* SA no fueron afectadas por el agregado de la misma ( $p > 0,05$ ). A diferencia de las anteriores, *E. coli* SA presentó un mejor desarrollo ( $p < 0,05$ ) en los tratamientos que tenían agregada esta sustancia pero no hubo diferencia entre los niveles utilizados ( $p > 0,05$ ). Cabe destacar que el efecto de la lactosa sobre *E. coli* SA fue llamativo, ya que el desarrollo microbiano medido en DO fue casi el doble con el agregado de dicha sustancia. Por último, el efecto que tuvo este aditivo sobre *Salmonella* spp. SA fue diferente entre los niveles evaluados ( $p < 0,05$ ), siendo el 2% la concentración que provocó menor desarrollo de esta bacteria. Sin embargo, la adición de esta sustancia al 1% no generó resultados diferentes al tratamiento sin dicho aditivo ( $p > 0,05$ ).

Respecto al uso de NaCl, *P. aeruginosa* SA presentó diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en los tratamientos con esta sustancia (menor crecimiento microbiano) respecto a los grupos que no poseían dicho aditivo. En contraste, *E. coli* SA y *Salmonella* SA demostraron que pudieron desarrollarse de la misma manera con o sin el agregado de este aditivo ( $p > 0,05$ ). Por su parte *S. aureus* SA mostró diferencias ( $p < 0,05$ ) con la inclusión de NaCl al medio generando mayor desarrollo de masa bacteriana.

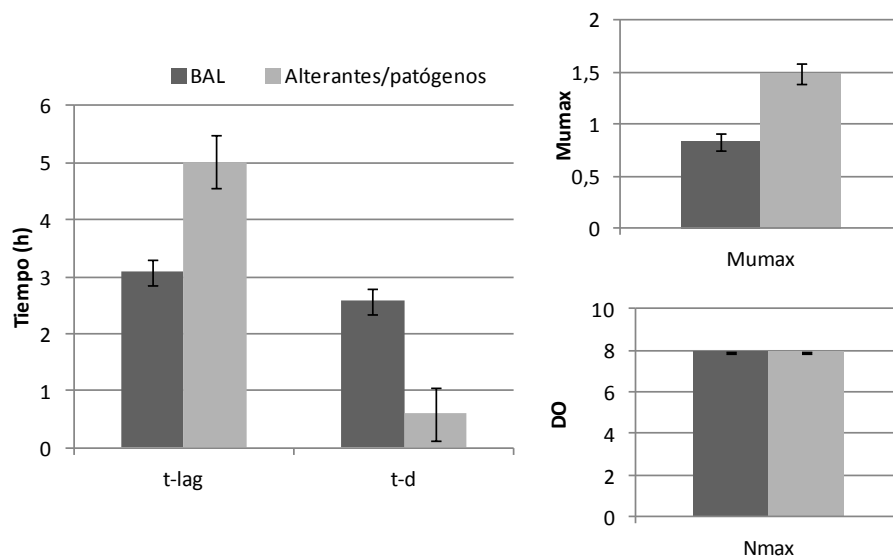
Analizando lo anterior, se observó que los tratamientos que afectaban el crecimiento de las bacterias A/P también impactaban negativamente sobre el desarrollo de las BAL.

### Capítulo III Resultados

Por lo tanto se evaluaron los parámetros de crecimiento microbiano con el objeto de identificar una combinación de aditivos que genere un retraso en la fase de adaptación (t-lag) al medio de cultivo en el caso de los microorganismos A/P. De esta forma, luego de comparar los valores de las fases de latencia de los 24 tratamientos aplicados a las BAL versus los otros microorganismos, se seleccionó la siguiente combinación de aditivos: lactosa 2%, extracto de levadura 0,4%, citrato de amonio 0,4% y NaCl 1%.

Este tratamiento generó que, en promedio, las BAL evaluadas presentaron una t-lag de 2 h menor que el promedio de las A/P (Figura 21). Si bien el tiempo de duplicación bacteriana fue en promedio 2 h mayor en las BAL y su Mumax 0,6 menor, los dos grupos bacterianos presentaron la misma densidad celular al finalizar el ensayo. Esto indicó que la biomasa generada fue la misma en los dos grupos con la ventaja de que las BAL se adaptaron más rápido al medio de cultivo.

Figura 21: Efecto de la combinación de aditivos seleccionados sobre los parámetros de crecimiento de las BAL versus los microorganismos A/P



Con estos resultados se decidió conformar el sistema de biopreservación con los aditivos mencionados previamente (lactosa 2%, extracto de levadura 0,4%, citrato de amonio 0,4% y NaCl 1%).

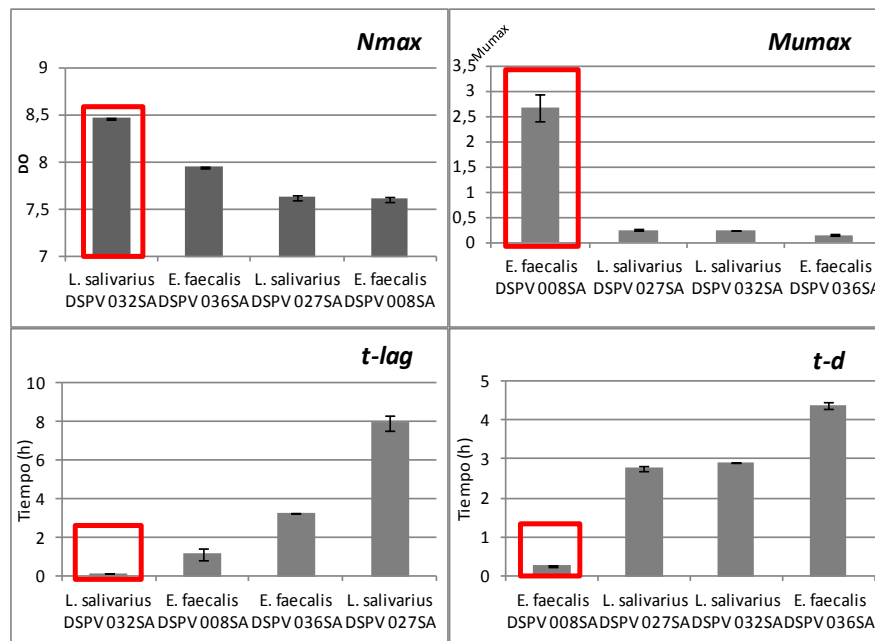
### Capítulo III

### Resultados

Adicionalmente se decidió utilizar como parte del SB la cepa *E. faecalis* DSPV 008SA por ser productora de un sustancia tipo bacteriocina. Respecto a sus características de crecimiento, fue la que presentó el mayor valor de  $M_{umax}$  respecto a las demás BAL cuando fue sometida a crecimiento junto a los aditivos seleccionados además de ser la bacteria con el menor tiempo de duplicación (Figura 22).

Otra BAL seleccionada para conformar el SB fue *L. salivarius* DSPV 032SA quien se caracterizó principalmente por poseer la menor fase de adaptación (30 min respecto a 2, 3 y 8 h del resto de las bacterias evaluadas). Además fue la cepa que presentó la mayor densidad total de células al finalizar el ensayo (Figura 22) indicando que la misma posee características adecuadas para su desarrollo junto a los aditivos seleccionados.

Figura 22: Efecto de los aditivos seleccionados (lactosa 2%, extracto de levadura 0,4%, citrato de amonio 0,4% y NaCl 1%) sobre los parámetros de crecimiento de las BAL evaluadas



Referencias: el recuadro rojo indica la BAL que presentó los mejores resultados respecto a las fases de desarrollo microbiano cuando fue sometida al medio con los aditivos seleccionados.

### Capítulo III

#### *Discusión*

Las técnicas de conservación se aplican para controlar el deterioro de la calidad de los alimentos. Este deterioro puede ser causado por microorganismos y/o por una variedad de reacciones físico-químicas que ocurren en el alimento. Sin embargo, la prioridad de cualquier proceso de conservación es minimizar la probabilidad de ocurrencia y de crecimiento de microorganismos A/P. Desde el punto de vista microbiológico, la conservación de alimentos consiste en exponer a los microorganismos a un medio hostil (por ejemplo a uno o más factores adversos) para prevenir o retardar su crecimiento, disminuir su supervivencia o causar su muerte. Esta estrategia es comúnmente conocida como “Teoría de los obstáculos” (Alzamora y col., 1998).

En este trabajo experimental se evaluaron diferentes “obstáculos” con el objeto de evitar el desarrollo de los microorganismos indeseados en sangre de matadero. Las primeras sustancias evaluadas con tal fin fueron CA y NaCl. El CA fue escogido por su utilización en el medio MRS como inhibidor de bacterias Gram negativas (De Man y col., 1960) y su efecto a dos concentraciones diferentes fue estudiado sobre las bacterias A/P. Los resultados fueron alentadores debido a que esta sustancia utilizada al doble de concentración (0,4%) que en el medio MRS retardó la fase de adaptación (t-lag) por parte de dichos microorganismos.

En este sentido, en estudios previos (De Man y col., 1960; Joosten y Northold, 1989) se han diseñado medios de cultivo con el objeto de mejorar el desarrollo de las BAL. Estos trabajos plantearon el uso del citrato de amonio como inhibidor de la microbiota Gram negativa pero además como favorecedores del desarrollo de las BAL (Rabe y Hillier, 2003). Respecto a esto, si bien las BAL evaluadas en el presente estudio se vieron afectadas por el CA, el periodo de adaptación de las mismas fue más corto que el de las bacterias A/P, condición que les otorga una ventaja interesante en el momento de instalarse como microorganismos capaces de dominar las primeras etapas de la ecología del sustrato en estudio.

### Capítulo III

#### Discusión

Por otra parte, la adición de NaCl tiene como principal efecto la reducción de  $a_w$  (actividad de agua) pero además tiene por sí misma efecto bacteriostático. Es importante destacar que las BAL son tolerantes a altas concentraciones de sal, se estima que su adaptación se debería a la necesidad del hombre de conservar sus alimentos mediante la adición de dicha sustancia (Moreira Dos Santos, 1993).

El NaCl modifica el balance osmótico del ambiente que rodea a una bacteria, de esta forma, con reducida actividad de agua en el medio externo el microorganismo pierde agua para reestablecer el equilibrio osmótico (Katusic, 2002). La pérdida de agua resulta en una reducción de la actividad metabólica, deteniéndose el crecimiento de la bacteria. Asimismo, la concentración de NaCl requerida para limitar el crecimiento microbiano depende de la fase de crecimiento de los microorganismos y de la temperatura (Barbosa-Canovas y col., 1997).

En este sentido, la adición de NaCl junto al medio evaluado demostró afectar en diferentes grados el desarrollo de la mayoría de las BAL y de las bacterias A/P evaluadas. Sin embargo, en la única que se observó un efecto opuesto fue en *E. coli* SA ya que la adición de esta sustancia generó que sus parámetros de crecimiento bacteriano fueran mejores a los de la bacteria sin el aditivo. Esto se puede explicar debido a que esta especie ha sido reportada previamente como halotolerante (Iandolo y col., 1964), indicando su capacidad de resistir altas concentraciones de sal.

Si bien la sangre posee un alto porcentaje de proteínas plasmáticas, en este ensayo se agregó una fuente extra (extracto de levadura) con el fin de evitar el consumo excesivo de las proteínas plasmáticas por medio de las bacterias presentes en sangre. Mediante esta estrategia se procuró que en el momento de procesar la sangre y convertirla en un subproducto proteico las concentraciones de las mismas sean adecuadas.

Respecto a la adición de un hidrato de carbono como la lactosa supone una mejora en el desarrollo de las bacterias. El uso de azúcar con el fin de estimular el desarrollo de las BAL durante la fermentación de la sangre de matadero ya ha sido evaluado previamente (Morgan, 1985; Pinel, 1985). Al igual que en este trabajo, también se han detectado efectos positivos de agregar glucosa a sangre porcina obtenida en mataderos para promover el

### **Capítulo III**

#### **Discusión**

desarrollo de BAL inoculadas (Zamora Rodriguez, 2003). Por su parte, Marth y Steele (2001) también demostraron que la adición de pequeñas concentraciones de glucosa o de otros azúcares como lactosa y maltosa estimula el desarrollo de las BAL.

En este ensayo, se observó que el agregado de lactosa no generó cambios importantes en el desarrollo de las bacterias estudiadas, solo *E. coli* SA logró generar mayor biomasa a diferencia de *Salmonella* spp. SA que a una alta concentración de lactosa disminuyó el número de células viables. Esto indica que cada microorganismo posee diferentes mecanismos de utilización de los hidratos de carbono impactando de manera distinta sobre cada uno de ellos.



### Capítulo III

#### *Conclusiones parciales*

✓ De los aditivos seleccionados como inhibidores el CA al 0,4% fue el que tuvo mayor impacto sobre el desarrollo de los microorganismos A/P, afectando en menor medida a las BAL.

✓ Tres BAL fueron descartadas del ensayo ya que no fueron capaces de desarrollarse en suero equino estéril ni en ninguno de los medios que contenían este fluido más las combinaciones de aditivos.

✓ Se detectó una determinada combinación de las concentraciones de aditivos (1 % NaCl, 0,4 % CA, 0,4 % de extracto de levadura y 2 % de lactosa) que logró aumentar la fase de latencia de los microorganismos A/P sin afectar dicho parámetro microbiano de las BAL.

✓ Se seleccionaron dos BAL que presentaron los mejores parámetros de crecimiento con los aditivos elegidos.

✓ De esta forma, el sistema de biopreservación de sangre aviar obtenida en mataderos quedó conformado por *E. faecalis* DSPV008 y *L. salivarius* DSPV032 junto a 1 % NaCl, 0,4 % CA, 0,4 % de extracto de levadura y 2 % de lactosa.

## **CAPÍTULO IV**

**Capítulo IV***Objetivo específico a alcanzar:*

4- Investigar la actividad antagonista del SB en sangre.

- a) Evaluar el impacto individual del SB inoculado en sangre estéril sobre cada una de las bacterias A/P autóctonas.
- b) Estudiar el efecto del SB sobre las diferentes poblaciones presentes en sangre aviar obtenida en matadero.

En esta sección, se desarrolla la parte final de esta tesis. En los capítulos anteriores se explicaron las diferentes actividades realizadas para conformar un Sistema de Biopreservación de sangre aviar obtenida en mataderos. Es por esto que en esta etapa, primero se evaluó el impacto del SB de manera individual sobre cada uno de los A/P autóctonos en sangre estéril y posteriormente, el SB fue inoculado directamente a sangre aviar obtenida en matadero para identificar los efectos del mismo sobre las poblaciones presentes y sobre parámetros fisicoquímicos indicadores de la funcionalidad del sistema.

**Capítulo IV***Materiales y métodos*

4. a) *Evaluación de la capacidad de inhibición del SB en sangre equina estéril frente a los microorganismos A/P autóctonos.*

Para realizar este ensayo se utilizó sangre equina estéril a la cual se le agregaron los aditivos y las BAL seleccionadas previamente para conformar el Sistema de Biopreservación.

- Co-cultivo de las BAL

Previamente a enfrentar el SB a los microorganismos A/P, se realizó un ensayo co-cultivando las dos bacterias lácticas (*L. salivarius* DSPV 032SA y *E. faecalis* DSPV 008SA) con el objeto de detectar inhibición o sinergismo de una frente a la otra. De esta forma, se utilizaron cultivos frescos de cada una de las BAL incubados previamente por separado durante 18 h a 37 °C (8 log UFC/ml) para inocular 100 µl de cada una de ellas en un tubo conteniendo 10 ml de caldo MRS. A su vez, 100 µl de cada una de las BAL fueron inoculados por separado en tubos conteniendo 10 ml de caldo MRS. Estos fueron incubados a 37 °C durante 18 h y luego se realizaron diluciones decimales en solución Ringer ¼. Para realizar los recuentos del *E. faecalis* se sembró 1 ml de la dilución apropiada en profundidad en agar selectivo para Enterococos (Merck®). Para *L. salivarius*, la siembra se realizó en superficie colocando 100 µl en agar Lamvab distribuyendo el inóculo con espátula de Drigalsky. Las diluciones fueron sembradas por triplicado. Además, se realizó el recuento de BAL totales en agar MRS, mediante la siembra de 1 ml de la dilución apropiada en profundidad. El agar selectivo para Enterococos fue incubado a 37 °C en aerobiosis durante 24 h y los medios restantes se colocaron en atmósfera anaeróbica a la misma temperatura por 72 h. Posteriormente se realizaron los recuentos en las placas de petri que contenían un crecimiento bacteriano correspondiente entre 30 y 300 UFC.

## Capítulo IV

### Materiales y métodos

Esta experiencia fue realizada por triplicado. Para comparar los valores obtenidos de los recuentos de cada BAL cultivadas individualmente y en co-cultivo, se utilizó una prueba t-Student (Infostat<sup>®</sup>, UNC).

#### - Puesta a punto del SB en sangre

Luego de evaluar la interacción (inhibición o sinergismo) que pudiera existir entre las BAL, se procedió a realizar los desafíos con los A/P autóctonos. Para ello, se llevaron a cabo ensayos individuales desafiando cada uno de estos microorganismos. Se realizó una prueba inicial para poner a punto el sistema donde se inoculó la sangre con 8 log UFC/ml de cada una de las BAL y 6 log UFC/ml de *Salmonella* spp. SA. Este microorganismo fue elegido arbitrariamente para determinar de qué manera controlar el pH de las muestras buscando el mayor desarrollo de las BAL conjuntamente con el menor crecimiento de las bacterias A/P preservando la integridad de las proteínas plasmáticas. La incubación de los tratamientos se realizó en aerobiosis a 30 °C durante 48 h. Se tomaron alícuotas de los mismos a tiempo 0, 24 y 48 h para la realización de las determinaciones microbiológicas y pH.

Para evaluar los efectos del SB sobre el pH se tomó una cantidad apropiada de cada tratamiento y se midió con un peachímetro (Altronix<sup>®</sup>). Los recuentos microbianos fueron evaluados mediante la siembra en medios selectivos de diluciones decimales, preparadas en solución Ringer 1/4. Para el recuento de *Salmonella* spp. SA se utilizó agar Violeta Rojo Bilis Glucosa (VRBG, Britania<sup>®</sup>). Las diluciones apropiadas fueron sembradas por duplicado, 1 ml en profundidad. La incubación se realizó en aerobiosis a 37 °C durante 24 h. Para el caso de las BAL del SB, se utilizó agar MRS el cual fue sembrado en profundidad (1ml) e incubado a 37 °C por 72 h en anaerobiosis. Luego de la incubación se procedió a efectuar los recuentos en las placas que presentaban entre 30 y 300 UFC.

## Capítulo IV

### Materiales y métodos

#### - Efecto del SB sobre los microorganismos A/P en sangre estéril

Una vez puesto a punto el sistema se evaluó el efecto individual que el SB presentó frente a cada una de las bacterias A/P autóctonas. Se utilizaron las condiciones ensayadas previamente inoculando 8 log UFC/ml de cada una de las BAL y 6 log UFC/ml de las A/P autóctonas. La incubación de la sangre se realizó en aerobiosis a 30 °C durante 48 h y se neutralizó el medio a las 12 y 24 h con NaOH (2M) estéril. Se tomaron alícuotas a tiempo 0, 24 y 48 h para la realización de las determinaciones microbiológicas y pH. El ensayo se realizó por triplicado para cada una de las bacterias A/P.

El pH fue evaluado como se mencionó en el apartado previo. Los recuentos microbiológicos se realizaron en medios de cultivo específicos. Previamente, se prepararon diluciones decimales en solución de Ringer 1/4. Para *Salmonella* spp. SA se procedió de igual forma que en el apartado previo y para *E. coli* SA se utilizó agar Violeta Rojo Bilis (VRB, Britania®). Las diluciones fueron sembradas por duplicado, 1 ml en profundidad y la incubación se realizó en aerobiosis a 44 °C durante 24 h.

El recuento de *S. aureus* SA se llevó a cabo utilizando agar Manitol Sal (extracto de carne 0,1%, pluripectona 1%, manitol 1%, cloruro de sodio 7,5%, agar bacteriológico 1,5%, Rojo fenol 0,04%). El medio fue preparado a partir de sus constituyentes individuales y esterilizado a 120 °C en autoclave. Las diluciones fueron sembradas por duplicado 0,1 ml en la superficie del medio previamente acondicionado. La incubación se realizó en aerobiosis a 37 °C durante 48 h.

En el caso de *P. aeruginosa* SA, el recuento se llevó a cabo utilizando agar *Pseudomonas* Cetrimide (OXOID®). Para ello, las diluciones fueron sembradas por duplicado 0,1 ml en superficie y la incubación se realizó en aerobiosis a 37 °C durante 48 h.

Se efectuó el recuento de las dos BAL del SB por separado utilizando agar Lamvab para *L. salivarius* DSPV 032SA y agar selectivo para Enterococos para *E. faecalis* DSPV 008SA como se mencionó previamente. Las diluciones fueron sembradas por duplicado.

## Capítulo IV

### Materiales y métodos

Los resultados obtenidos del ensayo del SB sobre los diferentes grupos microbianos y pH fueron analizados mediante un ANOVA de medidas repetidas. La existencia de diferencias estadísticamente significativas para cada parámetro en cada momento de muestreo fue analizado mediante la prueba t-Student para muestras independientes. Todos los análisis estadísticos fueron realizados utilizando el programa InfoStat (UNC).

*4. b) Efecto del SB sobre los recuentos microbianos de las distintas poblaciones presentes en sangre de matadero.*

Se realizó un estudio experimental evaluando el efecto del sistema de biopreservación sobre el crecimiento de las principales poblaciones A/P (enterobacterias, coliformes, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas* spp.) presentes en la sangre obtenida desde el matadero aviar, así como sobre el pH y el grado de hemólisis durante el almacenamiento a 30 °C por 48 h. Se realizaron cinco repeticiones del estudio utilizando muestras de sangre obtenida en mataderos en días diferentes.

Las muestras fueron recolectadas en recipientes estériles (250 ml con el agregado de perlas de vidrio estériles para desfibrinar la sangre) desde el tanque de almacenamiento de sangre del matadero aviar y trasladadas refrigeradas hasta el laboratorio del DSP. En cada repetición la muestra original de sangre fue dividida en dos recipientes estériles: a) muestra control: sin el agregado del SB y b) muestra SB: sangre con el agregado del SB utilizando las concentraciones de BAL y aditivos mencionadas en el apartado previo.

Durante el almacenamiento se tomaron alícuotas a tiempo 0, 24 y 48 h para la realización de las determinaciones microbiológicas, medición de hemólisis y pH. A las 12 y 24 h de almacenamiento el pH de la sangre con SB fue ajustado a pH= 6,0 mediante una solución de NaOH 2M estéril.

Los recuentos microbiológicos de las poblaciones estudiadas fueron evaluados en medios de cultivo específicos. Para ello, previamente, se realizaron diluciones decimales de las alícuotas de sangre en solución Ringer 1/4. Para el recuento de las enterobacterias totales se utilizó agar Violeta Rojo Bilis Glucosa (VRBG, Britania®) y para las bacterias coliformes agar Violeta Rojo Bilis (VRB, Britania®). Las diluciones fueron sembradas por

## Capítulo IV

### Materiales y métodos

duplicado, 1ml en profundidad. La incubación se realizó en aerobiosis a 37 °C durante 24 h para VRBG y 24 h a 44 °C para VRB. El recuento de *S. aureus* se realizó utilizando agar Manitol Sal (extracto de carne 0,1%, pluripectona 1%, manitol 1%, cloruro de sodio 7,5%, agar bacteriológico 1,5%, Rojo fenol 0,04%). El medio fue preparado a partir de sus constituyentes individuales y esterilizado a 120 °C en autoclave. Las diluciones fueron sembradas por duplicado 0,1 ml en la superficie del medio previamente acondicionado. La incubación se realizó en aerobiosis a 37 °C durante 48 h. En el caso de *Pseudomonas* spp., el recuento se realizó utilizando agar *Pseudomonas* Cetrimide (OXOID®). Para ello, las diluciones fueron sembradas por duplicado 0,1 ml en superficie. La incubación se realizó en aerobiosis a 37 °C durante 48 h.

El recuento de las BAL se realizó utilizando agar MRS (OXOID®). Las diluciones fueron sembradas por duplicado, 1ml en profundidad y la incubación se realizó en anaerobiosis a 37 °C durante 72 h.

#### 4. c) *Análisis de los efectos del SB sobre la sangre de mataderos.*

##### - Impacto del SB sobre el pH

A partir de una alícuota de la muestra de sangre (5 ml) de cada tratamiento se midió el pH con un peachímetro (Altronix) como se mencionó previamente.

##### -Efectos producidos por el SB sobre los glóbulos rojos (hemólisis)

Para determinar la hemólisis, una alícuota de 1ml de sangre de cada tratamiento fue centrifugada a 2500 rpm por 15 min a 4 °C. Se midió la Abs (Espectrofotómetro Jenway) a 414 nm (Abs<sub>414</sub>) del sobrenadante, la cual es indicativa de la cantidad de hemoglobina libre en plasma (Dávila y col., 2006).

Los resultados obtenidos del ensayo del SB sobre los diferentes grupos microbianos, pH y hemólisis fueron analizados mediante un ANOVA de medidas repetidas. La existencia de diferencias estadísticamente significativas para cada parámetro en cada momento de muestreo fue analizado mediante la prueba t-Student para muestras



## **Capítulo IV**

### **Materiales y métodos**

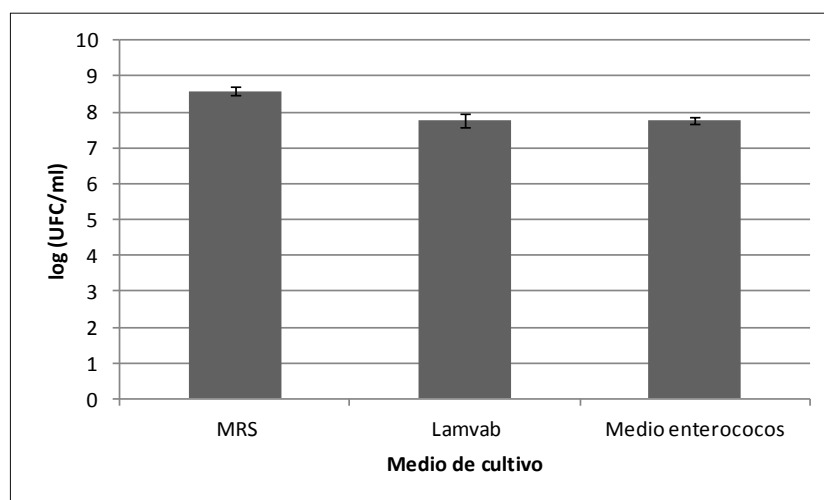
independientes. Todos los análisis estadísticos fueron realizados utilizando el programa InfoStat (Universidad Nacional de Córdoba).

## Resultados

### 4. a) Evaluación de la capacidad de inhibición del SB frente a los microorganismos A/P autóctonos inoculados en sangre equina estéril

Al cultivar las dos BAL en conjunto se observó que ambas pudieron desarrollarse de manera adecuada. Es decir, a tiempo cero se inoculó aproximadamente 8 log (UFC/ml) y a las 18 h se recuperó en el medio Lamvab una cantidad similar de bacterias que en el medio selectivo para Enterococos (Figura 23).

Figura 23: Recuentos del co-cultivo de las dos BAL seleccionadas para el SB



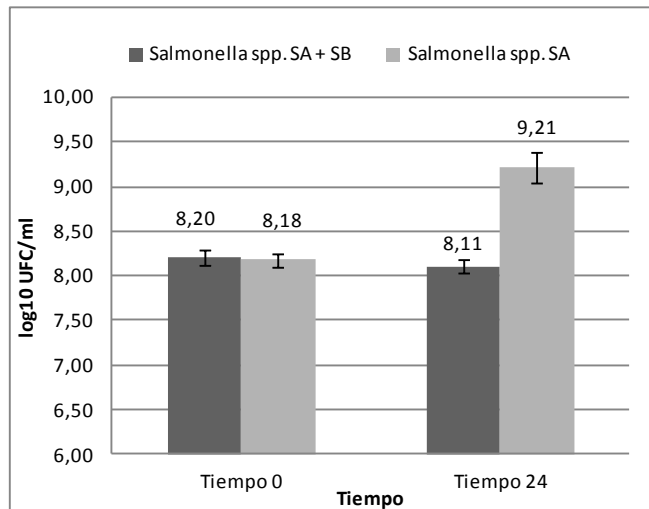
Con los datos de los recuentos en co-cultivo se observó que no hubo efectos inhibitorios sobre el desarrollo de ninguno de los microorganismos utilizados sobre el otro, por lo cual es factible utilizarlos de manera conjunta.

Luego, para poner a punto el SB se inoculó la sangre con las BAL más los aditivos y el primer patógeno a evaluar, *Salmonella* spp. SA (Prueba 1). Al realizar los recuentos se observó que en el co-cultivo con el SB, dicho A/P de la sangre mantuvo su concentración a las 24 h (Figura 24). Por el contrario, en la sangre inoculada únicamente con *Salmonella* spp. SA el recuento se incrementó en aproximadamente 1 log UFC/ml a las 24 h post-inoculación.

## Capítulo IV

### Resultados

Figura 24: Prueba 1, puesta a punto del SB con *Salmonella* spp. SA



Sin embargo, no fue posible realizar el recuento a las 48 h debido a que las muestras inoculadas con el SB estaban coaguladas. Respecto a los valores de pH tomados a tiempo 0 fueron similares entre los 2 tratamientos, sin embargo, a tiempo 24 h el pH del tubo inoculado con el SB descendió a valores cercanos a 4,6. Este descenso en los niveles de pH provocó la acidificación del medio causando la coagulación de las proteínas plasmáticas.

Es por esto que se decidió evaluar el SB utilizando una estrategia para controlar la acidez producida por las BAL. De esta forma se colocó de manera estéril una base (NaOH, 2 M al 4,2% v/v) luego de las primeras 12 h de incubación en el tubo con sangre inoculado con *Salmonella* spp. SA y el SB. Ésta fue añadida para evitar el descenso del pH hasta el PI de las proteínas plasmáticas repitiendo dicho tratamiento a las 24 h post-inoculación. De esta forma, se logró un desarrollo de las BAL con una disminución de las bacterias A/P evitando la coagulación de las muestras.

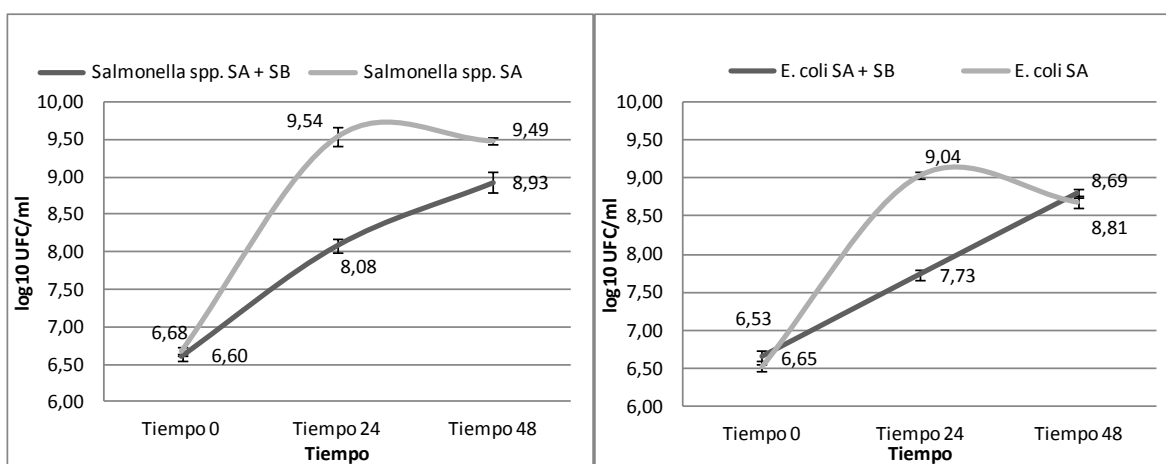
Al evaluar el impacto del SB sobre *Salmonella* spp. SA (Figura 25), se observó que si bien en el co-cultivo con el SB se desarrolló, lo hizo en menor medida que cuando se la estudió individualmente. A las 24 horas la diferencia en el recuento de *Salmonella* spp. SA

## Capítulo IV

### Resultados

fue de aproximadamente 1,5 log menor ( $p < 0,05$ ) en el tratamiento con el SB, diferencia que se redujo a las 48 h donde solo fue de 0,5 log ( $p < 0,05$ ). Respecto a *E. coli* SA, se observó que también se vio afectada por el SB a las 24 h de cultivo mostrando diferencias significativas respecto al desarrollo sin el SB ( $p < 0,05$ ). Sin embargo, a las 48 h la diferencia entre los tratamientos ya no fue significativa.

Figura 25 Efecto del SB en sangre estéril sobre *Salmonella* spp. SA y *E. coli* SA



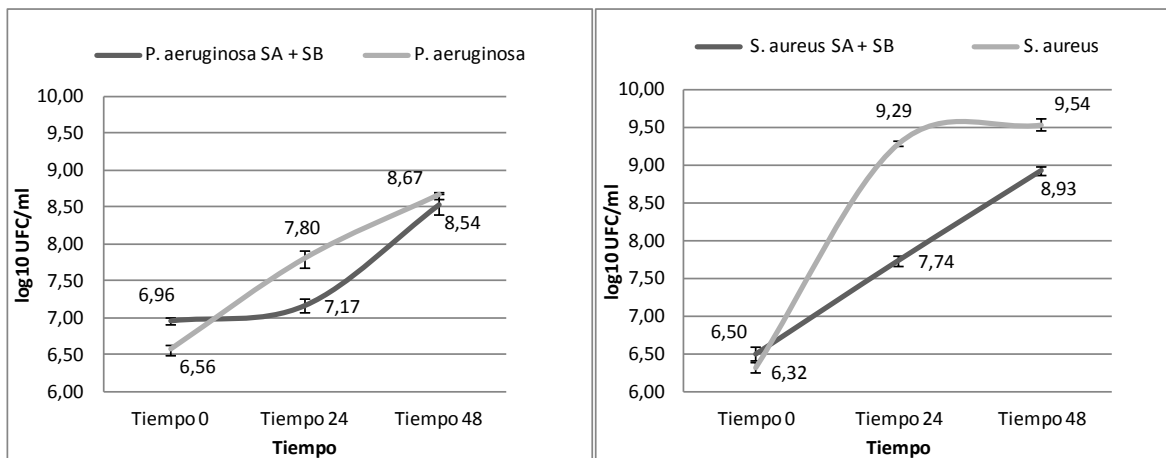
Por otro lado se observó el efecto del sistema sobre el pH, en este sentido se detectó un descenso importante llegando a 4,9 a las 24 h post-inoculación para luego ascender a 6,9 a las 48 h. De esta manera, mediante la neutralización a las 12 y 24 h se logró evitar la coagulación de la sangre.

Luego, utilizando el mismo procedimiento, fueron evaluados *P. aeruginosa* SA y *S. aureus* SA (Figura 26). En este ensayo se observó que *P. aeruginosa* SA se vio afectada principalmente en las primeras 24 h post-inoculación. En la sangre adicionada con el SB esta bacteria alterante sólo se desarrolló 0,2 log UFC/ml, mientras que en la sangre sin agregado del SB este microorganismo incrementó su concentración en 1,2 log UFC/ml de sangre, aproximadamente ( $p < 0,05$ ).

## Capítulo IV

### Resultados

Figura26: Efecto del SB en sangre estéril sobre *P. aeruginosa* SA y *S. aureus* SA



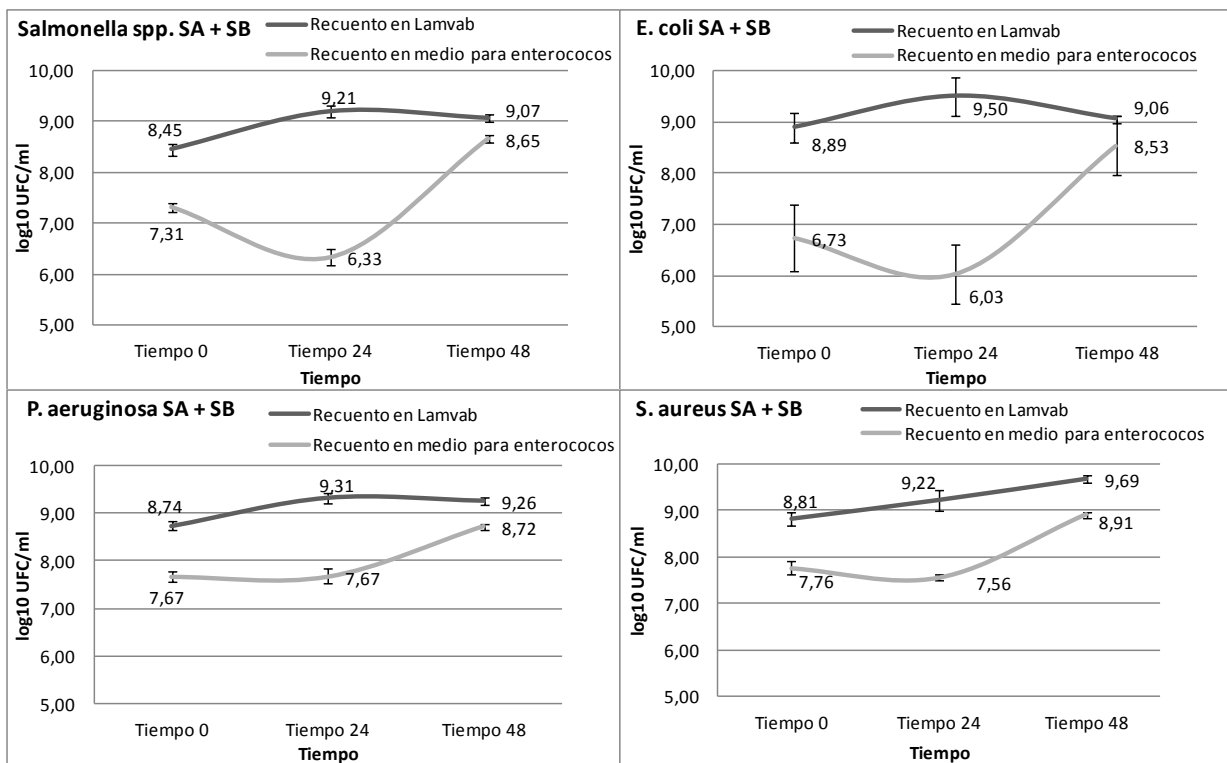
Si bien esto es importante, se observó que al final del ensayo se incrementaron los valores finalizando los dos tratamientos con aproximadamente el mismo recuento ( $p > 0,05$ ). En el caso de *S. aureus* SA se detectó que las diferencias en los recuentos entre los grupos con y sin el SB fueron estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) a las 24 h donde se observó 1,5 log UFC/ml menos en el tubo inoculado con el SB. Sin bien a las 48h la diferencia entre ambos tratamientos se redujo a solo 0,6 log UFC/ml los valores siguieron siendo distintos ( $p < 0,05$ ).

Los valores valores de pH en los tratamientos con el SB disminuyeron sus valores hasta 4,9 a las 24 h post-inoculación para luego incrementar y concluir con niveles cercanos a 6,6.

Una vez analizado lo ocurrido con las bacterias A/P se evaluó lo sucedido con las BAL dentro del sistema (Figura 27). En todos los ensayos realizados se observó que las dos BAL utilizadas aumentaron sus recuentos a las 24 y 48 h post-inoculación, excepto la cepa *E. faecalis* DSPV 008SA cuando fue enfrentada a *Salmonella* spp. SA y a *E. coli* SA. En este punto dicha BAL tuvo un periodo de disminución hasta el tiempo 24 h para luego aumentar de manera considerable su biomasa y llegar a las 48 h post-inoculación con más de un logaritmo de diferencia en comparación con el evidenciado al inicio del ensayo.

## Capítulo IV Resultados

Figura 27: Desarrollo de las BAL del SB junto a las bacterias A/P



#### 4. b) Recuentos microbianos de las distintas poblaciones en sangre de matadero inoculada con el SB.

Para todos los grupos bacterianos se hallaron diferencias estadísticamente significativas al ANOVA de medidas repetidas ( $P < 0,05$ ). Los recuentos fueron superiores en la sangre sin el SB a excepción del recuento de BAL que fue mayor en el tratamiento con el agregado del mismo.

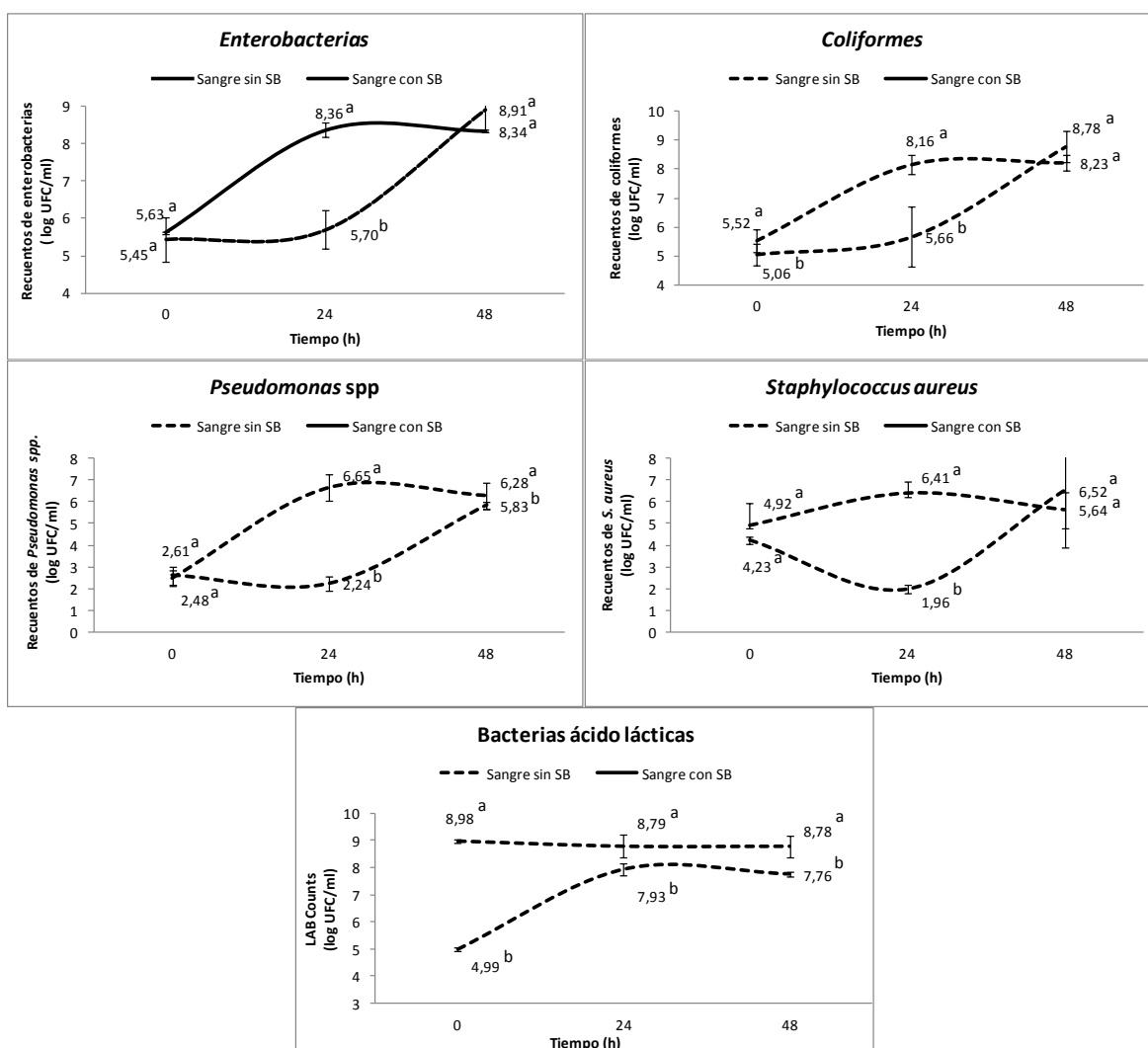
Durante las primeras 24 h de almacenamiento el sistema de biopreservación logró inhibir el crecimiento de enterobacterias, coliformes y *Pseudomonas* spp., generando a su vez una reducción en el recuento de *S. aureus*. Durante las 24 h finales del almacenamiento el recuento de todos los grupos A/P se elevó. Los niveles finales de enterobacterias,

## Capítulo IV

### Resultados

coliformes y *S. aureus* no fueron diferentes ( $p>0,05$ ) a los encontrados en la sangre sin el SB. Si bien los recuentos de *Pseudomonas* spp. también se incrementaron hacia el final del almacenamiento a 30 °C, fueron menores que los hallados en la sangre sin el sistema de biopreservación ( $p=0,058$ ) (Figura 28).

Figura 28: Evolución de las poblaciones microbianas en los diferentes tratamientos luego de la incubación a 30 °C durante 48 h.



Referencias: <sup>(a-b)</sup> Letras diferentes entre los tratamientos, indican diferencias estadísticamente significativas en los distintos tiempos evaluados ( $p<0.01$ )

## Capítulo IV

### Resultados

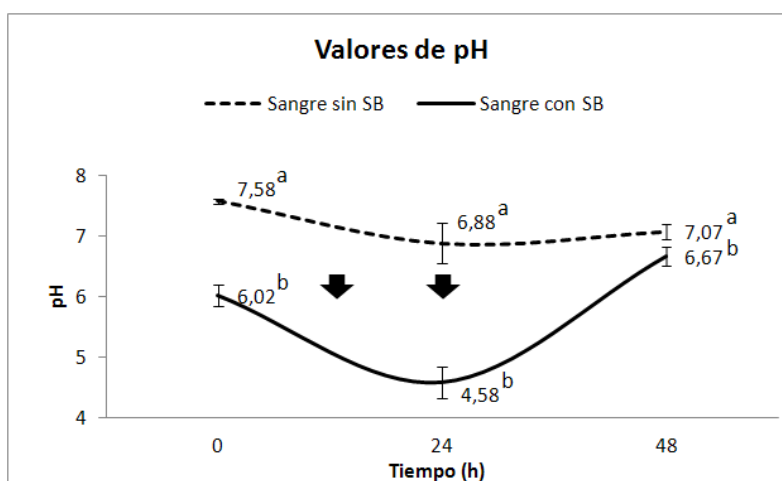
El recuento de BAL en la sangre tratada con el sistema de biopreservación se mantuvo en valores constantes superiores a 8,6 log UFC/ml de sangre a lo largo de todo el ensayo. La sangre que no recibió el tratamiento con el sistema de biopreservación evidenció un crecimiento paulatino en los recuentos de BAL pero en ningún caso alcanzó los niveles del grupo tratado, siendo en todos los tiempos de muestreo diferente estadísticamente ( $p < 0,05$ ) (Figura 28).

#### 4. c) Análisis de los efectos de las BAL y sus metabolitos sobre la sangre.

##### - Efectos sobre el pH

El pH de la sangre tratada con el SB fue en todos los tiempos inferior a la sangre sin tratar ( $p < 0,05$ ). El pH de la sangre tratada disminuyó desde su valor inicial (6,02) hasta alcanzar un valor promedio de 4,58 en las primeras 24 h de almacenamiento, para incrementarse hacia el final del ensayo (pH= 6,67) (Figura 29).

Figura 29: Evolución de los valores de pH en los diferentes tratamientos luego de la incubación a 30 °C durante 48 h



Referencias: <sup>(a-b)</sup> Letras diferentes entre los tratamientos, indican diferencias estadísticamente significativas en los distintos tiempos evaluados ( $p < 0,05$ ). Las flechas ( ↓ ) indican el momento donde se reguló el pH a 6 con NaOH (12 h y 24 h).



## Capítulo IV

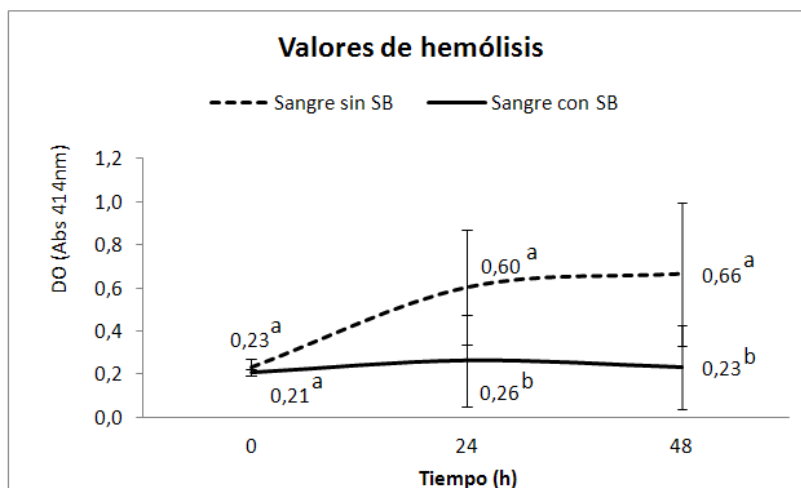
### Resultados

Si bien la sangre que no recibió el tratamiento con el SB mostró el mismo patrón de comportamiento durante el almacenamiento, presentó valores muy superiores (al menos 1,3 puntos superior) a los hallados en la sangre inoculada.

#### - Efectos sobre los glóbulos rojos (hemólisis)

Durante su almacenamiento a 30 °C la sangre sin el agregado del SB sufrió un proceso de ruptura de glóbulos rojos que se pudo evidenciar por los valores de Abs<sub>414</sub>. Al inicio del ensayo ambas muestras evidenciaron niveles similares de Abs<sub>414</sub> ( $p > 0,05$ ), pero posteriormente la sangre sin inocular mostró valores significativamente superiores a las 24 h ( $p < 0,05$ ) y a las 48 h ( $p < 0,05$ ) en comparación con la sangre tratada con el sistema de biopreservación (Figura 30).

Figura 30: Evolución de los valores de hemólisis en los diferentes tratamientos luego de la incubación a 30 °C por 48 h.



Referencias: <sup>(a-b)</sup> Letras diferentes entre los tratamientos indican diferencias estadísticamente significativas en los distintos tiempos evaluados ( $p < 0,05$ )

## Capítulo IV

### *Discusión*

La capacidad de las BAL de inhibir o disminuir los efectos negativos que los microorganismos A/P provocan en los alimentos ha sido ampliamente estudiada (Schillinger y Lüke, 1989; Brashears y col., 1996; Buyong y Luchansky, 1998; Amezcua y Brashears, 2002). Sin embargo, los efectos benéficos de las mismas no han sido suficientemente evaluados en los subproductos obtenidos de los mataderos de animales que luego son incorporados en la industria alimentaria.

Por otro lado, evidencias previas han demostrado que el potencial inhibitorio de las BAL es mayor sobre microorganismos aislados del mismo hospedador (Zoetendal y col., 2006). Inicialmente, la sangre es un fluido estéril que proviene de animales sanos, por lo que la microbiota contaminante se incorpora a la misma posteriormente al sacrificio del animal. Por este motivo es importante trabajar con BAL aisladas desde el producto donde se quiere aplicar así como utilizar microbiota alterante /patógena autóctona.

Como se comentó previamente, dos BAL fueron las seleccionadas para conformar el SB. La ventaja de utilizar especies diferentes radica en la posibilidad de complementar los efectos benéficos de cada una optimizando las propiedades de biopreservación. Asimismo, es importante investigar la interacción que puede existir entre las bacterias que conforman un inóculo multi-cepas ya que pueden inhibirse, potenciarse o simplemente no producir ningún cambio sobre la o las cepas de BAL acompañantes. Los resultados de este experimento demostraron que no existieron diferencias en el desarrollo de las bacterias seleccionadas cuando fueron cultivadas en conjunto. Esto permitió justificar que ambas pueden formar parte del SB cómo inóculo multi-cepa. Existen investigaciones previas donde inóculos bacterianos fueron conformados por dos o más cepas y utilizados como cultivos biopreservadores y probióticos con diversos efectos positivos (Erkkilä y Petäjä, 2000; Neffe y Kołozyn-Krajewska, 2010; Ruiz-Moyano y col., 2011; Jaworska y col., 2011)

Una vez conformado el SB, se evaluaron los efectos del mismo sobre cada uno de los A/P en sangre equina estéril. Sin embargo, durante la puesta a punto del sistema, el

## Capítulo IV

### Discusión

muestreo a las 48 h no pudo ser realizado porque la muestra se encontraba coagulada. Esto se atribuye a un descenso del pH debido a los ácidos producidos por las BAL a valores cercanos al punto isoeléctrico de las proteínas, lo cual influye en la conformación de las mismas provocando su coagulación. Un rápido descenso de pH también puede provocar proteólisis (Suzzi y Gardini, 2003) por lo que es necesario controlar este factor para poder lograr mantener a la sangre con fluidez y generar el menor daño sobre las proteínas. Para contrarrestar los efectos negativos de la acidez, se agregó una base (NaOH 2M) evitando que disminuya el pH.

De esta forma se detectó que a las 24 h los cuatro microorganismos A/P se veían afectados por el SB. Estos resultados concordaron con los de Zamora Rodriguez (2003) que luego de agregar glucosa al 2% junto a BAL seleccionadas determinó que los microorganismos A/P aislados desde sangre de matadero se veían afectados disminuyendo su desarrollo.

La rápida tasa de crecimiento y la competencia por los nutrientes del medio hacen que las BAL tengan ventaja sobre el desarrollo de los demás microorganismos. La disminución de pH debido a la actividad metabólica de este grupo bacteriano hace que la mayoría de las bacterias A/P se vean afectadas (Schillinger y Lucke, 1990). El producto final de la fermentación de tipo homofermentativa presentada por las BAL es principalmente ácido láctico, el cual tiene una reconocida actividad inhibitoria de tipo bacteriostática sobre la mayoría de los microorganismos contaminantes (Schillinger y Lucke, 1990).

De esta forma, el SB fue finalmente evaluado directamente sobre sangre aviar obtenida en matadero. Como se demostró en los resultados, este sistema tuvo la capacidad de retrasar el desarrollo de la microbiota contaminante de sangre al menos durante las primeras 24 h. Las repeticiones del ensayo realizadas con muestras de sangre obtenidas en días diferentes demostraron la capacidad de controlar la microbiota independientemente de la variabilidad y carga de especies bacterianas que posea dicho subproducto.

Si bien existe otro trabajo realizado con el objetivo de biopreservar sangre obtenida en mataderos de cerdos (Dávila y col., 2006), esta herramienta biotecnológica no ha sido

## Capítulo IV

### Discusión

ampliamente estudiada. En dicho ensayo, la sangre fue inoculada con una BAL, suplementada con 2% de inulina y mantenida a 5 y 15 °C durante 144 horas. Si bien las temperaturas de incubación fueron diferentes a las utilizadas en este ensayo, las BAL evaluadas también provocaron un retraso en el desarrollo de los contaminantes.

Asimismo, otro trabajo realizado por el mismo grupo (Saguer y col., 2007) agregó un tratamiento de higienización a alta presión luego de la biopreservación logrando que los recuentos desciendan a cero, manteniendo las propiedades funcionales del plasma sanguíneo.

En este ensayo la temperatura utilizada para evaluar el SB fue 30 °C. Este parámetro fue seleccionado con base en los sistemas de producción de los mataderos en Argentina y además teniendo en cuenta los sistemas de recolección y procesamiento de sangre actuales. Dicho subproducto se obtiene de los animales con temperatura corporal de 40-41 °C según la especie y se almacena en un tanque el cual sigue siendo alimentado con la sangre de la línea de faena durante el degüello de los animales. Este almacenamiento suele no ser refrigerado, lo que obliga a la empresa procesadora retirar la sangre dentro de las 12 h con el fin de evitar su deterioro. Dependiendo de la calidad microbiológica de la sangre al llegar a la planta procesadora se define qué tipo de producto se va a utilizar. El SB permitiría principalmente mejorar los recuentos microbianos de los indicadores contaminantes, lo que redundaría en una sangre con mayor potencial para la elaboración de subproductos.

El mecanismo de inhibición utilizado por las BAL en los experimentos realizados en sangre podría estar relacionado en primera medida con la acidificación de la misma. Si la acidez del medio se incrementa (con la consecuente reducción del pH), los microorganismos tratan de mantener el pH interno dentro de un rango estable limitado y en un valor mayor que el del medio. Los mecanismos homeostáticos tratan de impedir que los protones crucen la membrana celular y entren al citoplasma y además expulsan a los protones que hayan penetrado adentro de la célula. La reparación de la homeostasis perturbada del pH demanda energía y por lo tanto, la velocidad de crecimiento microbiano disminuye. A medida que el pH se va reduciendo aún más, los requerimientos aumentan y

## Capítulo IV

### Discusión

ya no queda más energía disponible para otras funciones celulares (Alzamora y col., 1998). Este mecanismo impacta directamente sobre la fase lag o de adaptación de las bacterias A/P las cuales demoran más horas en alcanzar la fase de crecimiento exponencial si es que logran sobrevivir a la disminución del pH (Smulders y col., 1986).

Sin embargo, es necesario destacar que si bien el descenso del pH llegó hasta valores cercanos a 4,8 estos no fueron suficientemente bajos para actuar como restrictivos y explicar los efectos inhibitorios observados. Un factor que cabría tener en cuenta es que el pH alcanzado estuvo dentro del rango en el cual pueden crecer los microorganismos indicadores utilizados: *Escherichia coli* (pH= 4,5-9,0) *S. aureus* (pH= 4,0-9,5) y *Pseudomonas* spp. (puede verse inhibida a valores de pH inferiores a 5,0) (Jay, 1996). Esto indica que si bien el descenso de pH pudo haber afectado a las bacterias contaminantes, se puede intuir que existe algún otro tipo de mecanismo de inhibición, como por ejemplo la producción de bacteriocinas. Asimismo, debe considerarse el posible efecto sinérgico de los aditivos inhibidores utilizados en el SB, lo cual fue discutido anteriormente.

También es importante destacar que la concentración inicial del inóculo del SB es relevante para explicar estos efectos ya que la competencia por los nutrientes del medio permite que la bacteria con mayor capacidad de adaptarse y la que se halla en mayor número es la que podría dominar la etapa inicial del proceso. Esto indicaría que es necesaria una densidad celular inicial elevada para conseguir el efecto antagonista. Raccach y Baker (1978) citado por Jay (1996) en un estudio sobre inhibición del crecimiento *S. aureus* a 15 °C por *Pediococcus cerevisiae* y *L. plantarum* en carne de cerdo deshuesada mecánicamente y cocida, inocularon la BAL a una concentración de  $10^9$  UFC/mL, consiguiendo detener su crecimiento tanto si se inoculaba conjuntamente con una o con ambas BAL. De esta forma, la concentración del inóculo del SB que aproximadamente fue de 8 log UFC/ml pudo haber controlado el proceso de fermentación en las primeras horas, ya que los microorganismos A/P no pudieron desarrollarse durante las primeras 24 h manteniendo los recuentos del tiempo 0.

Esto a su vez se relaciona con la adaptabilidad de la cepa que conforma el SB de desarrollarse en este medio. Previamente se ha reportado la importancia de la elección de

## Capítulo IV

### Discusión

cepas que se adapten rápidamente y tengan una alta viabilidad en el medio donde se quiere aplicar demostrando que estas habilidades son cepa-dependiente (De Vuyst y col., 2008). Asimismo, se ha postulado que la selección de las especies predominantes en un alimento para luego incluirlas en cultivos biopreservadores es una excelente opción ya que si predominan en dicho sustrato es debido a que tienen mecanismos adecuados para hacerlo (Klingberg y col., 2005). Por este motivo, en la conformación del SB se incluyeron los mejores exponentes de las dos especies detectadas con mayor frecuencia en las muestras de sangre aviar obtenida en mataderos.

Respecto a los parámetros fisicoquímicos se detectó que el pH de la sangre con el SB, como era de esperar, descendió hasta valores menores de 5 a las 12 h de incubación. Como se mencionó previamente, la habilidad de las BAL para promover la preservación de los alimentos mediante la disminución del pH es una consecuencia directa de la producción de ácido láctico (Charlier y col., 2009).

Previamente se ha evaluado el efecto de la inoculación de BAL sobre la pérdida de funcionalidad de la sangre estudiando la hemólisis provocada por estas bacterias. La hemólisis es considerada responsable de generar malos olores y decoloración del producto (Lynn Knipe, 1988). Los resultados hallados en este trabajo concuerdan con lo descrito previamente por Dávila y col. (2006) donde se observó que la sangre de matadero bioconservada con BAL mantuvo sus valores de hemoglobina durante el ensayo. Sí se detectó hemólisis en las muestras sin las BAL, donde el aumento de la misma fue lineal tanto en nuestro experimento como en lo reportado por Dávila y col. (2006) debido posiblemente a la presencia de microorganismos hemolíticos.

Sin embargo, se observó cambio de color de las muestras siendo más oscuras las inoculadas con el SB. Esto pudo deberse a que la disminución del pH provocó que la hemoglobina se transforme en metahemoglobina el cual es un pigmento de color marrón oscuro. Estos resultados también fueron reportados por Zamora Rodriguez (2003) cuando a la sangre porcina obtenida en matadero se le agregó BAL y glucosa al 2% con el objeto de biopreservarla.

## **Capítulo IV**

### **Discusión**

#### *Conclusiones parciales*

- ✓ El SB logró retrasar y controlar el desarrollo de los microorganismos patógenos durante las primeras 24 h luego de la inoculación en sangre aviar obtenida en mataderos.
  
- ✓ El pH de la sangre inoculado con el SB pudo ser controlado de manera adecuada logrando que las muestras no coagulen y a su vez, que la acidez ejerza inhibición sobre los microorganismos contaminantes.
  
- ✓ El SB fue capaz de proteger la integridad de los glóbulos rojos evitando la hemólisis lo cual redundo en un producto final de mejor calidad.

## **DISCUSIÓN GENERAL**



## **Discusión general**

La transformación de sangre de matadero, la cual es considerada un residuo con alta DBO de las empresas faenadoras de animales (Tritt y Schuchardt, 1992), en un subproducto para la industria de los alimentos indica la necesidad de implementar diferentes medidas para lograr la inocuidad de la misma durante el procesamiento.

Para ello, se han investigado diferentes estrategias evaluando en una primera etapa realizar la recolección de sangre con sistemas cerrados con el objeto de evitar la contaminación externa. Posteriormente se estudiaron diferentes herramientas de tipo biotecnológicas intentando controlar o inhibir la microbiota contaminante. De esta forma, trabajos previos (Dávila y col., 2006; Toldrá y col., 2008) utilizaron BAL con el objetivo de biopreservar sangre porcina obtenida en mataderos a 5 y 15 °C hasta el momento de su procesamiento.

Este trabajo intenta brindar herramientas para las industrias locales, por lo que, durante el diseño de los ensayos, se tuvieron en cuenta las características de las mismas y la capacidad de adoptar este tipo de tecnología.

Se utilizó el concepto de Sistema de Biopreservación debido a que a las BAL, ampliamente conocidas por sus efectos benéficos sobre la preservación de alimentos (Ros y col., 2002; Schnurer y Magnusson, 2005), se les agregaron sustancias con la idea de favorecer una rápida adaptación al medio de las mismas lo que les permitió dominar el proceso de fermentación desde el inicio. Si bien existen trabajos previos donde Marland (1984) y Pinel (1985) utilizaron BAL y glucosa para preservar la sangre, se sabe que esta sustancia también podría favorecer el desarrollo de otros grupos bacterianos. Asimismo, Dávila y col. (2006) utilizaron inulina como fuente diferencial de hidratos de carbono para las BAL buscando mayor desarrollo de este grupo sobre el resto de los contaminantes.

A diferencia de las investigaciones previas, durante este trabajo experimental se utilizaron sustancias inhibidoras de la microbiota contaminante logrando en conjunto con los efectos propios generados por las BAL, controlar el desarrollo de los microorganismos A/P incubando la sangre a 30 °C. Asimismo, al evaluar la hemólisis como parámetro de calidad del producto se observó que la sangre biopreservada no sufrió cambios en este

### ***Discusión general***

aspecto. Estos resultados son alentadores y estimulantes para continuar con las investigaciones. La biopreservación durante las primeras 24 h quedó demostrada, pero sería necesario desarrollar nuevas investigaciones que permitan evaluar estrategias a utilizar para evitar el desarrollo posterior de la microbiota acompañante y de esta forma lograr biopreservar el producto hasta las 48 h.

Los datos generados por esta investigación permitirán contribuir en diversas áreas. Las industrias faenadoras de animales tendrán las herramientas necesarias para transformar con bajo costo, un desecho altamente contaminante en un subproducto que podrá comercializar con las empresas procesadoras de sangre. A su vez, estas últimas recibirán la materia prima con mejores parámetros microbiológicos y fisicoquímicos, lo que redundará en la obtención de un producto final de mejor calidad el que podrá vender a las demás industrias con un mejor precio. Asimismo, estas industrias dispondrán de más tiempo para realizar la recolección del subproducto, lo que generará una mejora en la logística de la misma.

Esta “reutilización” de la sangre animal permitirá además lograr incorporar a la cadena agroalimentaria un alto número de proteínas de alto valor biológico que, de otra manera, se perdían como residuos contaminantes del ambiente. Asimismo, el SB contribuirá a disminuir la presencia de bacterias patógenas en la sangre evitando de esta forma la diseminación de las mismas a lo largo de las cadenas de producción de alimentos que utilizan este subproducto.

## **CONCLUSIONES**

✓ La diversidad microbiana detectada en la sangre de matadero aviar fue alta y las concentraciones de los principales grupos bacterianos fue variable dependiendo de múltiples factores.

✓ Se conformó una colección de 232 BAL aisladas desde sangre aviar obtenida en mataderos las cuales fueron evaluadas fenotípica y genotípicamente detectándose 11 especies diferentes donde *E. faecalis* y *L. salivarius* fueron las más frecuentes.

✓ Se seleccionaron siete BAL mediante pruebas fenotípicas y capacidad inhibitoria para realizar las pruebas de cinética de crecimiento en sangre las cuales fueron todas sensibles a altas temperaturas.

✓ Se evaluaron diferentes aditivos para añadir a la sangre detectándose una combinación (1% NaCl, 0,4% CA, 0,4% de extracto de levadura y 2% de lactosa) que logró aumentar el tiempo de fase de latencia de los microorganismos A/P sin afectar en demasía a las BAL. Asimismo, se seleccionaron dos BAL (*E. faecalis* DSPV008 y *L. salivarius* DSPV032) que presentaron los mejores parámetros de crecimiento con los aditivos elegidos conformando el Sistema de Biopreservación.

✓ El sistema de biopreservación logró controlar el desarrollo de las bacterias A/P en sangre aviar obtenida en mataderos durante las primeras 24 horas del ensayo a 30 °C sin afectar la integridad de los glóbulos rojos.

# **BIBLIOGRAFÍA**

Abriouel, H.; Nabil Ben, O.; Lucas López, R.; Gálvez, A. (2008) *La doble faceta del género Enterococcus, y su importancia en alimentos*. On Line. [http://www.insacan.org/racvao/anales/2008/03\\_ANALES\\_2008\\_abriouel.pdf](http://www.insacan.org/racvao/anales/2008/03_ANALES_2008_abriouel.pdf)

Adams, M.R.; Halls, C.J. (1988) *Growth inhibition of food-borne pathogens by lactic acid and acetic acid and their mixtures*. Int. J. Food. Sci. Tech. 23: 287–292.

Alzamora, S.M.; Tapia, M.S.; Welti-Chanes, J. (1998). *New strategies for minimal processing of foods: the role of multi-target preservation*. Food Sci. Technol. Int. 4: 353–361.

Amezquita, A.; Brashears, M.M. (2002) *Competitive inhibition of Listeria monocytogenes in ready-to-eat meat products by lactic acid bacteria*. J. Food Prot. 65: 316–325.

Ammor, S.; Tauveron, G.; Dufour, E.; Chevallier, I. (2006). *Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility. 1- Screening and characterization of the antibacterial compounds*. Food Control, 17: 454–461.

Axelsson, L.T.; Chung, T.C.; Dobrogosz, W.J.; Lindgren, S.E., (1989) *Production of a broad spectrum antimicrobial substance by Lactobacillus reuteri*. Microb. Ecol. Health Dis. 2: 131–136.

Axelsson, L. (1990). *Lactobacillus reuteri a member of the gut bacterial flora*. Ph.D. Tesis, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden.

Aymerich M.T.; Hugas, M. (1998) *Estado actual de la bioconservación en productos cárnicos*. Eurocarne 72: 39-49.

Bah, C.S.F.; Bekhit, A.E.A.; Carne, A.; Mcconnell, M.A. (2013) *Slaughterhouse Blood: An Emerging Source of Bioactive Compounds*. Compr. Rev. Food Sci. F. 12: 314–331.

Bailey, J.S.; Thomson J.E.; Cox N.A. (1987) *Contamination of poultry during processing*. En: The Microbiology of Poultry Meat Products. (Eds.: Cunningham F.E. y Cox N.A.). Academic Press, Orlando, p. 193–211.

Barbosa-Cánovas, G.V.; Pothakamury, U.R.; Palou, E.; Swanson, B.G. (1997) *Nonthermal Preservation of Foods*. (Ed.: Marcel Dekker) New York, p 276 p.

Barrett, E.; Hayes, M.; O'Connor, P.; Gardiner, G.; Fitzgerald, G.F.; Stanton, C. (2007) *Salivaricin P, one of a family of two-component antilisterial bacteriocins produced by intestinal isolates of Lactobacillus salivarius*. Appl. Environ. Microbiol. 73: 3719-3723.

Benson, D.A.; Karsch-Mizrachi, L.; Lipman, D.J.; Ostell, J.; Rapp, B.A.; Wheeler, D.L. (2000) *GenBank*. Nucleic Acids. Res. 28: 15-18.

Bonanse, E.F. (2010) *Evaluación de la microbiota presente en sangre aviar obtenida en matadero*. Tesis de Licenciatura en Biotecnología, Facultad de Ciencias biológicas y Bioquímicas, Universidad Nacional del Litoral.

Botina, B.; Zimmermann, B.; Vanegas, M. (2008) *Caracterización preliminar de compuestos antilisteriales producidos por bacterias ácido lácticas nativas*. Rev.MVZ Córdoba 13(3):1476-1485.

Bover-Cid, S.; Holzapfel, W.H. (1999). *Improved screening procedure for biogenic amine production by lactic acid bacteria*. Int. J. Food Microbiol. 53: 33–41.

Brashears, M.M.; Reilly, S.S.; Gilliland, S.E. (1996) *Inhibitory actions of Lactobacillus lactis on Escherichia coli O157: H7 during storage at 7°C in broth on raw chicken meat*. <http://www.ansi.okstate.edu/research/1996rr/9.pdf>

Bredholt, S.; Nesbakken, T.; Holck, A. (1999) *Protective cultures inhibit growth of Listeria monocytogenes and Escherichia coli O157:H7 in cooked, sliced, vacuum- and gas packaged meat*. Int. J. Food Microbiol 53: 43–52

Brink T.B.; Damink, C.; Joosten, H.M.L.J. (1990) *Ocurrence and formation of biologically active amines in foods*. Int. J. Food Microbiol. 11: 73-84.

Buyong, N.; Kok, J.; Luchansky, J.B. (1998) *Use of a genetically enhanced, pediocin-producing starter culture, Lactococcus lactis subsp. lactis MM 217 to control Listeria monocytogenes in cheddar cheese*. Appl. Environ. Microbiol. 64: 4842-4845.

Cabeza Herrera, E. (2006). *Bacterias ácido lácticas: aplicaciones como cultivos estárter para la industria láctea y cárnica*. Simposio Regional de Microbiología “Microorganismos Eficientes en el Sector Productivo”, Universidad Libre, Barranquilla – Colombia. Septiembre 15 y 16 de 2006.

Cadness-Graves B.; Williams G.J.; Harper AA. (1943) *Slide test for coagulase positive staphylococci*. Lancet 1:736–738.

Carretero, C.; Parés, D. (2000) *Improvement of the microbiological quality of blood plasma for human consumption purposes*. Rec. Res. Develop. Agric. Food Chem. 4: 203–216.

Carvalho, A.S.; Silva, J.; Ho, P.; Teixeira, P.; Malcata, F.X.; Gibbs, P. (2002) *Survival of freeze-dried Lactobacillus plantarum and Lactobacillus rhamnosus during storage in the presence of protectants*. Biotechnol. Lett. 24: 1587–1591.

Carvalho, A.S.; Silva, J.; Ho, P.; Teixeira, P.; Malcata, F.X.; Gibbs, P. (2004) *Effects of various sugars added to growth and drying media upon thermotolerance and survival throughout storage of freeze-dried Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*. Biotechnol. Prog. 20: 248–254.

Charlier, C.; Cretenet, M.; Even, S.; Le Loir Y. (2009) *Interactions between Staphylococcus aureus and lactic acid bacteria: An old story with new perspectives*. Int. J. Food Microbiol., 131(1): 30–39.

Christiansen, P.; Waagner Nielsen, E.; Vogensen, F.K.; Brogren, C.H.; Ardo, Y. (2006) *Heat resistance of Lactobacillus paracasei isolated from semi-hard cheese made of pasteurised milk*. Int. Dairy J. 16: 1196–1204.

Chukeatirote A. (2003) *Potential use of probiotics*. Songklanakarin J. Sci. Technol. 25: 275-282.

Cotter, P.D.; Hill, C.; Ross, R.P. (2005) *Bacteriocins: developing innate immunity for food*. Nat. Rev. Microbiol. 3: 777-788.

Dávila, E.; Saguer, E.; Toldrá, M.,; Carretero, C.; Parés, D. (2006) *Preservation of porcine blood quality by means of lactic acid bacteria*. Meat Sc. 73(2): 386–93.

Dávila, E.; Parés, D.; Cuvelier, G.; Relkin, P. (2007) *Heat-induced gelation of porcine blood plasma proteins as affected by pH*. Meat Sc. 76(2): 216–25.

Dávila E. (2007) *Advances in animal blood processing: development of a biopreservation system and insights on the functional properties of plasma*. Ph. D. Tesis, University of Girona, Girona, Spain.

De Man, J. C.; Rogosa, M.; Sharpe, M. E. (1960) *A medium for the cultivation of lactobacilli*. J. Appl. Bacteriol. 23: 130–135,



De Vuyst, L.; Camu, N.; De Winter, T.; Vandemeulebroecke, K.; De Perre, V.V.; Vancanneyt, M.; De Vos, P.; Cleenwerck, I. (2008) *Validation of the (GTG)(5)-rep-PCR fingerprinting technique for rapid classification and identification of acetic acid bacteria, with a focus on isolates from Ghanaian fermented cocoa beans*. Int. J. Food Microbiol. 125: 79–90

De Vuyst, L.; Vandamme, E.J. (1994). *Antimicrobial potential of lactic acid bacteria*. En: Bacteriocins of lactic acid bacteria (Eds.: De Vuyst L. y Vandamme E.J.) London: Blackie academic and Professional, p. 91–142.

Del Hoyo, P.; Moure, F.; Rendueles, M.; Diaz, M. (2007) *Demineralization of animal blood plasma by ion exchange and ultrafiltration*. Meat Sci. 76(3):402-410.

Delavenne, E.; Ismail, R.; Pawtowski, A.; Mounier, J.; Barbier, G.; Le Blay, G. (2013) *Assessment of lactobacilli strains as yogurt bioprotective cultures*. Food Control, 30: 206-213.

Devlieghere, F.; Vermeiren, L.; Debevere, J. (2004) *New preservation technologies: possibilities and limitations*. Int. Dairy J. 14, 273–285.

Dierick, N.; Vanderkerckhove P.; Demeyer, O. (1974) *Changes in nonprotein nitrogen compounds during dry sausage ripening*. Food Sci. 39: 301-304.

Drider, D.; Fimland, G.; Héchar, Y.; McMullen, L.M.; Prévost, H. (2006) *The continuing story of class IIa bacteriocins*. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 70: 564–582

Ennahar, S.; Sashihara, T.; Sonomoto, K.Y; Ishiizaki, A. (2000) *Class IIa bacteriocins: biosíntesis, structure and activity*. FEMS Microbiol. Rev. 24: 85-106.

Erkkilä, S.; Petäjä, E. (2000) *Screening of commercial meat starter cultures at low pH and in the presence of bile salts for potential probiotic use*. Meat Sci 55: 297–300.

Eschenbach, D.A.; Davick, R.; Williams, B.L. (1989) *Prevalence of hydrogen peroxide-producing Lactobacillus species, normal women and women with bacterial vaginosis*. J. Clin Microbiol. 27: 251–6.

Fallows, S.J.; Verner Wheelock, J. (1982) *By-products from the U.K. food system: The meat industry*. Conserv. Recycl. 5: 173–82.

FAOSTAT. (2012) Food and Agriculture Organization of the United Nations. On Line: <http://faostat.fao.org>.

Flynn, S.; Sinderen, D.; Thornton, M.G.; Holo, H.; Nes, F.I.; Collins, K. (2002) *Characterization of the genetic locus responsible for the production of ABP-118, a novel bacteriocin produced by the probiotic bacterium Lactobacillus salivarius subsp. salivarius UCC118. Microbiol.*, 148: 973–984.

Foulquié-Moreno, M.R.; Sarantinopoulos, P.; Tsakalidou, E.; De Vuyst L. (2006) *The role and application of enterococci in food and health. Int J Food Microbiol.* 106(1):1-24.

Franz, C.M.; Worobo R.W.; Quadri L.E.; Schillinger U.; Holzapfel W.H.; Vederas J.C; Stiles M.E. (1999) *Atypical genetic locus associated with constitutive production of enterocin B by Enterococcus faecium BFE 900. Appl. Environ. Microbiol.* 65: 2170–2178

Franz, C.M.A.P.; Van Belkum, M.J.; Holzapfel, W.H.; Abriouel, H.; Galvez, A. (2007) *Diversity of enterococcal bacteriocins and their grouping in a new classification scheme. FEMS Microbiol Rev* 31: 293–310.

Ganzle, M.G.; Holtzel, A.; Walter, J.; Jung, G.; Hammes, W.P. (2000) *Characterization of reutericyclin produced by Lactobacillus reuteri LTH2584. Appl Environ Microbiol.* 66: 4233–4333.

Gilliland, S. (1990) *Health and nutritional benefits from lactic acid bacteria. FEMS Microbiol. Lett.* 87: 175-188.

Giraffa, G. (2002). *Enterococci from foods. FEMS Microbiol. Rev.* 26: 163–171.

Goksoy, E.O; Kirkan S.; Kok F. (2004) *Microbiological Quality of Broiler Carcasses During Processing in Two Slaughterhouses in Turkey. Poult. Sci.* 83: 1427–1432.

Gouesbet, G.; Jan, G.; Boyaval, P.; (2001) *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus thermotolerance. Dairy Sci. Tech.* 81: 301–309.

Guan L.L.; Hagen K.E.; Tannock G.W.; Korver D.R.; Fasenko G.M.; Allison G.E. (2003) *Detection and identification of Lactobacillus species in crops of broilers of different ages by using PCR-denaturing gradient gel electrophoresis and amplified ribosomal DNA restriction analysis. Appl. Environ. Microbiol.* 69(11): 6750–6757.

- Hall, V.; Lewis-Evans T.; Duerden B.I. (2001) *Identification of actinomyces, propionibacteria, lactobacilli and bifidobacteria by amplified 16S rDNA restriction analysis*. *Anaerobe* 7(2): 55–57.
- Halliday, D.A. (1973). *Blood :A source of proteins*. *Process. Biochem.* 8: 15-17.
- Hartemink R.; Domenech R.; Rombouts F.M. (1997) *LAMVAB A new selective medium for the isolation of lactobacilli from faeces*. *J. Microbiol. Methods.* 29: 77-84.
- Higginbotham, G.E.; Robison, J.D.; Atwill, E.R.; Das Gracas, C.; Pereira, M. (1998) *Effect of a direct Feed microbial product on calf performance and fecal flora*. *Prof. Anim. Sci.* 14: 108–113.
- Holtzel, A.; Ganzle, M.G.; Nicholson, G.J.; Hammes, W.P.; Jung, G. (2000) *The first low-molecular-weight antibiotic from lactic acid bacteria: reutericyclin, a new tetramic acid*. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 39: 2766–2768.
- Holzappel, W.; Geisen, R.; Schillinger, U. *Systematics of probiotic lactic bacteria with reference to modern phenotypic on genomic methods*. *Proceeding of Symposium Probiotics en Man and Animal*. Berlin, 20 al 22 de junio de 1995, p. 11.
- Hyun, C.K.; Shin, H.K. (1998) *Utilization of bovine blood plasma obtained from a slaughterhouse for economic production of probiotics*. *J. Ferment. Bioengr.* 86: 34–7.
- Iandolo, J.J.; Clark, C.W.; Bluhm, L.; Ordal, Z.J. (1965) *Repression of Staphylococcus aureus in associative culture*. *Appl. Microbiol.* 13: 646–649.
- Jackson, D.A.; Somers, K.M.; Harvey, H.H. (1989) *Similarity coefficients: measures of co- occurrence and association or simply measures of occurrence?*. *Amer. Nat.* 133: 436-453.
- Jaworska, D.; Neffe, K.; Kołozyn-Krajewska D.; Dolatowski, Z. (2011) *Survival during storage and sensory effect of potential probiotic lactic acid bacteria Lactobacillus acidophilus Bauer and Lactobacillus casei Bif3'IV in dry fermented pork loins*. *Int. J. Food Sci. Technol.* 46: 2491–7.
- Jay, J.M. (1996) *Microorganisms in fresh ground meats: the relative safety of products with low versus high numbers*. *Meat Sc.* 43: 59-66.
- Joosten, H.M.L.J.; Northolt, D.M. (1989) *Detection, growth, and amine- producing capacity of lactobacilli in cheese*. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 2356–2359.

Katusic, A. (2002) *Capacidad Antagonista Frente a Listeria monocytogenes de dos Sustancias Tipo Bacteriocina Utilizadas en Combinación con NaCl y CO<sub>2</sub>*. Tesis para optar el grado de Licenciado en Ingeniería de alimentos. Universidad Austral De Chile Facultad De Ciencias Agrarias Escuela De Ingeniería En Alimentos. Valdivia, Chile.

Kayser, F.H. (2003) *Safety aspects of enterococci from the medical point of view*. Int. J. Food. Microbiol. 88: 255–262.

Kim, M.; Chun, J. (2005) *Bacterial community structure in kimchi, a Korean fermented vegetable food, as revealed by 16S rRNA gene analysis*. Int. J. Food Microbiol. 103(S1): 91-96.

Klebanoff, S.J.; Hillier, S.L.; Eschenbach, D.A.; Waltersdorff, A.M. (1991) *Control of the microbial flora of the vagina by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-generating lactobacilli*. J. Infect. Dis. 164: 94–100.

Klein, G. (2003) *Taxonomy, ecology and antibiotic resistance of enterococci from food and the gastro-intestinal tract*. Int. J. Food Microbiol. 88: 123–131.

Klingberg, T.D.; Axelsson, L.; Naterstad, K.; Elsser, D.; Budde, B.B. (2005) *Identification of potential probiotic starter cultures for Scandinavian-type fermented sausages*. Int. J. Food Microbiol. 105: 419–31.

Kołożyn-Krajewska, D.; Dolatowski Z.J. (2012) *Probiotic meat products and human nutrition*. Process. Biochem. 47: 1761-1772

Kołożyn-Krajewska, D.; Dolatowski, Z.J.; Zielinska, D. (2011) *Risk assessment of probiotic use particularly in meat products – a review*. Fleischwirtschaft 4: 61–81.

Konings, W.N.; Lolkema, J.S.; Poolman, B. (1995) *The generation of metabolic energy by solute transport*. Arch. Microbiol. 164: 235-242.

Kotula, K.L.; Pandya Y. (1995) *Bacterial contamination of broiler chickens before scalding*. J. Food Prot. 58: 1326–1329.

Lian, W.; Hiao, H.; Chou, C. (2002) *Survival of bifidobacteria after spray-drying*. Int. J. Food Microbiol. 74 (1–2): 79–86.

Lindgren, S.E.; Dobrogosz, W.J.; (1990) *Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations*. FEMS Microbiol. Rev. 87: 149–163.

Liu, S.O.; Pritchard, G.G.; Hardman, M.J.; Pilone, G.J. (1995) *Occurrence of Arginine Deiminase Pathway Enzymes in Arginine Catabolism by Wine Lactic Acid Bacteria*. Appl. Environ. Microbiol. 61: 310-316.

Liu, D.C. (2002) *Better Utilization of by-Products from the Meat Industry* (<http://www.agnet.org/library/eb/515/>).

Lundblad R.L. (2005) *Considerations for the use of blood plasma and serum for proteomic analysis*. The Internet J. of Gen. Prot 1:2. DOI: 10.5580/26e.

Lynn Knipe, C. (1988). *Production and use of animal blood and blood proteins for human food*. En: *Advances in meat research* (Eds.: Pearson A.M. Dutson T.R.) New York: Elsevier Science Publishers, Ltd., Vol. 5, pp. 147–165.

Mariné-Font, A.; Vidal-Carou, M.C.; Izquierdo-Pulido, M.; Veciana-Nogués, M.T.; Hernández-Jover, T. (1995) *Les amines biogènes dans les aliments: leur signification, analyse*. Ann. Fals. Exp. Chim. Toxicol. 88: 119-140.

Marland, D. (1984) *Recuperation du sangsur ferments lactiques*. Revue Technique Veterinaire de Alimentation, 30–31.

Marth, E.H.; Steele, J.L. (2001) *Applied Dairy Microbiol* (2 ed.). (Ed: Taylor y Francis) New York: Basel. 744pp.

McGroarty, J.A.; Tomeczek, L.; Pond, D.C.; Reid, G.; Bruce, W. (1992) *Hydrogen peroxide production by Lactobacillus species: correlation with susceptibility to the spermicidal compound nonoxynol-9*. J. Infect. Dis. 165: 142–4.

Mead, G.C. (1989) *Hygiene problems and control of process contamination*. En: *Processing Poultry* (Ed.: Elsevier Applied Science) London, UK, p. 183–221.

Meng, X.C.; Stanton, C.; Fitzgerald, G.F.; Daly, C.; Ross, R.P. (2008) *Anhydrobiotics: the challenges of drying probiotic cultures*. Food Chem. 106: 1406–1416.

Messaoudi, S.; Kergourlay, G.; Dalgalarrodo, M.; Choiset, Y.; Ferchichi, M.; Prévost, H.; Manai, M. (2012) *Purification and characterization of a new bacteriocin active against Campylobacter produced by Lactobacillus salivarius SMXD51*. Food Microbiol. 32: 129–134.

Min, B.; Ahn, DU. 2005 *Mechanism of lipid oxidation in meat and meat products –a review*. Food Sci. Biotechnol. 14: 152–63.

Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca de la Nación (2012). On line: (<http://www.minagri.gob.ar>)

Moreira Dos Santos, W.L. (1993) *Aislamiento y caracterización parcial de una bacteriocina producida por Pediococcus sp. 347, de origen cárnico*. Tesis doctoral, Departamento de Nutrición y Bromatología III. Higiene y Tecnología de los Alimentos. Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid

Morgan, P. (1985) *Traitement du sang d’abattoir par conservateur biologique*. Actualité Co-Produits 92: 21.

Murray, M. G.; Thompson, W.F. (1980) *Rapid isolation of high molecular weight plant DNA*. Nucleic Acids. Res. 8: 4321-4325.

Nedjar-Arroume, N.; Dubois-Delval, V.; Adje, E.Y.; Traisnel, J.; Krier, F.; Mary, P.; Kouach, M.; Briand, G.; Guillochon, D. 2008. *Bovine hemoglobin: an attractive source of antibacterial peptides*. Peptides 29: 969–77

Neffe, K.; Kołozyn-Krajewska, D. (2010) *Potential uses of probiotic bacteria in ripening meat products*. Żywn-Nauk. Technol. Ja. 5(72): 167–77.

Nowak, B.; Von Mueffling, T. (2006) *Porcine blood cell concentrates for food products: hygiene, composition, and preservation*. J. Food Prot. 69(9): 2183-2192.

Ockerman, H. W., Hansen, C. L. (1994) *Animal by-product processing*. (Ed: Ellis Horwood), England:, p 397.

Ofori, J.A.; Hieh Y.H.P. (2012) *The Use of Blood and Derived Products as Food Additives, Food Additive*, (Ed.: Prof. Yehia El-Samragy) <http://www.intechopen.com/books/food-additive/the-use-of-blood-and-derived-products-as-food-additives>

Parés, D. (1995) *Caracterització bioquímica i microbiològica de sang porcina d’escorxadors industrials per determinar la seva aptitud com a matèria primera en l’elaboració d’aliments destinats al consum humà*. Trabajo final del Doctorado de Microbiología y Bioquímica aplicadas. Universidad de Girona, España.

Parés, D.; Carretero, C. (1996) *Influencia de algunos factores sobre el grado de hemolisis de la sangre porcina de mataderos industriales*. Alimentaria 4: 65–69.

Parés, D.; Carretero, C. (1997) *La sangre de matadero: subproducto de la industria cárnica*. Cárnica 2000: 49-54.

Piard, J.C.; Desmazaud M. (1991) *Inhibition factors produced by lactic acid bacteria. 1. Oxygen metabolites and catabolism end-products*. Dairy Sci. Tech. 71: 525-541.

Pierce, J.L.; Cromwell, G.L.; Lindemann, M.D.; Russell, L.E.; Weaver E.M. (2005) *Effects of spray-dried animal plasma and immunoglobulins on performance of early weaned pigs*. J. Anim. Sci. 83:2876–85.

Pinel, M. (1985). *État des techniques de traitement du sang*. Viandes et Produits. Carne's 6(2): 53–57.

Rabe, L.K.; Hillier, S.L. (2003) *Optimization of Media for Detection of Hydrogen Peroxide Production by Lactobacillus Species*. Soc., 41(7): 3260–3264.

Raccach, M.; Baker, R.C. (1978) *Lactic acid bacteria as an antispoilage and safety factor in cooked, mechanically deboned poultry meat*. J. Food Prot. 43: 837-841.

Ribot, D.E. (2006) *Advances in animal blood processing: development of a biopreservation system and insights on the functional properties of plasma*. Tesis doctoral. Departament d'Enginyeria Química Agr{ria i Tecnologia Agroalimentaria Institut de Tecnologia Agroalimentària. Universitat de Girona.

Rodríguez, M.L. (1994) *Bacterias productoras de ácido láctico: efectos sobre el crecimiento y la flora intestinal de pollos, gazapos y lechones*, Tesis doctoral, Facultad de veterinaria. Universidad Complutense de Madrid.

Ross, R.P.; Morgan S.; Hill C. (2002). *Preservation and fermentation: past, present and future*. Int. J. Food Microbiol. 79 (S1-2): 3-16.

Ruiz-Moyano S.; Martín A.; Benito MJ.; Hernández A.; Casquete R.; Córdoba M.G. (2011) *Application of Lactobacillus fermentum HL57 and Pediococcus acidilactici SP979 as potential probiotics in the manufacture of traditional Iberian dry-fermented sausages*. Food Microbiol. 28: 839–847.

SAGPyA,. (2010) *Guía básica para exportar carne aviar y sus subproductos* On Line: <http://www.alimentosargentinos.gov.ar/contenido/publicaciones/calidad/Guias/GT-Avicola.pdf>

Fort, N.; Sagner, E.; Dávila, E.; Carretero, C.; Parés, D. (2007) *Meat effectiveness of high pressure processing on the hygienic and technological quality of porcine plasma from biopreserved blood. Meat Sci.* 76: 189–193.

Schillinger, U.; Lücke, F. (1987) *Identification of lactobacilli from meat and meat products.* Food Microbiol. 4: 199-208.

Schillinger, U.; Lucke, F.K. (1990) *Lactic acid bacteria as protective cultures in meat products.* Fleischwirtsch 70: 1296–1299.

Schillinger, U.; Lücke, F. (1989) *Antibacterial activity of Lactobacillus sake isolated from meat.* App. Env. Microbiol. 55: 1901-1906.

Schneider, R. (2005) *Caracterización bioquímica y molecular de las bacteriocinas producidas por Pediococcus parvulus MXVK133 y Enterococcus faecalis MXVK22 aisladas de productos cárnicos mexicanos.* Tesis doctoral, División de Ciencias Introducción Biológicas y de la Salud. Departamento de Biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana, Distrito Federal, México.

Schnürer, J.; Magnusson, J. (2005) *Antifungal lactic acid bacteria as biopreservatives.* Trends Food Sci. Technol. 16: 70–78.

Signorini, M.L.; Ponce-Alquicira E.; Guerrero-Legarreta I. (2006) *Effect of lactic acid and lactic acid bacteria on growth of spoilage microorganisms in vacuum-packaged beef.* J. Muscle. Foods 17: 277-290.

Simpson, J.M.; McCracken, V.J.; Gaskins, H.R.; Mackie, R.I. (2000) *Denaturing gradient gel electrophoresis analysis of 16S ribosomal DNA amplicons to monitor changes in fecal bacterial populations of weaning pigs after introduction of Lactobacillus reuteri strain MM53.* Appl. Environ. Microbiol. 66: 4705-4714.

Simpson, P.J.; Stanton, C.; Fitzgerald, G.F.; Ross, R.P. (2005) *Intrinsic tolerance of Bifidobacterium species to heat and oxygen and survival following spray drying and storage.* J. Appl. Microbiol. 99: 493–501.



Smulders, F.J.M.; Barendsen, P.; Van Logtestijn, J.G.; Mossel, D.A.A.; Van Der Marel, G.M. (1986) *Lactic acid: consideration in favour of its acceptance as a meat decontaminant*. J. Food Tech. 21: 419–436.

Soto, L.; Frizzo, L.; Bertozzi, E.; Avataneo, E.; Sequeira, G.; Rosmini, M. (2010) *Molecular Microbial Analysis of Lactobacillus Strains Isolated from the Gut of Calves for Potential Probiotic Use*. Vet.Med. Int. On line: <http://www.hindawi.com/journals/vmi/2010/274987/>.

Stern, N.J.; Svetoch, E.A.; Eruslanov, B.V.; Perelygin, V.V.; Mitsevich, E.V.; Mitsevich, I.P.; Pokhilenko, V.D.; Levchuk, V.P.; Svetoch, O.E.; Seal, B.S. (2006) *Isolation of a Lactobacillus salivarius strain and purification of its bacteriocin, which is inhibitory to Campylobacter jejuni in the chicken gastrointestinal system*. Antimicrob. Agents Chemother. 50: 3111-3116.

Suzzi, G.; Gardini, F. (2003) *Biogenic amines in dry fermented sausages: a review*. Int. J. Food Microbiol. 88: 41-54.

Svetoch, E.A.; Eruslanov, B.V.; Levchuk, V.P.; Perelygin, V.V.; Mitsevich, E.V.; Mitsevich, I.P.; Stepanshin, J.; Dyatlov, I.; Seal, B.S; Stern, N.J. (2011) *Isolation of Lactobacillus salivarius 1077 (NRRL B-50053) and characterization of its bacteriocin, including the antimicrobial activity spectrum*. Appl. Environ. Microbiol. 77: 2749-2754

Toldrá, F.; Reig, M. *Innovations for healthier processed meats*. (2011) Trends Food Sci. Technol. 22: 517–22.

Toldrá, F.; Aristoy, M.C.; Mora, L.; Reig, M. (2012). *Innovations in value-addition of edible meat by-products*. Meat Sci. 92: 290–6.

Toldrá, M.; Dávila, E.; Saguer, E.; Fort, N.; Salvador, P.; Parés, D.; Carretero, C. (2008) *Functional and quality characteristics of the red blood cell fraction from biopreserved porcine blood as influenced by high pressure processing*. Meat Sci. 80: 380-388.

Tritt, W.P.; Schuchardt, F. (1992) *Materials flow and possibilities of trating liquid and solid wastes from slaughterhouses in Germany. A review*. Bioresour. Technol. 41: 235-245.

Tybor, P.T; Dill, C.W.; Landmann, W.A. (1975) *Functional Properties of Proteins Isolated from Bovine Blood by a Continuous Pilot Process*. J. Food Sci. 40(1): 155-159.

Vancanneyt, M.; Lombardi, C.; Andrighetto, E.; Knijff, S.; Torriani, K.J.; Bjorkroth, C.M.; Franz, M.R.; Foulque Moreno, H.; Revets, L.; De Vuyst, J.; Swings, K.; Kersters, F.; Dellaglio, W.H.; Holzapfel, W. (2002) *Intraspecies genomic groups in Enterococcus faecium and their correlation with origin and pathogenicity*. Appl. Environ. Microbiol. 68: 1381-1391.

Vera Pingitore, E.; Hébert, E.M.; Nader-Macías, M.E.; Sesma, F. (2009) *Characterization of salivaricin CRL 1328, a two-peptide bacteriocin produced by Lactobacillus salivarius CRL 1328 isolated from the human vagina*. Res. Microbiol. 160: 401-408.

Vermeiren L.; Devlieghere F.; Debevere J. (2004) *Evaluation of meat born lactic acid bacteria as protective cultures for the biopreservation of cooked meat products*. Int. J. Food Microbiol. 96: 149–164.

Vesterlund, S.; Vankerckhoven, V.; Saxelin, M.; Goossens, H.; Salminen, S.; Ouwehand, A.C. (2007) *Safety assessment of Lactobacillus strains: Presence of putative risk factors in faecal, blood and probiotic isolates*. Int. J. Food Microbiol. 116: 325-331.

Wanasundara, P.K.J.P.D.; Ross, A.R.S.; Amarowicz, R.; Ambrose, S.J.; Pegg, R.B.; Shand, P.J. (2002) *Peptides with angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory activity from defibrinated, hydrolyzed bovine plasma*. J. Agric. Food Chem. 50: 6981–6988.

Wei, J.T.; Chiang, B.H. (2009) *Bioactive peptide production by hydrolysis of porcine blood proteins in a continuous enzymatic membrane reactor*. J. Sci. Food Agric. 89: 372–378.

Wismer-Pedersen, J. (1988) *Use of haemoglobin in foods: A review*. Meat Sci. 24: 31–45.

Wood, B.J.B.; Holzapfel, W.H. (1996) *The genera of lactic acid bacteria*. (Ed: Blackie academic and professional), London, England, p 420.

Zamora Rodríguez, L.M. (2003) *Aislamiento, identificación y conservación de cultivos de bacterias lácticas antagonistas de microbiota contaminante de sangre de*

*matadero*. Tesis doctoral, Departament d'Enginyeria Química Agraria i Tecnologia Agroalimentària Institut de Tecnologia Agroalimentària. Universitat de Girona.

Zamora Rodriguez, L.M. (2006) *Comparative Survival Rates of Lactic Acid Bacteria Isolated from Blood, Following Spray-drying and Freeze-drying*. *Food Sci. Technol. Int.* 12(1): 77–84.

Ziemer, C.; Cotta, M.; Whitehead, T. (2004) *Application of group specific amplified rDNA restriction analysis to characterize swine fecal and manure storage pit samples*. *Anaerobe* 10: 217-227.

Zoetendal, E.G.; Vaughan, E.E.; De Vos, W.M. (2006) *A microbial world within us*. *Mol. Microbiol.* 59: 1639–1650.