

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL

Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas



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

**BACTERIAS LÁCTICAS AUTÓCTONAS
PARA LA PROMOCIÓN DE LA OFERTA
TECNOLÓGICA DE ALIMENTOS
FERMENTADOS DE ORIGEN VEGETAL**

Lic. Melisa Anahí Puntillo

Director de Tesis: Dr. Gabriel Vinderola

Co-director de Tesis: Dr. Ariel Massera

Instituto de Lactología Industrial (INLAIN, UNL–CONICET)

- 2022 -

Agradecimientos

A la Universidad Nacional del Litoral y, particularmente, a la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, por la oportunidad de realizar mis estudios de grado y postgrado.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), por brindarme la posibilidad de realizar este trabajo de Tesis a través de su programa de becas doctorales.

A los miembros del jurado, por el tiempo e interés dedicados a la evaluación de la presente Tesis.

A mi director, el Dr. Gabriel Vinderola, por confiar en mí y motivarme continuamente a lo largo de este camino.

A mis co-directores Roxána Páez y el Dr. Ariel Massera, por la colaboración, consejos y ayuda en este trabajo.

Al Dr. Jorge Reinheimer y a la Dra. Andrea Quiberoni, por abrirme las puertas del INLAIN, compartirme sus enriquecedoras experiencias y brindarme su apoyo.

Al programa Erasmus por mi estadía en Finlandia. Al Dr. Seppo Salminen por permitirme desarrollar parte importante del trabajo en el Functional Food Forum, y a todo su grupo por su buena predisposición.

A la Dra. Mónica Gaggiotti, Dr. Juan Martín Oteiza, Dra. María Julia Spotti, Dra. María Paula Huber y al Dr. Guillermo Peralta, por su gran colaboración en las distintas etapas de esta Tesis.

A la Dra. Patricia Burns y a la Dra. Ana Binetti, por brindarme su ayuda, experiencia y consejos cada vez que lo necesité, siempre con la mejor predisposición.

A TODOS mis compañeros del INLAIN, personas con la que compartí muchas horas diarias, tanto de actividades laborales, como de charlas. Gracias especialmente a Desi, por ser esa loca linda que me brindó una mano desde el principio y en todo momento. A Eli por su paciencia y por las largas charlas en compañía de litros de mates. A Sofi, por el tiempo compartido, en especial en los primeros años de doctorado. A Sol por su practicidad y ayuda. A Dani, Manqui, Lu, Gabi, Flor, Vivi, Diego, y a todos aquellos que están, o alguna vez estuvieron en el INLAIN, seguro aprendí algo de cada uno.

A Flor Z. por su gran ayuda, por sus consejos, por bancarme en los viajes, y por los improvisados, y no tanto, “after lab”.

A mis HERMANAS de la vida, por el amor infinito que me brindan en cada momento, bueno o malo... A mis amigas/os que están siempre presentes, bancándome, compartiendo su tiempo conmigo... mas allá de cualquier circunstancia... son un hermoso regalo.

A mi inmensa familia... A mis hermanos, por estar desde el primer instante de mi vida. A Benja, mi terremoto, por un amor tan puro. Gracias en especial a mi dulce y valiente viejita, tan llena de amor... gracias por ser la madre más maravillosa que la vida me pudo haber dado. A mi viejo, por protegerme siempre... desde donde sea que estés. Gracias a mi gran amor, gracias mi patón, por tu compañía, tu inmenso amor, tu respeto, tu paciencia, tu apoyo incondicional, y por todo lo que ya sabes y no hace falta decir...

Gracias a la vida... por darme el privilegio de compartir el camino con personas tan maravillosas...

Aportes científico-tecnológicos

Publicaciones en revistas internacionales

- Burns, P., Borgo, M.F., Binetti, A., Puntillo, M., Bergamini, C., Páez, R., Mazzoni, R., Reinheimer, J., Vinderola, G. (2018). Isolation, characterization and performance of autochthonous spray dried lactic acid bacteria in maize micro and bucket-silos. *Frontiers in Microbiology*. 9 (2861). doi: 10.3389/fmicb.2018.02861
- Puntillo, M., Gaggiotti, M., Oteiza, J.M., Binetti, A., Massera, A., Vinderola, G. (2020). Potential of lactic acid bacteria isolated from different forages as silage inoculants for improving fermentation quality and aerobic stability. *Frontiers in Microbiology*. 11(586716). doi: 10.3389/fmicb.2020.586716
- Siroli, L., Burns, P., Borgo, F., Puntillo, M., Drago, S., Forzani, L., D' Alessandro, M.E., Reinheimer, J., Perotti, C., Vinderola, G. (2021). Sex-dependent effects of a yoghurt enriched with proteins in a mouse model of diet-induced obesity. *International Dairy Journal*. 114(104914). doi: 10.1016/j.idairyj.2020.104914
- Puntillo, M., Spotti, J., Salminen, S., Vinderola, G. (2021). Narrowing down the number of potential plant-based probiotic candidates by successive *in vitro*, technological and *in vivo* assays. *Beneficial Microbes*. 12(4):351-364. doi: 10.3920/BM2020.0228
- Puntillo, M., Vinderola, G. (2021). Impacto de los alimentos fermentados en la microbiota intestinal. *Anales de Microbiota Probióticos Prebióticos*. IV Simposio Internacional de Microbiota y Probióticos. 2021;2(1):109-112.
- Puntillo, M., Segli, F., Champagne, C.P., Raymond, Y., Vinderola, G. (2021). Functional microbes and their incorporation into food supplements: probiotics and postbiotics. *Annual Review of Food Science and Technology*. En prensa.

Capítulos de libro

- Ale, E.C., Puntillo, M.A., Rojas, M.F. and Binetti, A.G. (2021). EPS from lactobacilli and bifidobacteria: Microbial metabolites with both technological and health-promoting properties. *Biomolecules from Natural Sources: Advances and Applications*. Gupta, V.K., Sarker, S.D., Sharma, M., Pirovani, M.E., Usmani, Z. and Jayabaskaran, C. (Ed.), Wiley-Blackwell, UK, ISBN: 978-1-119-76957-6. En prensa.

Peralta, G., Meinardi, C., Bergamini, C., Puntillo, M., Quiberoni, A., Guglielmotti, D., Wolf, V., Hynes, E. (2022). Los quesos argentinos de mayor difusión (Cap. 4). *Los quesos argentinos. Producción, características y nuevas propuestas*. Jorge Reinheimer (Ed.). Ediciones UNL. En prensa

ÍNDICE

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS	1
RESUMEN	2
ABSTRACT	5
INTRODUCCIÓN GENERAL	8
1. BACTERIAS LÁCTICAS	9
1.1 Generalidades	9
1.2 Clasificación taxonómica	9
1.3 Metabolismo de carbohidratos	11
1.4 Distribución ambiental de bacterias lácticas	13
1.5 Alimentos fermentados	14
1.5.1 Bacterias lácticas en alimentos fermentados	14
1.5.2 Alimentos fermentados y sus beneficios	16
1.6 Bacterias lácticas como probióticos	17
2. BACTERIAS LÁCTICAS EN ALIMENTOS PLANT-BASED	19
2.1 Alimentos fermentados <i>plant-based</i>	19
2.2 Tipos de fermentaciones	20
2.2.1 Fermentación espontánea: microbiota epífita.....	20
2.2.2 Fermentación controlada: cultivos <i>starter</i>	21
2.3 Consumo de productos fermentados en Argentina	21
2.3.1 Vegetales fermentados	21
2.3.2 Bebidas fermentadas	22
3. BACTERIAS LÁCTICAS EN ENSILADOS	24
3.1 Ensilado y su importancia en Argentina	24
3.2 Fases del ensilado	24
3.2.1 Fase aeróbica	24
3.2.2 Fase anaeróbica	25
3.2.3 Fase estable.....	26
3.2.4 Fase de apertura del silo.....	26
3.3 Forrajes	27
3.4 Parámetros químicos indicadores de la calidad del silaje	27
3.5 Bacterias lácticas como inoculantes para ensilado	28
3.5.1 Bacterias lácticas homofermentativas	29
3.5.2 Bacterias lácticas heterofermentativas	29

3.6 Inoculantes comerciales	29
3.7 Técnicas NGS aplicadas en ensilados	33
3.8 Bacterias lácticas como probióticos en rumiantes	34
OBJETIVOS	36
Objetivo General	36
Objetivos específicos	36
CAPÍTULO 1	37
AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS LÁCTICAS A PARTIR DE MATERIAL VEGETAL	37
1. INTRODUCCIÓN	38
2. OBJETIVOS	40
3. MATERIALES Y MÉTODOS	41
3.1 Aislamiento de bacterias lácticas a partir de sustratos vegetales	41
3.1.1 Recolección de muestras y confección de micro-silos para fermentación espontánea.....	41
3.1.2 Aislamiento de bacterias lácticas.....	41
3.2 Identificación de los aislamientos por MALDI-TOF	42
3.3 Caracterización y selección de cepas de <i>L. plantarum</i>	42
3.3.1 Capacidad de crecimiento de <i>L. plantarum</i> en medio extracto vegetal	42
3.3.2 Confirmación de identidad y diversidad genotípica de las cepas de <i>L. plantarum</i>	43
3.3.3 Evaluación de cepas de <i>L. plantarum</i> como inoculante en micro-silos	44
3.4 Selección de BAL heterofermentantes	46
3.4.1 Producción de ácido láctico y acético	46
3.4.2 Estabilidad aeróbica en micro-silos de maíz.....	46
3.5 Análisis estadístico	47
4. RESULTADOS	49
4.1 Aislamiento de BAL a partir de material vegetal e identificación de los aislados por MALDI-TOF	49
1.1.1.....	50
4.2 Capacidad de desarrollo de aislamientos de <i>L. plantarum</i> en MEV: selección y confirmación de identidad	51
4.3 Dosis-respuesta de <i>L. plantarum</i> en ensilados de maíz	59
4.4 Capacidad de cepas de <i>L. plantarum</i> de fermentar sustratos diferentes del que fueron aisladas	61

4.5 Bacterias ácido lácticas heterofermentantes	65
4.5.1 Selección de cepas heterofermentantes	65
4.5.2 Estabilidad aeróbica de silos de maíz	65
5. DISCUSIÓN	68
6. CONCLUSIONES	74
CAPÍTULO 2	75
METAPROFILING DE SILOS DE SORGO INOCULADOS CON BACTERIAS LÁCTICAS	75
1. INTRODUCCIÓN	76
2. OBJETIVOS	78
3. MATERIALES Y MÉTODOS	79
3.1 Bacterias lácticas	79
3.2 Confección de micro-silos	79
3.3 Análisis microbiológico y fisicoquímicos	79
3.4 Determinación de la composición bacteriana por secuenciación del gen 16S ARNr	80
3.4.1 Extracción y aislamiento del ADN total	80
3.4.2 Secuenciación del gen 16S ARNr	80
3.4.3 Análisis bioinformático de los datos de secuenciación masiva	80
3.5 Estudio de las poblaciones celulares por citometría de flujo	81
3.6 Ensayo de sobrevivencia contra la infección por <i>Salmonella Typhimurium</i>	82
3.6.1 Animales	82
3.6.2 <i>Salmonella Typhimurium</i>	82
3.6.3 Ensayo de sobrevivencia	82
3.7 Análisis estadístico	83
4. RESULTADOS	84
4.1 Análisis microbiológico y fisicoquímico de los ensilados de sorgo	84
4.2 Análisis de la comunidad bacteriana de los ensilados de sorgo	85
4.2.1 Secuenciación del gen 16S ARNr	85
4.2.2 Análisis de la diversidad bacteriana	85
4.2.3 Análisis de la composición bacteriana	87
4.3 Citometría de flujo	94
4.4 Ensayo de sobrevivencia a la infección por <i>Salmonella</i>	95
5. DISCUSIÓN	96
6. CONCLUSIONES	101
CAPÍTULO 3	102

SELECCIÓN DE BACTERIAS LÁCTICAS CON POTENCIAL PROBIÓTICO MEDIANTE ENSAYOS <i>IN VITRO</i>, TECNOLÓGICOS E <i>IN VIVO</i> SUCESIVOS	102
1. INTRODUCCIÓN.....	103
2. OBJETIVOS	104
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	105
3.1 Bacterias lácticas	105
3.2 Co-cultivo de BAL con macrófagos murinos	105
3.2.1 Línea celular y condiciones de co-cultivo	105
3.2.2 Cuantificación de IL-10	106
3.2.3 Determinación de citoquinas mediante análisis multiplex	106
3.3 Producto fermentado en base a avena	106
3.3.1 Fermentación de avena con <i>L. plantarum</i> LpAv	106
3.3.2 Caracterización reológica del producto de avena fermentado con <i>L. plantarum</i> LpAv	107
3.4 Fermentación de zanahoria con <i>L. plantarum</i> LpAv	108
3.5 Ensayo de sobrevida contra la infección por <i>Salmonella</i> Typhimurium	108
3.5.1 Animales	108
3.5.2 <i>Salmonella</i> Typhimurium.....	109
3.5.3 Ensayo de sobrevida.....	109
3.6 Análisis estadístico.....	110
4. RESULTADOS	112
4.1 Potencial inmunomodulador de las BAL	112
4.2 Producto fermentado en base a avena	114
4.2.1 Análisis microbiológico y valores de pH de la avena fermentada por <i>L. plantarum</i> LpAv	114
4.2.2 Caracterización reológica de la avena fermentada.....	116
4.3 Análisis microbiológico y determinación de pH de las zanahorias fermentadas.....	118
4.4 Ensayo de sobrevida a la infección por <i>Salmonella</i> Typhimurium	119
5. DISCUSIÓN.....	121
6. CONCLUSIONES	127
CONCLUSIONES GENERALES	128
BIBLIOGRAFÍA.....	130
MATERIAL SUPLEMENTARIO	144

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

BAL: Bacterias Ácido Lácticas

Cz: Cenizas

DO: Densidad Óptica

EE: Extracto Etéreo

FAO: siglas en inglés de *Food and Agriculture Organization*

FDAs: Fibra Detergente Ácido

FDNa: Fibra Detergente Neutro

GRAS: siglas en inglés de *Generally Recognized As Safe*

HCCA: ácido α -ciano-4-hidroxicinámico

HPLC: siglas en inglés de *High Performance Liquid Chromatography*

INF γ : INterFerón gamma

ISAPP: siglas en inglés de *International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics*

MALDI-TOF MS: siglas en inglés de *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time Of Flight Mass Spectrometry*

MEA: Medio Extracto de Avena

MEAl: Medio Extracto de Alfalfa

MEM: Medio Extracto de Maíz

MES: Medio Extracto de Sorgo

MEV: Medio Extracto Vegetal

MS: Materia Seca

NGS: siglas en inglés de *Next Generation Sequencing*

N-NH₃/NT: Nitrógeno amonio/Nitrógeno total

OMS: Organización Mundial de la Salud

OTUs: siglas en inglés de *Operational Taxonomic Units*

PB: Proteína Bruta

TNF- α : siglas en inglés de *Tumor Necrosis Factor alfa*

TPA: siglas en inglés de *Texture Profile Analysis*

ufc: unidades formadoras de colonias

UPGMA: siglas en inglés de *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Average*

λ : fase lag

μ max: tasa máxima de crecimiento

η _{app}: viscosidad aparente

RESUMEN

Las bacterias lácticas han estado relacionadas a la fermentación de alimentos desde épocas muy antiguas, siendo la preservación de los mismos su objetivo principal. A partir de la revolución industrial, principalmente, este método microbiano complejo fue reemplazado por métodos físicos y químicos de conservación. Aun así, las características sensoriales que brinda la fermentación son únicas, y el consumo de alimentos fermentados está fuertemente arraigado a aspectos culturales, principalmente en países asiáticos y africanos, por lo que existe una enorme variedad de estos productos, tanto de origen animal como vegetal. En los últimos años se ha sugerido que el consumo de estos alimentos traería numerosos beneficios para la salud, más allá de la nutrición, debido a la presencia de microorganismos vivos y/o a compuestos bioactivos producidos por los mismos. Por esto, la inclusión de los productos fermentados en las guías alimentarias de algunos países está en evaluación, haciendo énfasis en el hecho de que pueden ser una fuente de microorganismos seguros y potencialmente benéficos. Aunque la población argentina no está acostumbrada al consumo de estos alimentos, más allá de yogur y quesos, en los últimos años se ha observado un aumento en el interés de las personas por su alimentación, ya sea por la búsqueda de un estilo de vida más saludable o por el aumento de alergias y/o intolerancias alimentarias. Esto ha conducido a una tendencia creciente en el consumo de alimentos y bebidas fermentadas, como kéfir, kombucha, chucrut, kimchi o pan de masa madre. La principal limitante en la producción de muchos de estos productos es que están relacionados a una elaboración tradicional casera, llevada a cabo por la fermentación espontánea o por *back slopping*. La producción a gran escala requiere un control y estandarización del proceso que permita asegurar la calidad y seguridad del producto, para lo cual pueden utilizarse cultivos iniciadores compuestos principalmente por bacterias lácticas seleccionadas. Otra importante aplicación de este grupo de bacterias en la fermentación de sustratos vegetales es como inoculantes para ensilajes, destinados a la alimentación animal. Este es un método de conservación de forrajes utilizado en distintas partes del mundo, que permite el suministro continuo de alimento de calidad al ganado a lo largo de todo el año. Si bien la fermentación del forraje puede ocurrir espontáneamente luego de ser ensilado, principalmente en aquellos sustratos ricos en carbohidratos, el uso de inoculantes puede evitar grandes pérdidas económicas y aumentar el rendimiento animal. Si bien existen algunos productos desarrollados en nuestro país, el mercado de inoculantes comerciales está liderado por empresas extranjeras. Además, el consumo de bacterias lácticas podría tener también beneficios sobre la salud de los animales, aunque esto ha sido mayormente estudiado a nivel ruminal y poco se conoce sobre sus efectos a nivel intestinal.

Basándonos en la distribución ubicua de las bacterias lácticas en la naturaleza, y en que la filósfera constituye una importante fuente para el aislamiento de nuevas cepas, en el primer

capítulo de esta Tesis se realizó el aislamiento de bacterias lácticas a partir de sustratos vegetales, principalmente forrajes. Además, se llevó a cabo la identificación y caracterización de los aislamientos en base a su potencial aplicación como inoculantes para ensilajes. Se obtuvieron 129 aislamientos de BAL a partir de alfalfa, maíz, sorgo, *ryegrass*, arroz, cebada, *Gatton panic*, *Mellilotus albus*, soja, trébol blanco, trigo, girasol, avena y moha. Cuatro cepas de *Lactobacillus plantarum*, aislados a partir de avena (LpAv), alfalfa (LpA3), sorgo (LpS13) y maíz (LpM15), fueron seleccionadas en base a su capacidad de crecimiento en medio extracto vegetal. Se confirmó su identidad por secuenciación del gen 16S ARNr y su diversidad por RAPD-PCR. Se estudió además la capacidad fermentativa de estas cuatro cepas en minisilos de maíz, inoculados en distintas dosis (10^4 , 10^5 , 10^6 y 10^7 ufc/g). Posteriormente, se analizó la capacidad de fermentación “cruzada” de las cepas en minisilos de avena, alfalfa, sorgo y maíz. Independientemente del origen de aislamiento, *L. plantarum* LpAv, LpA3, LpS13 y LpM15, inoculados en una tasa de 10^6 ufc/g, fueron efectivas en los ensilajes de los cuatro forrajes. Por otro lado, los aislamientos de bacterias lácticas heterofermentantes que produjeron mayores concentraciones de ácido acético en medio MRS, confirieron un aumento de estabilidad aeróbica a minisilos de maíz. Particularmente *Lactobacillus fermentum* LfM1 demostró potencial para su uso como inoculante, ya que los niveles de ácido acético en ensilajes inoculados con esta cepa fueron similares a aquellos inoculados con *Lactobacillus buchneri* Ls141, una cepa utilizada en un inoculantes comercial.

En el segundo capítulo de esta Tesis nos propusimos el estudio de la dinámica bacteriana en silos de sorgo inoculados con 3 cepas de bacterias lácticas con potencial inmunomodulador (*L. plantarum* LpAv, *Pediococcus pentosaceus* PpM y *Lactobacillus paracasei* LcAv). Aunque las técnicas dependientes de cultivo han sido ampliamente utilizadas en la búsqueda de nuevas cepas, y en la determinación del rol fundamental de las bacterias lácticas en la fermentación, en general subestiman la composición microbiana involucrada en el proceso. Las técnicas *Next Generation Sequencing* han comenzado a utilizarse en el estudio de la dinámica microbiana de ensilajes, lo cual ayudaría a una mejor comprensión del proceso y de los factores involucrados en su éxito. Se observó, a través de la técnica de *metaprofiling*, que la inoculación con las 3 cepas indujo cambios significativos en la estructura de la comunidad bacteriana y generó una disminución mayor en la riqueza y diversidad bacteriana a los 3 y 30 días de ensilaje, con respecto al control sin inocular. La fermentación estuvo dominada por el género *Lactobacillus*, con una abundancia relativa de alrededor del 40% y 73% a los 3 días en silajes sin inocular e inoculados, respectivamente. Por otro lado, la abundancia relativa de *Pediococcus* fue mayor en ambos puntos de muestreo en silos tratados, con un valor de casi 4% a los 3 días y 2% aproximadamente a los 30 días. La adición de las bacterias lácticas aceleró la fermentación, resultando en un descenso más rápido del pH. Además, a través de citometría de flujo, cuya aplicación en ensilajes no había sido utilizada hasta el momento, demostró la presencia de un gran porcentaje de células dañadas, cuya capacidad de

recuperación y crecimiento en condiciones de cultivo se desconoce, por lo que en general podría estar subestimándose la cantidad de bacterias presentes en las muestras por recuento en placa.

Por último, el interés creciente de las personas en el consumo de alimentos y bebidas fermentadas *plant-based*, motivó la búsqueda de cepas de bacterias lácticas para el desarrollo de este tipo de productos con potencial inmunomodulador. De esta manera, en el último capítulo de la Tesis, se abordó el estudio de la capacidad inmunomoduladora de 50 cepas de bacterias lácticas, pertenecientes a la colección obtenida en este trabajo, a través del co-cultivo *in vitro* de las mismas con macrófagos murinos (RAW264.7). De las 21 cepas con capacidad de inducir la producción de IL-10, 14 de ellas mostraron capacidad de inducir además la producción de TNF- α . Además, la capacidad de inducción de IL-6 fue considerada luego para selección de *L. plantarum* LpAv para continuar con el estudio de su aplicación en el desarrollo de dos productos *plant-based*, a partir de zanahoria y avena fermentada. La inoculación de *L. plantarum* LpAv dominó las fermentaciones, alcanzando un recuento de bacterias lácticas total de 10^8 y 10^9 ufc/ml en avena y zanahorias, respectivamente. Por último, se realizaron ensayos *in vivo* en un modelo murino en el cual se observó que la administración de zanahoria fermentada confirió un aumento en la supervivencia (80%) de ratones infectados con *Salmonella*, comparado con el grupo control (<25%).

Parte de la colección de cepas obtenida en esta Tesis se cedió en préstamo a través de un MTA (*Material Transfer Agreement*) por 5 años a la empresa austríaca Lactosan para su estudio y potencial transferencia tecnológica para aplicaciones agrícolas.

ABSTRACT

Lactic acid bacteria have been involved in food fermentation since ancient times, with the main purpose of the preservation of food. After the industrial revolution, this method of preservation has been progressively replaced by physical and chemical methods of food preservation. Yet, the sensory characteristics provided by fermentation are unique, and the consumption of fermented foods is strongly rooted in cultural aspects, mainly in Asian and African countries, so that there is an enormous variety of these products, both of animal and vegetable origin. In recent years, it has been suggested that the consumption of these foods would confer numerous health benefits, beyond nutrition, due to the presence of live microorganisms and/or bioactive compounds produced during fermentation. In fact, the inclusion of these products in the dietary guidelines in some countries is under evaluation, underlying the fact that they can be a source of safe, live and potentially beneficial microbes. Although people in our country do not usually consume this type of food (with the exception of yoghurt and cheese), in recent years there has been a growing interest of people in their diet, either as a lifestyle choice or due to the increase of food allergies and/or intolerances. This has led to an increasing trend in the consumption of fermented foods and beverages, such as kefir, kombucha, sauerkraut or sourdough bread. The main limitation in their production is that they are related to traditional home production, carried out by spontaneous fermentation or back slopping. Large-scale production requires process control and standardisation to ensure product quality and safety, for which starter cultures composed mainly of selected lactic acid bacteria can be used.

Another important application of lactic acid bacteria in the fermentation of plant substrates is as silage inoculants for animal feed. This is a method for forage preservation used in different parts of the world, which allows the continuous supply of quality feed to livestock throughout the year. This is a method of forage preservation used in different parts of the world, which allows the continuous supply of quality feed to livestock. Although forage fermentation can occur spontaneously after ensiling, mainly in those substrates rich in carbohydrates, the use of selected inoculants can ensure adequate fermentation, thus avoiding large economic losses and increasing animal performance. Although there are some products of this type fully developed in our country, the market for commercial inoculants is led by foreign companies. On the other hand, the potential benefits of lactic acid bacteria consumption by animals have been studied mostly at the rumen level, but little is known about its potential effects at the intestinal level.

Based on the ubiquitous distribution of lactic acid bacteria, particularly on the phyllosphere, the isolation of LAB from plant substrates was carried out in the first chapter of this Thesis. In addition, the isolates were identified and characterised for their potential application as

silage inoculants. A total of 129 lactic acid bacteria isolates were obtained from alfalfa, maize, sorghum, ryegrass, rice, barley, *Gatton panic*, *Mellilotus albus*, soybean, white clover, wheat, sunflower, oats and moha. Four strains of *Lactiplantibacillus plantarum*, isolated from oats (LpAv), alfalfa (LpA3), sorghum (LpS13) and maize (LpM15), were selected on the basis of their ability to grow on plant extract medium. Their identity was confirmed by 16S rRNA gene sequencing and their diversity by RAPD-PCR. The fermentative capacity of these four strains was also studied in maize minisilos, inoculated at 10^4 , 10^5 , 10^6 and 10^7 cfu/g. Subsequently, the "cross-fermentation" capacity of these four strains was analysed on oat, alfalfa, sorghum and maize minisilos. Regardless of the isolate origin, *L. plantarum* LpAv, LpA3, LpS13 and LpM15, inoculated at a rate of 10^6 cfu/g, were effective in the ensiling of the four forages. On the other hand, the heterofermentative LAB isolates that produced higher concentrations of acetic acid in MRS medium conferred increased aerobic stability to maize minisilos. Particularly, *Limosilactobacillus fermentum* LfM1 showed great potential for use as an inoculant, as acetic acid levels in silages inoculated with it were higher than those inoculated with *Lentilactobacillus buchneri* Ls141, a strain used in a commercial inoculant.

The bacterial dynamics in sorghum silages inoculated with three strains of lactic acid bacteria with immunomodulatory potential (*Lactobacillus plantarum* LpAv, *Pediococcus pentosaceus* PpM and *Lactobacillus paracasei* LcAv) was study in the second chapter of this Thesis. Culture-dependent techniques have been widely used in the search for new lactic acid bacteria strains, and determined their key role in fermentation, however, they generally underestimate the microbial composition involved in the process. Next Generation Sequencing techniques have just started to be used in the study of the microbial dynamics of silages, which would help to better understand the process and factors involved in its success. A metaprofiling technique was used in this study, which showed that the inoculation with lactic acid bacteria induced significant changes in the community structure and a greater decrease in bacterial richness and diversity at 3 and 30 days of ensiling, compared to non-inoculated control samples. Fermentation was dominated by the genus *Lactobacillus*, with a relative abundance of about 40% and 73% at 3 days in non-inoculated and inoculated silages, respectively. On the other hand, the relative abundance of *Pediococcus* was higher in treated silos at both sampling times, with a maximum value of almost 4% at 3 days, decreasing to about 2% at 30 days. Thus, the inoculated strains have dominated the fermentation, resulting in a faster decrease in pH value. In addition, flow cytometry, whose application in silage had not been reported so far, showed a large percentage of damaged cells, whose ability to recover and grow under culture conditions is unknown, so that the amount of bacteria present in the samples could be largely underestimated.

Finally, there is a growing interest in plant-based fermented foods and beverages, which motivated the search for LAB strains with potential for the development of fermented products with immunomodulatory potential. In the last chapter of this Thesis, the immunomodulatory

capacity of 50 strains of lactic acid bacteria was study by co-culturing them with murine macrophages (RAW264.7). A total of 21 strains with the capacity to induce IL-10 production were selected. Additionally, 14 of them also induced TNF- α production. The IL-6 induction capacity was then considered for selection of *L. plantarum* LpAv for further study of its application in the development of two plant-based products from carrot and oats. Inoculation of *L. plantarum* LpAv dominated the fermentations, reaching a total LAB count of 10^8 and 10^9 cfu/ml in oats and carrots, respectively. Finally, *in vivo* assays were performed in a murine model in which it was observed that the administration of fermented carrots conferred an increase in survival (80%) of *Salmonella*-infected mice compared to the control group (<25%).

Some of the strains obtained during this work were loaned to the Austrian company Lactosan through a MTA (Material Transfer Agreement) for 5 years for their study and potential technological transfer for exploitation as agricultural products.

INTRODUCCIÓN GENERAL

1. BACTERIAS LÁCTICAS

1.1 Generalidades

Las bacterias lácticas (BAL) son un grupo grande y heterogéneo de microorganismos que poseen características morfológicas, metabólicas y fisiológicas en común. Son cocos o bacilos Gram positivos, no esporulados y no móviles. Carecen de actividad de la enzima catalasa, aunque algunas pueden descomponer el peróxido de hidrógeno mediante una pseudocatalasa [1]. Son bacterias anaerobias facultativas, aerotolerantes o microaerofílicas. Una de sus principales características es la carencia de una cadena de transporte de electrones, por lo que poseen un metabolismo exclusivamente fermentativo, produciendo mayormente ácido láctico por la fermentación de carbohidratos. Son nutricionalmente muy exigentes, requiriendo carbohidratos fermentables, sales, aminoácidos, vitaminas, bases nitrogenadas y ésteres de ácidos grasos, por lo que usualmente se cultivan en medios complejos que contienen peptona, extracto de levadura u otros hidrolizados de materiales vegetales o animales. Son bacterias ácido-tolerantes, por lo que pueden continuar su crecimiento a pH 5 o menos, lo cual posee un gran valor selectivo que les permite superar a la competencia en medios ricos en nutrientes [2].

En general, se considera que las BAL son microorganismos intrínsecamente seguros para el consumo humano, ya sea directamente y/o a través de sus metabolitos en los alimentos fermentados. Un total de 48 especies de BAL se incluyen en la lista de presunción cualificada de seguridad (QPS, *Qualified Presumption of Safety*) de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA, *European Food Safety Authority*), con la excepción de especies pertenecientes al género *Enterococcus*. Además, son bacterias consideradas seguras o GRAS (*Generally Recognized As Safe*) para su uso en alimentos por la FDA (*Food and Drug Administration*).

1.2 Clasificación taxonómica

De acuerdo a la clasificación taxonómica actual, las bacterias lácticas pertenecen al filo *Firmicutes*, clase *Bacilli* y orden *Lactobacillales*. Las familias incluidas en este orden son *Aerococcaceae*, *Carnobactericea*, *Enterococcaceae*, *Lactobacillaceae*, *Leuconostocaceae* y *Streptococcaceae* (<http://www.uniprot.org/taxonomy/186826>). Aunque este grupo de bacterias incluye 6 familias y más de 60 géneros, desde el punto de vista tecnológico, los principales son *Lactococcus* (*Streptococcaceae*), *Enterococcus*, *Tetragenococcus* y *Vagococcus* (*Enterococcaceae*), *Lactobacillus* y *Pediococcus* (*Lactobacillaceae*), *Leuconostoc*, *Oenococcus*

y *Weissella* (*Leuconostocaceae*), *Streptococcus* (*Streptococcaceae*), *Aerococcus* (*Aerococcaceae*) y *Carnobacterium* (*Carnobactericeae*) [3].

Las primeras clasificaciones taxonómicas, propuestas por Orla-Jensen en 1919, se basaban en criterios fenotípicos como morfología celular, patrón de fermentación de carbohidratos y temperaturas de crecimiento. Más adelante en el mismo siglo, se utilizaron criterios genotípicos y quimiotaxonómicos, como hibridación ADN-ADN, % de G+C y estructura química del peptidoglicano, para la delimitación de nuevas especies bacterianas. Desde 1983, la similitud de secuencia del gen 16S ARNr se utilizó para proporcionar esquemas filogenéticos como ejes de la clasificación y nomenclatura. Con el avance en las técnicas de secuenciación en los últimos años y, con esto, la disponibilidad de genomas bacterianos completos, los valores de identidad nucleotídica media de genes compartidos entre genomas (94-96%) se introdujeron para la delimitación de nuevas especies bacterianas [3]. En particular, el género *Lactobacillus* propuesto por Beijerinck en 1901, es un género muy heterogéneo y estuvo compuesto (hasta marzo de 2020) por 261 especies extremadamente diversas desde el punto de vista fenotípico, ecológico y genotípico. Este género ha sido recientemente reclasificado por Zheng et al. [4] en base al estudio de las secuencias de los genomas completos disponibles, algunos parámetros como la filogenia del genoma *core*, la identidad media de aminoácidos y criterios fisiológicos y ecológicos. Así, *Lactobacillus* se reclasificó en 25 géneros distintos, los cuales incluyen los ya existentes *Lactobacillus*, *Paralactobacillus* y 23 géneros nuevos nombrados como *Holzapfelia*, *Amylolactobacillus*, *Bombilactobacillus*, *Companilactobacillus*, *Lapidilactobacillus*, *Agriolactobacillus*, *Schleiferilactobacillus*, *Loigolactobacillus*, *Lacticaseibacillus*, *Latilactobacillus*, *Dellaglioia*, *Liquorilactobacillus*, *Ligilactobacillus*, *Lactiplantibacillus*, *Furfurilactobacillus*, *Paucilactobacillus*, *Limosilactobacillus*, *Fructilactobacillus*, *Acetilactobacillus*, *Apilactobacillus*, *Levilactobacillus*, *Secundilactobacillus* y *Lentilactobacillus*. La nueva clasificación taxonómica puede consultarse en <http://lactobacillus.ualberta.ca/>. La tabla 1 resume algunos de las especies más relevantes en esta Tesis, sin embargo, con el objetivo de facilitar el entendimiento, al mencionar el género *Lactobacillus* se hará referencia tanto al género *Lactobacillus* propiamente dicho como a los nuevos géneros.

Tabla 1 – Ejemplos de la nueva clasificación taxonómica del género *Lactobacillus* según Zheng et al. [4].

Denominación anterior	Nueva clasificación
<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>
<i>Lactobacillus paracasei</i>	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>
<i>Lactobacillus brevis</i>	<i>Levilactobacillus brevis</i>
<i>Lactobacillus buchneri</i>	<i>Lentilactobacillus buchneri</i>
<i>Lactobacillus fermentum</i>	<i>Limosilactobacillus fermentum</i>

1.3 Metabolismo de carbohidratos

Las BAL poseen un metabolismo estrictamente fermentativo, obteniendo su energía exclusivamente por fosforilación a nivel de sustrato a través de dos vías posibles: la glucólisis (EMP, Embden-Meyerhof-Parnas) y la vía de la 6-fosfogluconato/fosfocetolasa (6-PG-PK) [2]. La fructosa-1,6-difosfato aldolasa (FDP-aldolasa) y la fosfocetolasa son las enzimas clave en la vía de glucólisis y en la vía 6-PG-PK, respectivamente. Según la vía de degradación de carbohidratos, las BAL pueden clasificarse en homofermentantes obligadas, heterofermentantes obligadas y heterofermentantes facultativas.

Las homofermentantes obligadas oxidan las hexosas a través la vía EMP, generando principalmente 2 moles de lactato y 2 ATP a partir de una molécula de glucosa (Fig. 1A). Estas son lactobacilos de Grupo I, compuesto por *L. acidophilus*, *L. delbrueckii*, *L. helveticus* y *L. salivarius*, y además los géneros *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Enterococcus* y *Streptococcus*. Las BAL heterofermentantes obligadas emplean la vía de la 6-PG/PK para convertir una molécula de glucosa en 1 mol de lactato, 1 mol de etanol y 1 ATP (Fig. 1B). Además, en presencia de un aceptor de electrones alternativo, el acetil-fosfato puede ser convertido en acetato en lugar de etanol, generando una molécula adicional de ATP. Particularmente, como la vía 6-PG/PK cuenta con un paso de descarboxilación del 6-fosfogluconato a ribulosa-5-fosfato, se generan además cantidades significativas de CO₂. A esta vía pueden ingresar también pentosas, en forma de ribulosa-5-fosfato o xilulosa-5-fosfato. Este grupo de BAL se compone principalmente por el grupo III de lactobacilos (*L. brevis*, *L. buchneri*, *L. fermentum*, *L. reuteri*) y los géneros *Leuconostoc*, *Weisella*, *Oenococcus* y *Fructibacillus*. Existe un tercer grupo, las heterofermentantes facultativas, las cuales principalmente fermentan hexosas a través de la vía EMP, pero en condiciones particulares como concentraciones de glucosa limitantes, pueden fermentar pentosas por la vía 6-PG/PK. Este grupo se compone principalmente por *L. casei*, *L. curvatus*, *L. plantarum* y *L. sakei*.

Las BAL pueden fermentar otras hexosas además de la glucosa, como galactosa, manosa y fructosa, las cuales pueden ingresar a ambas vías de oxidación como glucosa-6-fosfato o fructosa-6-fosfato, luego de pasos de isomerizaciones y fosforilaciones. En el caso particular de la galactosa existen dos vías posibles, la Leloir (cuando el azúcar ingresa por una permeasa) y la vía de tagatosa-6-fosfato (cuando el ingreso es por el sistema PTS, *phosphotransferase system*). Con respecto a los disacáridos, dependiendo de la forma de transporte, entran a la célula como disacáridos libres o fosfatos de disacáridos. En el primer caso, los azúcares ingresan por permeasas específicas y son hidrolizados por hidrolasas a los monosacáridos correspondientes. Cuando participa el sistema PTS, las fosfohidrolasas dividen a los fosfatos de disacáridos en monosacáridos libres y fosfatos de monosacáridos. Los monosacáridos correspondientes pueden seguir las vías de oxidación descritas anteriormente.

Dependiendo de la cepa de BAL y de las condiciones de crecimiento, existen vías alternativas de utilización del piruvato [2]. Por ejemplo, rutas que conducen a la formación de diacetilo y acetoina/2,3-butanodiol en medios ricos en citrato, son tecnológicamente importantes en *Lactococcus* y *Leuconostoc*. Por otro lado, bajo una limitación de carbohidratos y anaerobiosis, la piruvato-formiato liasa puede dar lugar a ácido fórmico y Acetil-CoA. Este último puede ser utilizado como aceptor de electrones dando etanol, o formar acetato por fosforilación a nivel de sustrato para generar ATP. Así, los productos finales, incluso en homofermentantes obligadas, podrían ser una mezcla de lactato, acetato, formiato y etanol. El piruvato puede ser también convertido en ácido acético por la acción de la piruvato oxidasa en presencia de oxígeno.

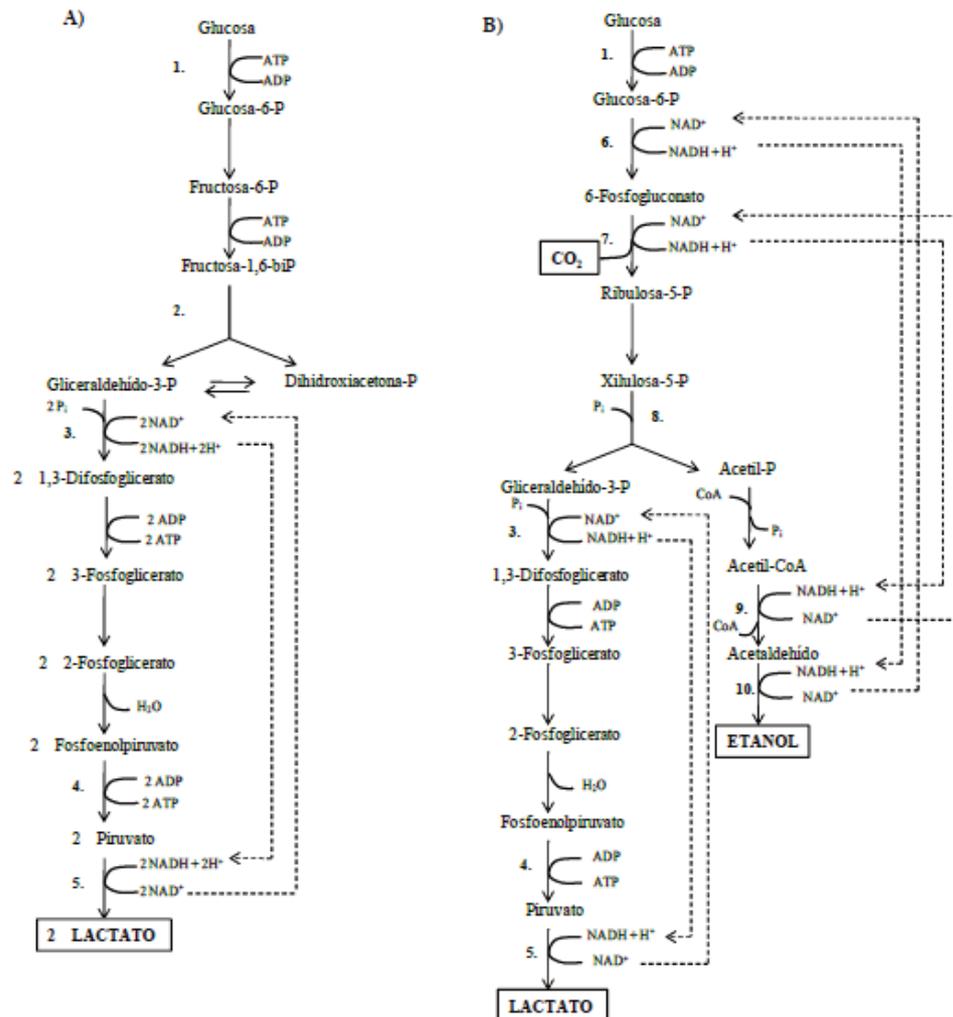


Figura 1 - Principales vías de fermentación de glucosa. Fermentación homoláctica (A) y fermentación heteroláctica (B). Las enzimas se enumeran como sigue: Glucoquinasa (1); Fructosa-1,6-difosfato aldolasa (2); Gliceraldehído 3-fosfato dehidrogenasa (3); Piruvato quinasa (4); Lactato dehidrogenasa (5); Glucosa-6-fosfato dehidrogenasa (6); 6-Fosfogluconato dehidrogenasa (7); Fosfoacetolasa (8); Acetaldehído dehidrogenasa (9); Alcohol dehidrogenasa (10). Imagen adaptada de von Wright & Axelsson (2019).

En las vías usuales de fermentación, el piruvato o Acetil-CoA y acetaldehído, actúan como aceptores de electrones para mantener el balance redox de la célula. Sin embargo, pueden existir aceptores de electrones alternativos en la célula. Por ejemplo, aunque las BAL son anaerobias, el oxígeno puede actuar como un aceptor de electrones, por ejemplo, en la conversión aerobia de Acetil-fosfato en ácido acético, brindando a la célula un ATP adicional en comparación de la formación de etanol. Esto ha sido demostrado por ejemplo en *Leuconostoc*, el cual aumenta su tasa de crecimiento y produce acetato en cultivos aireados. Algunos compuestos orgánicos también pueden ser usados por la célula como aceptores de electrones, por ejemplo, el glicerol por algunas BAL heterofermentantes, dando lugar a 1,3-propanodiol además de lactato, acetato y CO₂.

1.4 Distribución ambiental de bacterias lácticas

En general, las BAL están ampliamente distribuidas en la naturaleza y forman parte de numerosos ecosistemas, mostrando interacciones dinámicas con animales, plantas, insectos y otros microorganismos. Este grupo de bacterias constituye parte de la microbiota natural de humanos y animales y tiene un impacto sobre la salud del hospedador. Se encuentran presentes en el tracto gastrointestinal, desde la cavidad oral hasta los intestinos, en el tracto respiratorio y en la piel [5]. Además se han aislado con frecuencia de leche materna y forman una parte muy importante de una microbiota vaginal saludable [6], [7]. Por otro lado, las BAL se encuentran también en intestino de insectos, como abejas y termitas [8]. Asimismo, son abundantes en alimentos y bebidas fermentados espontáneamente, tanto de origen vegetal (encurtidos, bebidas alcohólicas, jugos de frutas, ensilados para animales, etc.) como animal (productos lácteos, cárnicos, pescado, etc.). Además, pueden encontrarse en ambientes naturales como suelos, lagos y vegetales crudos [9].

Particularmente, la filósfera, zona aérea de las plantas colonizada por la microflora epífita, se compone por una gran variedad de bacterias, levaduras y hongos filamentosos. La diversidad y abundancia de estas poblaciones son variables y dinámicas, y dependen de numerosos factores físicos y químicos, tanto de la propia planta (especie, variedad, etc.) como del ambiente (clima, prácticas agrícolas, etc.). Las bacterias son la población microbiana más abundante de la filósfera, encontrándose en cantidades de 10^6 - 10^7 células/cm² de hoja, siendo, por lo tanto, un hábitat bacteriano de gran importancia debido a su abundancia en el planeta. *Firmicutes* es uno de los filos bacterianos presentes en la estructura filogenética de la microbiota vegetal epífita, siendo las BAL parte de la misma (10^2 - 10^6 ufc/g) [10], [11]. El aislamiento de BAL a partir de vegetales es un procedimiento ampliamente utilizado en la búsqueda de nuevas especies o cepas de interés para aplicaciones tecnológicas y/o en salud.

1.5 Alimentos fermentados

1.5.1 Bacterias lácticas en alimentos fermentados

Las BAL tienen una enorme aplicación en la industria de los alimentos, siendo utilizadas en la producción de una amplia gama de productos de origen animal y vegetal, confiriéndoles una gran importancia a nivel industrial. Por ejemplo, *Streptococcus thermophilus* es la especie más utilizada a nivel global por su uso intensivo como cultivo iniciador en quesos [12]. Los alimentos y bebidas fermentadas datan desde hace varios milenios, existiendo algunos desarrollos documentados de miles de años A.C., como cervezas a partir de cereales silvestres y de leches fermentadas en Medio Oriente [13]. En los comienzos de la historia de los alimentos fermentados, los sustratos eran fermentados espontáneamente por los microorganismos naturalmente presentes en ellos, seguido de la práctica de ‘*back slopping*’, en la cual una parte del producto fermentado se utilizaba para iniciar la siguiente fermentación. Si bien estas técnicas siguen siendo utilizadas (por ejemplo, en panes de masa madre), con el paso del tiempo se comenzaron a utilizar cultivos seleccionados como ‘*starters*’ o iniciadores de la fermentación, con el objetivo de controlar el proceso y estandarizar la calidad y las características organolépticas de los productos, haciendo posible la industrialización de estos procesos. En la figura 2 se muestra un panorama general del proceso de fermentación.

Los alimentos fermentados se definen como “*alimentos elaborados mediante el desarrollo microbiano deseado y las conversiones enzimáticas de los componentes de los alimentos*” [14], siendo las BAL los microorganismos más utilizados en la producción de la enorme diversidad de bebidas y alimentos fermentados que existen en el mundo (Fig. 3) [15]. Por ejemplo, la fermentación láctica de leches de distinta naturaleza da lugar a numerosos productos, siendo el yogur y el queso los más populares. Otros ejemplos son el *tarag*, tradicional de China, o el *kule naoto* de Kenia, obtenidos por fermentación espontánea de leche de cabra y cebú, respectivamente [16]. Por otro lado, existen numerosos embutidos fermentados producidos a gran escala, especialmente en Europa, siendo *L. sakei*, *L. curvatus*, *L. plantarum*, *Enterococcus* y *Pediococcus* las BAL frecuentemente identificadas en este tipo de productos. Existen cultivos iniciadores para estos productos cárnicos [17]. Los alimentos fermentados en base a cereales, consumidos principalmente en Asia y África, son obtenidos tradicionalmente por fermentación espontánea o por ‘*back slopping*’. Algunos ejemplos son el *kenkey* de maíz blanco (Ghana), *Uji* de maíz, sorgo y mijo (Kenia, Uganda), *Idli* de arroz y *Nan* de harina de trigo (India). El *kvas* es una bebida elaborada en base a harina de malta o de centeno popular en Rusia, Ucrania y otros países del este de Europa [18]. En los últimos años, han proliferado bebidas y productos fermentados tipo yogur a base de cereales, elaborados industrialmente, como el caso de la bebida en base a avena fermentada y pulpa de frutas ProViva en los países nórdicos. Con respecto a los

vegetales fermentados, los más conocidos son el chucrut, kimchi o los pickles, siendo *Lactobacillus*, *Leuconostoc* y *Pediococcus* los principales géneros de BAL involucrados en la fermentación espontánea, aunque también se utilizan cultivos iniciadores de *L. plantarum*, *L. rhamnosus*, *L. gasseri* y *L. acidophilus* para la producción industrial. El chucrut, consumido mundialmente, es elaborado por la fermentación láctica del repollo. Es interesante, y de actualidad, notar que el consumo de chucrut y otros vegetales fermentados ha sido asociado recientemente al menor impacto de infecciones durante la pandemia de coronavirus [19]. Las aceitunas son fermentadas principalmente por *L. plantarum*. La salsa de soja es un condimento oriental fermentado cada vez más popular. El kimchi, emblemático de la cultura coreana y declarado patrimonio cultural inmaterial por la Unesco, es un producto fermentado preparado con variedades de col china (*Brassica rapa pekinensis*) que contiene una carga de BAL de 10^8 - 10^9 ufc/g. En los últimos años la industria ha probado cultivos iniciadores para la producción industrial del kimchi (*L. mesenteroides*, *L. citreum*, *L. plantarum*) demostrando aceptación en base al sabor en comparación con el fermentado espontáneo [20]. En nuestro país, el Senado de la Nación declaró recientemente al día 22 de noviembre como “Día Nacional del Kimchi en la Argentina”. Los alimentos fermentados son muy variados, incluso el chocolate conlleva de forma intrínseca un proceso de fermentación: las semillas del fruto del cacao se fermentan espontáneamente con *L. plantarum* y *L. fermentum* naturalmente presentes en la pulpa que las rodea [21]. Por último, el ensilaje (o ensilado) de forrajes para alimentación animal, es obtenido por la fermentación láctica de sustratos vegetales, siendo así considerado como un vegetal fermentado. También en este caso, si bien puede ocurrir la fermentación espontánea por la microbiota epífita, una manera de asegurar una fermentación exitosa, reproducible y disminuir las pérdidas económicas, es por el agregado *ex profeso* de inoculantes para ensilajes basados en BAL seleccionadas.

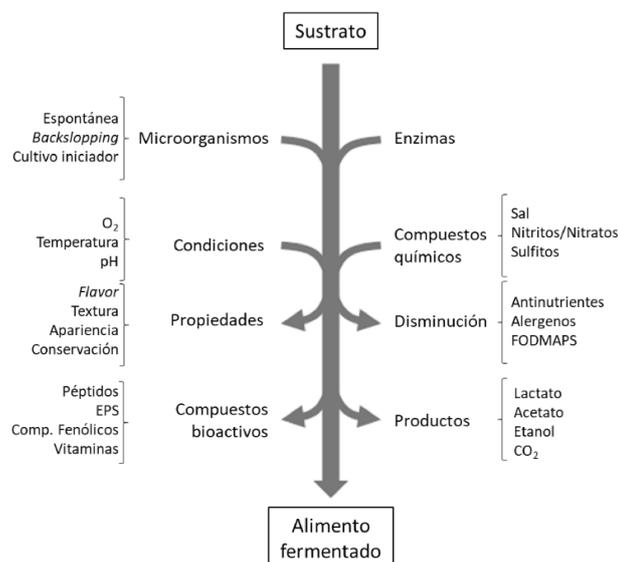


Figura 2 – Panorama general de la transformación de los alimentos por el proceso de fermentación. Los sustratos, de origen animal o vegetal, son fermentados por las bacterias lácticas en condiciones determinadas, generando productos con características deseables, compuestos con potenciales efectos positivos para la salud, y eliminando o disminuyendo compuestos con efectos nutricionales indeseados, como antinutrientes. Imagen adapta de Marco et al. [22].

Figura 3 – Ejemplos de alimentos fermentados que existen alrededor del mundo. El superíndice indica el tipo de materia prima de origen: (1) cereales y semillas; (2) leche; (3) legumbres; (4) frutas, verduras, tubérculos y otros vegetales; (5) carne; (6) pescado y marisco. Imagen adaptada de Gómez-Gallego et al. [23].



1.5.2 Alimentos fermentados y sus beneficios

En tiempos primitivos, la dieta del ser humano se basaba en alimentos crudos y no procesados, con el consumo de los microorganismos naturalmente asociados a éstos. Con la transición de cazadores-recolectores a comunidades asentadas y el desarrollo de la agricultura y la domesticación de animales, los alimentos fermentados, los cuales contenían poblaciones de microorganismos abundantes y diversas, surgieron como alimentos comunes en la dieta de estas poblaciones. Luego, en los siglos XIX y XX se desarrollaron métodos modernos de procesamiento y conservación de alimentos, transformando nuevamente las dietas. En muchas sociedades modernas, principalmente en grandes poblaciones urbanas de países de altos ingresos, la dieta se basa en alimentos procesados y ultra-procesados, lo cual tiene consecuencias negativas sobre la salud. Sin embargo, alimentos fermentados muy diversos siguen siendo consumidos en algunas regiones del mundo debido a su arraigo cultural, y además a las características únicas otorgadas por la fermentación. Asimismo, en los últimos años se ha renovado el interés por estos alimentos por parte de los consumidores en general, debido a que se han determinado numerosos potenciales beneficios en la salud. Estos alimentos, considerados globalmente, promueven la diversidad de la microbiota, modulan las respuestas del sistema inmunológico, controlan la permeabilidad intestinal y producen metabolitos bioactivos o reguladores de diferentes respuestas metabólicas [14]. Asimismo, numerosos estudios realizados han concluido que la ingesta diaria de alimentos fermentados se relaciona con perfiles metabólicos más saludables (lípidos y glucosa en sangre, presión arterial, resistencia a la insulina), menor riesgo de enfermedades cardiovasculares, diabetes tipo 2 y sobrepeso, mejora de la salud gastrointestinal, y además influye en las respuestas inmunes, entre otros. Algunos mecanismos promotores de la salud propuestos se resumen en la figura 4. En base a los numerosos trabajos publicados hasta el momento sobre los beneficios

proporcionados por el consumo de alimentos fermentados, se ha sugerido un análisis de la evidencia existente y la realización de nuevos estudios para el establecimiento de una recomendación nutricional de ingesta diaria de microorganismos vivos, siendo los alimentos fermentados importante fuente de éstos [24].

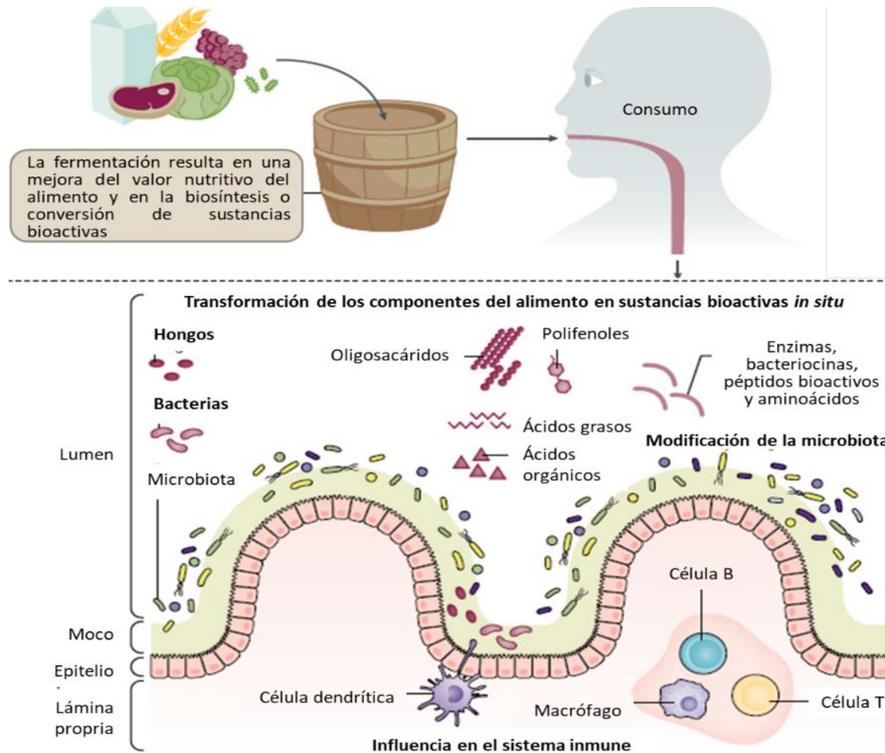


Figura 4 – Beneficios del consumo de alimentos fermentados. Más allá del aporte nutricional del alimento como tal, la fermentación resulta en la eliminación y transformación de componentes del alimento, y en la síntesis de compuestos bioactivos. Estas transformaciones pueden resultar en el aumento del valor nutricional (ej. por la eliminación de fitatos o síntesis de vitaminas) y/o en la generación de compuestos con actividad biológica (ej. péptidos bioactivos o ácido linoleico conjugado). Luego del consumo, los componentes del alimento, los productos de la fermentación y los microorganismos que permanecen viables, ingresan al tracto intestinal. Estos microorganismos, junto con los miembros de la microbiota, podrían continuar con la transformación de componentes en sustancias bioactivas, como péptidos, bacteriocinas, aminoácidos o ácidos orgánicos. Además, los microorganismos ingeridos y sus productos también interactúan con la microbiota existente, el epitelio intestinal y el sistema inmune del hospedador. Imagen adaptada de Marco et al. [14].

1.6 Bacterias lácticas como probióticos

Si bien es frecuente el uso erróneo de los términos ‘alimento fermentado’ y ‘probiótico’ como sinónimos, el término ‘probiótico’ solo es adecuado cuando se trata de cepas identificadas y caracterizadas, las cuales deben estar viables (muchos alimentos fermentados no contienen microorganismos o no están viables) y cuyos beneficios se hayan demostrado científicamente,

mediante ensayos de eficacia controlados. Los probióticos se definen como “*microorganismos vivos que, cuando son administrados en cantidades adecuadas, confieren un beneficio sobre la salud del hospedador*” [25]. Para que estos microorganismos puedan ejercer dichos efectos es necesario que lleguen al intestino vivos y en concentraciones adecuadas, aunque no está claro al día de hoy en qué proporción deben llegar viables ni que metodologías se deben aplicar para evaluar tal condición. En la tabla 2 se resumen algunas de las diferencias entre alimentos fermentados y probióticos.

Tabla 2 – Diferencias entre probióticos, alimentos fermentados y alimentos fermentados probióticos.

Producto	Definición	Formato	Evidencia científica	Composición microbiana		
				Vivos y en cantidad definida	Definido taxonómicamente a nivel cepa	Secuencia genómica disponible
Probiótico	Microorganismos vivos que, cuando son administrados en cantidades adecuadas, confieren un beneficio sobre la salud del hospedador	No específico	Si	Si	Si	Si
Alimento fermentado	Alimento elaborado mediante el desarrollo microbiano deseado y las conversiones enzimáticas de los componentes del alimento	Alimento	No	No	No	No
Alimento fermentado probiótico	Alimento fermentado por, o que contiene probióticos con evidencia específica de la cepa	Alimento	Si	Si para probiótico pero no para cepa fermentadora	Si para probiótico pero no para cepa fermentadora	Si para probiótico pero no para cepa fermentadora

Adaptada de Marco et al. [14].

Las bacterias lácticas, particularmente del género *Lactobacillus*, son las que más se han utilizado para el desarrollo de probióticos en forma de suplementos o como alimentos funcionales (junto con *Bifidobacterium*). Los mecanismos de acción de los probióticos son muy diversos, involucrando por ej. la contribución a una microbiota saludable, exclusión competitiva de patógenos por sitios de adhesión o nutrientes, inhibición del desarrollo de patógenos por producción de compuestos como ácidos orgánicos y bacteriocinas, o estimulación del sistema inmune asociado a mucosas.

2. BACTERIAS LÁCTICAS EN ALIMENTOS *PLANT-BASED*

2.1 Alimentos fermentados *plant-based*

El consumo de vegetales, en particular hortalizas y legumbres, aportan vitaminas, minerales, fibras, fitoquímicos y péptidos bioactivos al organismo, además tienen potencial para prevenir enfermedades crónicas no transmisibles como patologías cardiovasculares, obesidad, diabetes y cáncer colorrectal. Es por esto que la OMS (www.who.int/) y la FAO (www.fao.org/) recomiendan un consumo mínimo de frutas y verduras por día. Desafortunadamente, se estima que la ingesta de vegetales es inferior a las recomendadas, lo que hace necesaria la búsqueda de estrategias para incrementar el consumo. La mayor parte de los vegetales son consumidos crudos o mínimamente procesados, los cuales tienen vida útil muy corta. Se utilizan entonces métodos de conservación como tratamientos térmicos, preservantes químicos, radiación ionizante, entre otros, que pueden tener efectos negativos sobre las características fisicoquímicas y sensoriales del alimento. Por el contrario, la fermentación, además de preservar los alimentos, puede mejorar las características organolépticas, nutricionales y funcionales de los mismos. Todo esto sumado a la tendencia creciente de los consumidores hacia la ingesta de alimentos frescos de alto valor nutricional, saludables, sabrosos y listos para consumir, convierte a la fermentación en una estrategia de biopreservación atractiva para aumentar el consumo de estos alimentos [11].

Como ya se mencionó, los vegetales representan un nicho ecológico muy variable, cuya riqueza en nutrientes fermentables y carga microbiana dependen de sus características intrínsecas (especie, variedad, etc.) y extrínsecas (clima, prácticas agrícolas, etc.). La riqueza de los vegetales como sustrato, y el amplio contenido de enzimas de las BAL, les permite ingresar durante la fermentación en un laberinto de rutas metabólicas, que dará como resultado productos fermentados enriquecidos en compuestos bioactivos y/o menor cantidad de factores antinutricionales (FAN, inhibidores de α -amilasa, lectinas, oxalatos, taninos, ácido fítico, otros) (Fig. 5). La capacidad de las BAL para seguir una vía u otra es específica de especie o cepa, dependiendo de su conjunto de sus enzimas. Además, cabe mencionar que los microorganismos responsables de la fermentación pueden tener potenciales efectos probióticos, siendo el alimento fermentado un vehículo apropiado para su administración al consumidor [26].

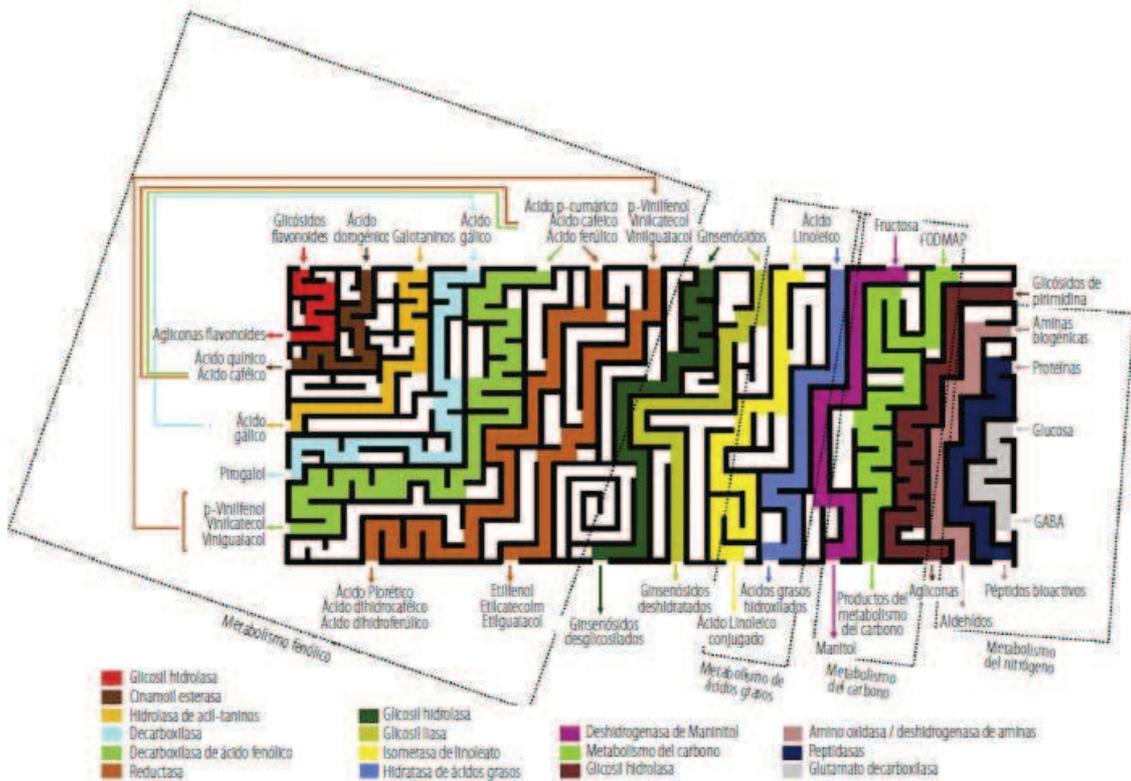


Figura 5 - Laberinto metabólico y funcional que siguen las bacterias lácticas durante la fermentación de los sustratos vegetales. Cada vía coloreada representa una ruta potencial para liberar compuestos biogénicos o para eliminar antinutrientes. Figura adaptada de Filannino et al. [26].

2.2 Tipos de fermentaciones

2.2.1 Fermentación espontánea: microbiota epífita

Como se mencionó, la microbiota epífita de vegetales está sujeta a condiciones nutricionales, físicas y químicas, siendo cada tipo de planta un nicho único. Asimismo, aunque las BAL conforman una pequeña parte de la microbiota autóctona (2-4 log cfu/g), cuando se proporcionan las condiciones adecuadas (anaerobiosis, actividad acuosa, concentración de sales y temperatura), pueden desarrollarse y dominar la fermentación láctica. Las BAL aisladas con mayor frecuencia de vegetales crudos y fermentados espontáneamente pertenecen al género *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Weissella*, *Enterococcus* y *Pediococcus*. Una alternativa a la fermentación estrictamente espontánea es el *back slopping*, una manera de inducir la fermentación por la inoculación de las cepas más adaptadas en una fermentación previa, acelerando el proceso y teniendo así un control mínimo sobre el mismo. Estas prácticas, sin embargo, pueden conducir a productos con propiedades sensoriales variables y son sensibles a la contaminación por microorganismos alterantes y/o patógenos, lo que representa un riesgo para la salud pública [11].

2.2.2 Fermentación controlada: cultivos *starter*

La producción de muchos alimentos fermentados ha dejado de ser una práctica artesanal y se ha convertido en procesos biotecnológicos estandarizados, los cuales utilizan cultivos iniciadores, permitiendo la elaboración de productos de alta calidad con propiedades organolépticas mejoradas, más estables y homogéneos y con menor probabilidad de contaminaciones por patógenos y/o alterantes. Además, en la producción industrial se aplican sistemas de control de calidad, disminuyendo así los riesgos para la salud. Adicionalmente, el desarrollo y uso de cultivos iniciadores tiene relevancia económica ya que aumenta la competitividad de la producción, las posibilidades de innovación y abre fronteras en el mercado de alimentos [20].

Los cultivos *starters* son microorganismos seleccionados, contenidos en formatos determinados, que se inoculan en la matriz alimentaria para inducir y conducir la fermentación. Estos pueden estar compuestos por cepas autóctonas, aquellas aisladas y reutilizadas en la misma matriz de la cual se aislaron, o alóctonas, aisladas de una matriz y usadas para fermentar otras distintas. La selección de las cepas para el desarrollo de cultivos iniciadores es fundamental, debido a que no todas las BAL fermentarán todos los sustratos de la misma manera. En general, esta selección se basa en criterios tecnológicos (ej. velocidad de crecimiento y acidificación, tolerancia a la acidez y temperatura) sensoriales (ej. homo- o heterofermentantes, síntesis de compuestos de aroma) y nutricionales (ej. síntesis de compuestos antioxidantes, aminos biógenas).

2.3 Consumo de productos fermentados en Argentina

2.3.1 Vegetales fermentados

En nuestra cultura no suele haber un consumo habitual de alimentos y bebidas fermentadas, salvo algunas bebidas alcohólicas (vino y cerveza), yogur y quesos. Sin embargo, en los últimos años el consumo de algunos alimentos fermentados de base vegetal como el kimchi, chucrut, pickles, aceitunas, kéfir y kombucha ha aumentado. El chucrut se obtiene por la fermentación de hojas picadas de variedades del repollo blanco, la cual se inicia por *L. mesenteroides* seguida por lactobacilos heterofermentantes y homofermentantes. Aunque las especies involucradas en la fermentación varían, *L. mesenteroides* y *L. plantarum* se encuentran entre las principales. No hay disponibles cultivos iniciadores para la producción del chucrut. Por otro lado, el kimchi, es preparado por fermentación espontánea de la col china y otros vegetales, en la que principalmente intervienen los géneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Lactococcus* y *Pediococcus* [27]. Desde comienzos del siglo 21, la industria del kimchi ha ensayado el uso de cepas de *L. mesenteroides*, *L. citreum* o *L. plantarum* como cultivos *starter*

para lograr una mejor y más estable calidad organoléptica, demostrando una mayor aceptación general en base al sabor y potenciales beneficios a la salud, en comparación con el kimchi fermentado naturalmente. Otro producto consumido en Argentina son las aceitunas en salmuera, obtenidas por la fermentación láctica de los frutos de las distintas variedades del olivo, según Código Alimentario Argentino, cuya fermentación (aceitunas verdes) dura varias semanas y es llevada a cabo principalmente por *L. plantarum*. Otras BAL encontradas en las aceitunas pertenecen a especies como *L. casei*, *L. mesenteroides* y *P. pentosaceus*.

Cabe resaltar que nos encontramos en un contexto mundial de aumento sostenido de enfermedades crónicas de base autoinmune e inflamatoria, por lo que se debería pensar en estrategias alimentarias tendientes a la promoción de la ingesta de microorganismos viables y benéficos y fibra dietaria, como forma de promoción y aumento de la diversidad y funcionalidad de la microbiota intestinal. Particularmente, los alimentos fermentados vegetales son una estrategia con gran potencial ya que reúnen simultáneamente la presencia de bacterias benéficas y fibras, y proporcionan además nutrientes esenciales para la vida y la promoción de la salud. Esto alienta la investigación y desarrollo de cultivos iniciadores para el control de la fermentación de diversos sustratos vegetales, que aporten beneficios tecnológicos y saludables a los alimentos. Además, la principal limitante de la comercialización de todos estos productos es su carácter artesanal, por lo que el desarrollo de cultivos iniciadores cobra gran importancia en la promoción de su consumo en una cultura como la nuestra [20], [28].

2.3.2 Bebidas fermentadas

Como se mencionó, el yogur es uno de los principales productos fermentados consumidos en Argentina, el cual se obtiene mediante la fermentación de la leche de vaca por *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus*. En los últimos años, con el aumento de la prevalencia de intolerancias alimentarias (ej. a la lactosa), alergias a alimentos (ej. a la proteína de leche de vaca (APLV)) y con la creciente elección de un estilo de vida vegano, han surgido en el mercado nacional algunos productos alternativos al yogur convencional, preparados en base a bebidas vegetales, principalmente de coco y de almendra. Así, este mercado para consumidores vegetarianos, veganos, alérgicos, intolerantes, o sencillamente aquellos que buscan disminuir el consumo de productos derivados de animales, está en franco crecimiento. Existen productos fermentados muy populares en Europa, que podrían tener un potencial muy prometedor en nuestro país. Estos son productos elaborados a base de avena, como por ej. *Yosa*, producto de Finlandia obtenido por la fermentación con *L. acidophilus* LA5 y *B. lactis* Bb12, o *Proviva*®, producto nórdico que consiste en avena fermentada por la cepa probiótica *L. plantarum* 299v, mezclado luego de la fermentación con 95% de pulpa de frutas [29]. Los beneficios del consumo de avena se deben principalmente a su alto contenido en β -glucano, el cual disminuye el colesterol en

sangre y disminuye la velocidad de la absorción intestinal de la glucosa, ayudando así a mantener índices bajos de insulina y prevenir enfermedades cardiovasculares, dislipidemia, hipertensión, inflamación y diabetes tipo 2. Otro efecto importante del β -glucano es su función prebiótica en el trato gastrointestinal. Además, la avena además es fuente de proteínas y antioxidantes [30]. Es por esto necesario fomentar el consumo de este cereal, siendo una de las estrategias la obtención de productos fermentados tipo yogur, lo que sumaría los beneficios de la fermentación láctica, además de sus beneficios nutricionales. Por ejemplo, Russo et al. [31] obtuvieron una bebida de avena fermentada por cepas de *L. plantarum*. Particularmente, la cepa *L. plantarum* B2 mostró un aumento del contenido de riboflavina en el producto fermentado. Sin embargo, existen numerosos desafíos para llegar a productos que sean aceptados por el consumidor, entre los cuales se encuentran las propiedades sensoriales del producto final, como su textura y sabor [32]. La viscosidad es una propiedad crucial para obtener las características sensoriales deseadas, como la sensación en boca y liberación de sabor. Se sabe que los β -glucanos, presente en los cereales, contribuyen al aumento de la viscosidad y textura, al igual que los EPS microbianos, además de su papel positivo en la salud como prebióticos. *L. plantarum* Lp90 (aislado de vino), productor de exopolisacáridos, afectó positivamente a la viscosidad de la bebida de avena fermentada [31].

Dentro de la caracterización de estos productos, se encuentra el análisis de perfil de textura, el cual es un procedimiento instrumental que simula la masticación. La textura es un atributo de interés para evaluar la aceptabilidad y calidad del producto. A partir de este análisis pueden estimarse algunos parámetros como adhesividad, dureza y cohesividad. La adhesividad es la medida es la medida del trabajo necesario para vencer las fuerzas de atracción entre la superficie del alimento y la superficie de otros materiales, por ejemplo: la fuerza requerida para retirar el material que se adhiere al paladar durante su consumo. Por otro lado, la dureza se relaciona con la fuerza requerida en el proceso de masticado, mientras la cohesividad representa el punto límite hasta el cual puede deformarse el material antes de romperse o desintegrarse, es función de la fuerza de unión entre sus partículas.

3. BACTERIAS LÁCTICAS EN ENSILADOS

3.1 Ensilado y su importancia en Argentina

La producción de forrajes está condicionada por factores ambientales estacionales, y su carencia causa problemas de alimentación y mermas en la producción animal. Para superar esto y lograr una reserva forrajera que permita el abastecimiento de alimento a lo largo del año, se acude a métodos de conservación. El ensilado (o ensilaje) es uno de los métodos más utilizados de conservación de forrajes frescos, el cual se basa en la adición de conservantes químicos o la fermentación láctica del material vegetal en condiciones de anaerobiosis. Los silajes (producto final del ensilado) constituyen la porción principal de la dieta del ganado vacuno en muchos países como Argentina, Brasil, Paraguay y Estados Unidos, por lo que la calidad de este producto es fundamental. En las últimas décadas, Argentina mostró una gran evolución de la superficie destinada a silaje de maíz, sorgo y pasturas en busca de una mayor eficiencia productiva de carne y leche. Según datos del INTA, en la campaña 93/94 se ensilaron unas 80 mil ha de maíz y sorgo, mientras en la campaña 14/15 fueron 1,87 millones de ha [33].

Esta práctica agropecuaria involucra diferentes etapas como la cosecha del cultivo en un estado de madurez adecuado, el picado, el llenado del silo, la compactación y sellado para eliminar el aire, el almacenamiento y finalmente la apertura del silo para la alimentación animal. La fermentación de la masa vegetal puede ser llevada a cabo por las bacterias lácticas presentes en el material de partida o por la adición de aditivos, principalmente inoculantes compuestos por BAL seleccionadas. El proceso en general se basa en que estas bacterias metabolizan los carbohidratos solubles (CHOS) del vegetal, produciendo ácidos orgánicos (mayormente ácido láctico), lo que disminuye el pH del material, inhibiendo el desarrollo de microorganismos deteriorantes [34].

3.2 Fases del ensilado

El proceso de ensilaje consta de distintas fases: fase aeróbica, fase anaeróbica, fase estable y fase de apertura y uso (Fig. 6). Estas etapas deben ser controladas cuidadosamente para lograr el éxito del ensilaje, minimizando las pérdidas económicas y los riesgos para la salud [35].

3.2.1 Fase aeróbica

En esta fase, el O₂ atrapado en la matriz del forraje mantiene la respiración de las plantas y los microorganismos aerobios. Además, algunas enzimas del propio vegetal permanecen activas, iniciando la descomposición de proteínas y carbohidratos. Generalmente, las enzimas

proteolíticas pueden producir una degradación proteica importante, dando lugar a péptidos, aminoácidos libres y nitrógeno no proteico. Asimismo, parte de los carbohidratos no estructurales, principalmente el almidón, son transformados en azúcares simples, los cuales son utilizados al principio por levaduras, hongos y bacterias aerobias, generando ácidos grasos volátiles, otros compuestos orgánicos y gases. Así, en esta etapa se pueden producirse pérdidas de materia seca y del valor energético y calidad del silaje. Idealmente, esta fase lleva solo algunas horas en un cultivo finamente picado y bien compactado, y siempre que el silo se selle sin demora. Sin embargo, en condiciones inadecuadas (cultivo muy seco, compactación baja, tamaño de picado muy grande, llenado lento, sin sellado) la fase aeróbica puede llevar más tiempo, ocasionando pérdidas significativas.

3.2.2 Fase anaeróbica

Esta fase comienza cuando el contenido de oxígeno ha disminuido lo suficiente, y continúa por varios días o hasta semanas, dependiendo de las propiedades del forraje y de las condiciones del ensilado. La fase se caracteriza por la fermentación de los CHOS por parte de las BAL, generando ácidos orgánicos que disminuyen el pH. Además, microorganismos anaerobios obligados y facultativos como *Clostridium*, enterobacterias, *Bacillus* y levaduras, compiten por los nutrientes con las BAL. En un ensilaje exitoso, las BAL predominan y se vuelven dominantes, mientras los demás tienden a decrecer, siendo en general superados primero por BAL de los géneros *Pediococcus*, *Leuconostoc* y *Streptococcus* y, con el progreso de la fermentación, *Lactobacillus*. La velocidad de estos cambios está estrechamente relacionada con la tasa de disminución del pH y la producción de ácido láctico. Durante esta fase pueden ocurrir algunas fermentaciones secundarias no deseadas, las cuales deben ser minimizadas. Por ejemplo, forrajes muy húmedos y con bajo contenido de CHOS son propensos a fermentación butírica, por parte de bacterias del género *Clostridium*, las cuales se desarrollan a pH superior a 4. Algunas especies proteolíticas degradan nitrógeno proteico del forraje a ácido butírico y NH_3 , mientras otras sacarolíticas degradan los azúcares y ácido láctico a ácido butírico y otros metabolitos. El NH_3 producido tiende a elevar el pH de la masa vegetal, lo que favorece la proliferación de otras bacterias como *Bacillus*, que generan aún más NH_3 . Cuando el pH en el silo alcanza valores superiores a 5, se acelera el desarrollo de éstos y otros microorganismos también perjudiciales que generan la putrefacción del forraje almacenado. También puede tener lugar una fermentación alcohólica por levaduras, generando etanol y otros alcoholes.

3.2.3 Fase estable

Durante la fase estable, el pH bajo y la acumulación de los productos de fermentación reducen la actividad de la mayoría de los microorganismos presentes en el silaje. Sin embargo, las enzimas ácido-tolerantes continúan liberando CHOS por la hidrólisis de polisacáridos, mientras se mantiene la anaerobiosis. La fermentación por algunos *Lactobacillus* puede continuar, por ejemplo *L. buchneri*. Algunas levaduras ácido-tolerantes pueden mantenerse inactivas y sobrevivir en esta fase, como también *Clostridium* y *Bacillus*, los cuales pueden formar esporos.

3.2.4 Fase de apertura del silo

Cuando los silos son abiertos para dar lugar a su utilización como alimento para el ganado, y su contenido expuesto al aire, comienza la fase en la que los microorganismos aerobios facultativos que permanecieron inactivos comienzan a desarrollarse. Al inicio de esta fase, algunos microorganismos inician el deterioro metabolizando los ácidos orgánicos, generalmente levaduras (ej. género *Candida* y *Pichia*), o bacterias acéticas. La oxidación de estos ácidos incrementa el pH, generando condiciones más adecuadas para el desarrollo de otros microorganismos sensibles a la acidez, como ciertos mohos. El deterioro aeróbico es la principal causa de pérdidas de nutrientes en ensilajes, y frecuentemente responsable de la potencial patogenicidad y toxicidad, lo que disminuye la *performance* animal y hasta genera enfermedades y muertes en el ganado. La estabilidad aeróbica se define como el tiempo en que el silaje permanece sin signos de deterioro una vez expuesto al aire, lo que se determina por el aumento de la temperatura interna del material ($>2^{\circ}\text{C}$ respecto a la temperatura ambiente) [36].

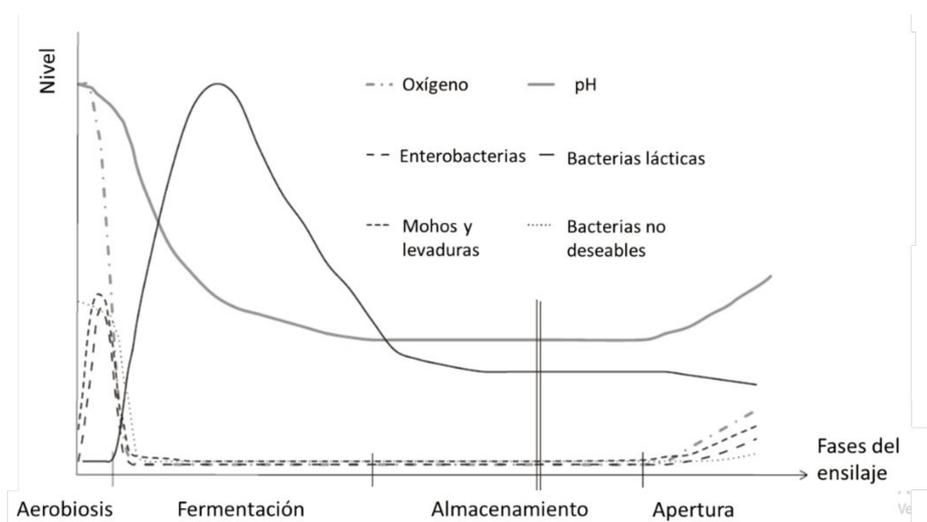


Figura 6 – Principales cambios físico-químicos (pH y oxígeno) y de poblaciones microbianas que se producen durante el proceso de ensilado. Imagen adaptada de Dunière et al. [34].

3.3 Forrajes

Diversos factores afectan la calidad del silaje, entre ellos se encuentra la naturaleza del forraje. Los silajes de maíz y sorgo son de los más importantes en los sistemas de producción modernos. Estos son ricos en CHOS y tienen escasa resistencia al descenso de pH (capacidad *buffer*) durante la fermentación, presentando buenas condiciones para el desarrollo de las BAL. Por otro lado, los cultivos como verdes de invierno y alfalfa, presentan dificultad al ensilar debido a su alta humedad, bajos contenidos de CHOS disponibles respecto del contenido de proteínas, y baja carga de BAL epífitas. El momento de corte es otro factor a tener en cuenta ya que el estado de madurez óptimo y el contenido de materia seca (MS), deben asegurar un contenido de CHOS disponibles adecuado para las bacterias y un máximo valor nutricional para el ganado. En el caso del maíz y sorgo se recomienda un 35-40% de MS al momento de ensilar [37]. La aplicación de inoculantes bacterianos permite alcanzar pH menores, logrando una adecuada estabilización de los silajes con mayor contenido de MS. En el caso de la alfalfa, esta debería picarse cuando contenga alrededor del 40 – 45 % de MS. La avena es uno de los cereales de invierno utilizados para ensilaje, cuyo contenido de MS recomendada al momento de su cosecha varía, pero la mayoría de estos cultivos acepta un rango de 35 % a 50 % de MS. Comparados al maíz y sorgo, los cultivos de invierno para silaje son recursos con menos carbohidratos solubles y, por tanto, la fermentación láctica durante el almacenamiento, aún con un compactado adecuado, es más lenta y menos estable.

3.4 Parámetros químicos indicadores de la calidad del silaje

Para analizar la calidad del silaje se tienen en cuenta, entre otros, los siguientes parámetros químicos [38]:

- **Materia seca (%MS):** es el porcentaje del forraje que no es agua. El contenido de humedad varía de acuerdo al tipo de forraje, estado de madurez y estación, por lo que los demás parámetros deberían expresarse siempre en base seca.
- **pH**
- **Proteína bruta (%PB):** incluye tanto el nitrógeno en forma de proteínas y péptidos, como el nitrógeno no proteico, como nitratos, amonio, urea, aminas, aminoácidos libres. No siempre un alto nivel de PB significa buen nivel proteico ya que los compuestos NNP, solubles o muy degradables, poseen menor valor nutricional que las proteínas verdaderas.
- **Lignina detergente ácida (%LDA):** es el principal factor que influye en la digestibilidad de la pared celular vegetal. Es un componente fibroso sin valor energético para los animales que puede afectar la digestibilidad de otros componentes fibrosos. Cuando el

contenido de lignina aumenta, la digestibilidad, la ingesta y la *performance* animal disminuyen.

- **Fibra detergente neutra (%FDNa):** es un valor estimativo de la cantidad de fibra total del forraje (celulosa, hemicelulosa y lignina). No siempre altos niveles significan alimento “fibroso”, esto depende del grado de lignificación. El nivel de FDN es utilizado para predecir el consumo, ya que altos niveles en el forraje disminuyen la ingesta.
- **Fibra detergente ácido (%FDAs):** es una medida del contenido de celulosa ligada a lignina. Este valor es un indicador indirecto del grado de digestibilidad del forraje, ya que cuando este aumenta, la digestibilidad usualmente disminuye.
- **Cenizas (%Cz):** es el contenido total de minerales, tanto macro (Ca, P, K, Mg) como microelementos (Co, Cu, Mn, Fe, Zn y Se). Este valor representa de un 3 a un 15% de la MS.
- **Extracto etéreo (%EE):** representa la fracción de lípidos del forraje. Valores superiores al 14 % indican que el alimento no debería integrar una gran proporción de la dieta. Durante el almacenamiento predisponen a enranciar los materiales cuando éstos no están adecuadamente acondicionados y pueden ser tóxicos para las bacterias ruminales [39].
- **Nitrógeno amoniacal (%NH₃/NT):** una parte de la fracción proteica del forraje es degradada a péptidos, aminoácidos, aminas y amonio, por enzimas microbianas y vegetales, reduciendo el valor nutricional del alimento. La concentración de NH₃ (expresado como un porcentaje del nitrógeno total) se utiliza como un indicador de la degradación proteica y, consecuentemente, de la mala conservación. En general, de acuerdo al pH y al NH₃/NT, los forrajes pueden ser designados como muy buenos (pH < 4 y % NH₃/NT ≤ 5), buenos (pH ≥ 4 y % NH₃/NT 5-15), regular (pH ≥ 4 y % NH₃/NT ≤ 15) y malo (pH ≥ 4 y % NH₃/NT > 15).
- **Ácidos orgánicos:** el ácido láctico, principal producto de la fermentación anaeróbica de los CHOS del forraje, es un ácido graso volátil que sirve de fuente de energía para el rumiante. Una buen silaje contiene más del 3%. El ácido butírico es producto de fermentaciones secundarias, no siendo adecuados aquellos silajes con valores superiores a 0,1%. Este ácido confiere olor pútrido al silaje, siendo rechazado por el animal.

3.5 Bacterias lácticas como inoculantes para ensilado

El uso de aditivos para ensilajes tiene como objetivo principal la conservación del valor nutritivo del forraje, asegurando una calidad higiénica y sanitaria adecuadas. Las principales clases de aditivos utilizados son promotores de la fermentación (inoculantes microbianos, enzimas y sustratos fermentables), inhibidores de fermentaciones secundarias (ácidos y formaldehído), inhibidores del deterioro aeróbico (BAL, ácidos y sales), y nutrientes.

Básicamente, las BAL permiten la conservación del forraje por medio de tres mecanismos posibles: inhibición del desarrollo microbiano por disminución del pH, inhibición por compuestos anti-fúngicos e inhibición por producción de bacteriocinas [40]. Ya que existen distintos tipos de inoculantes bacterianos, compuestos por cepas de BAL individuales o combinadas, con adición de otros componentes como enzimas, la elección del inoculante a utilizar dependerá principalmente del forraje y del objetivo que se busque alcanzar.

3.5.1 Bacterias lácticas homofermentativas

Los inoculantes de primera generación están conformados por BAL homofermentantes, principalmente *L. plantarum* (heterofermentante facultativa), especies de *Pediococcus* y *Enterococcus faecium*, cuyo objetivo principal es acelerar la disminución del pH por la producción de ácido láctico. Existen numerosos estudios que indican que la inoculación con estas BAL produce silos con menor pH y contenido de CHOS, mayor contenido de MS y ácido láctico, y menor concentración de NH₃ y ácido butírico, en comparación con silajes no inoculados. La eficacia de estos inoculantes depende de numerosos factores, siendo mayores los beneficios en forrajes con baja carga de BAL epífitas y elevada capacidad *buffer*. Asimismo, aunque aún no se conocen los mecanismos, la inoculación mejoraría la *performance* animal aumentando la producción de leche. Sin embargo, la inoculación con BAL homofermentantes puede disminuir la estabilidad aeróbica, ya que el lactato puede ser utilizado como sustrato por las levaduras [41].

3.5.2 Bacterias lácticas heterofermentativas

Los problemas de estabilidad aeróbica llevaron al desarrollo de inoculantes de segunda generación, los cuales contienen una combinación de BAL homofermentantes y BAL heterofermentantes. Las últimas pueden generar compuestos anti-fúngicos, como ácido acético y propiónico. *L. buchneri* es la BAL heterofermentante más utilizada, debido a su capacidad de degradar el ácido láctico a ácido acético, 1,2-propanodiol y trazas de etanol, en condiciones anaeróbicas y valores de pH ácidos [42]. *L. brevis* es también utilizado para mejorar la estabilidad aeróbica de silajes, sin embargo, lo hace con menor eficiencia que *L. buchneri* [43].

3.6 Inoculantes comerciales

Existe una amplia variedad de inoculantes bacterianos comerciales para ensilajes, siendo la gran mayoría producidos por empresas extranjeras. Estos inoculantes están compuestos por combinaciones de distintas especies de BAL, incluso algunos contienen otros componentes como enzimas. La elección del inoculante depende del objetivo que se persigue, por ej. acelerar el

proceso de fermentación o aumentar la estabilidad aeróbica del silaje. En la tabla 3 se presenta un cuadro con algunos inoculantes disponibles en el mercado y sus principales características.

Tabla 3 – Inoculantes comerciales para silos disponibles en el mercado.

Nombre	Forraje	Microorganismos	Dosis (ufc/g)	Enzimas	Formato	Empresa
Lactisil Maíz	Maíz	<i>E. faecium</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>P. pentosaceus</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. buchneri</i>	1,5x10 ⁵	No	-	Medipharm SA (Chile)
Silobac 5	Maíz, sorgo y grano húmedo	<i>L. plantarum</i> K270, <i>L. plantarum</i> PA20	≥10 ⁵	No	Liofilizado	CHR Hansen
Silobac MP	Soja, alfalfa y pasturas	2 <i>L. plantarum</i> , <i>P. pentosaceus</i>	>10 ⁵	No	Liofilizado	
Lactosilo	Maíz, sorgo, alfalfa	<i>L. curvatus</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>P. acidilactici</i> , <i>E. faecium</i> , <i>L. lactis</i>	>10 ⁶	Complejo multienzimático Celulolítico	Concentrado soluble en agua	BASF
Lactosilo Gold	Maíz, sorgo, alfalfa	<i>L. curvatus</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>P. acidilactici</i> , <i>E. faecium</i> , <i>L. lactis</i> , <i>L. buchneri</i>	-	Complejo multienzimático celulolítico	Liofilizado	
Sil-All 4x4	Cualquier tipo	<i>E. faecium</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>P. acidilactici</i> , <i>L. salivarius</i>	10 ⁶	Celulasa, Hemicelulasa, Pentosanasa, Amilasa	Granulado soluble en agua	All-Tech
Sila-Bac 11 CFT	Granos	<i>L. casei</i> , <i>L. buchneri</i>	>10 ⁵	Si	Líquido	Pioneer
Sila-Bac 11 C33	Granos	<i>E. faecium</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. buchneri</i>	>10 ⁵	No	Líquido	
Sila-Bac 11 G22	Pasturas y cereales	<i>E. faecium</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. buchneri</i>	>10 ⁵	No	Líquido	
BiotSilageInoculant II	Maíz, alfalfa, cereales, pasturas	<i>P. pentosaceus</i> , <i>L. plantarum</i>	>10 ⁵	Si	Granulado, concentrado soluble en agua	
BiotSilBuchneri 40788	Grano de alta humedad	<i>L. buchneri</i> 40788	5x10 ⁵	Si	Concentrado soluble en agua	Lallemand (Canadá)
BiotSilPlus II	Pasturas, leguminosa, cereales	<i>Propionibacterium, freudenreichii</i> <i>R2453</i> , <i>P. pentosaceus</i> 12455	>1,2x10 ⁵	Si	Granulado, concentrado soluble en agua	
Ecosyl 100	Varios	<i>L. plantarum</i> MTD/1	>10 ⁵	No	Líquido o en polvo	Volac International Limited (UK)
SiloFull	Maíz, sorgo, granos húmedos, pasturas, alfalfa, trébol, soja	<i>P. acidilactici</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. acidophilus</i>	≥10 ⁵	No	Líquido	Alterbio S.A. (Argentina)
BioMaxMilho	Maíz y sorgo	<i>L. plantarum</i> MA18-5U, <i>Propionibacterium, acidipropionici</i> MA 26/4U	-	No	Polvo	Katec Lallemand (Brasil)

BactoSilo MS	Grano húmedo y pre-secado	<i>Propionibacterias</i>	-	No	Polvo	
BactoSilo Master	Forrajes de alta humedad	<i>L. plantarum MA18-5U, P. acidilactici MA18/5M</i>	-	Si	Polvo	
LalsilMilho	Maíz, sorgo y grano húmedo	<i>L. plantarum MA18/5U</i>	-	No	Polvo	Katec Lallemand (Brasil)
Lalsil CL	Gramíneas, maíz, sorgo y girasol	<i>P. acidilactici MA18/5M, L. plantarum MA18/5U</i>	-	No	Polvo	
Trilac 3300	-	<i>P. pentosaceus 12455, L. plantarum</i>	3x10 ⁵	Si	Concentrado soluble en agua	
FeedTech™ Silage F20	Varios	<i>L. plantarum, P. acidilactici 33-06, L. lactis SR3.54, E. faecium M74</i>	-	Celulasa	Polvo	
FeedTech™ Silage F400	-	<i>L. buchneri</i>	-	-	-	DeLaval
FeedTech™ Silage F600	-	<i>L. plantarum, P. acidilactici, L. lactis, E. faecium, L. buchneri</i>	-	-	-	
	-		-	-		
BioSilo	-	<i>P. acidilactici Ls72, L. plantarum Ls71, L. buchneri Ls141</i>	-	Enzimas celulolíticas	Liofilizado	Fragaria (Argentina)
Bemix plus	Maíz, sorgo, alfalfa, verdes	<i>L. plantarum, L. lactis, P. acidilactici</i>	Según forraje	-	Liofilizado	Nexus Agro (Argentina)
Bemix buc	Maíz, sorgo, alfalfa, verdes	<i>L. plantarum, L. lactis, P. acidilactici, L. buchneri</i>	Según forraje	-	Liofilizado	
Diasil	-		-	-	-	Diagramma (Argentina)
Soyker	-	<i>L. casei, L. lactis, L. plantarum.</i>	-	-	Polvo	Biotay

3.7 Técnicas NGS aplicadas en ensilados

Mediante el uso de técnicas microbiológicas dependientes de cultivos, se ha definido el papel fundamental de las BAL en el proceso de ensilaje y la contribución de microorganismos como *Clostridium*, *Bacillus*, levaduras y mohos en el deterioro del silaje. Estos estudios se basan en aislamientos, recuentos y caracterización de un número limitado de microorganismos que pueden cultivarse en el laboratorio, utilizando medios agarizados selectivos y condiciones específicas de incubación (tiempo, temperatura, aerobiosis/anaerobiosis). La microbiota epífita y las poblaciones microbianas asociadas al ensilaje son muy complejas, y la evidencia sugiere que muchos miembros de estas poblaciones pueden encontrarse en un estado viable pero no cultivable, o sencillamente no desarrollarse en las condiciones de cultivo utilizadas, lo que resulta en una subestimación de la diversidad microbiana asociada al ensilaje. Los avances en las técnicas de secuenciación masiva (NGS, *Next Generation Sequencing*) en los últimos años, han revolucionado el campo de la ecología microbiana. En particular, las técnicas de NGS aplicadas a ensilajes, han hecho posible la secuenciación del ADN microbiano extraído a partir de muestras en las distintas etapas del proceso, es decir, forrajes frescos, durante el ensilaje, luego de ser expuesto al aire, e incluso del rumen luego del consumo por el animal [44]. Existen dos metodologías basadas en NGS, por un lado, la secuenciación “shotgun”, la cual involucra la secuenciación del ADN total de una muestra, y por otro lado el “metaprofiling” (o perfilado genético a gran escala), la cual se basa en la secuenciación de un solo gen, marcador o amplicón, por ejemplo, el gen que codifica para el 16S rRNA en procariontes o sus regiones variables, siendo esta última la más utilizada por su menor costo.

Desde 2013 se han comenzado a aplicar estas técnicas de secuenciación de nueva generación en el estudio de poblaciones microbianas en ensilajes de diversos forrajes como alfalfa, pasturas, trébol rojo, maíz, trigo, *ryegrass*, avena, cebada y triticale [45]–[58]. La metagenómica ha sido utilizada en estos trabajos para describir la evolución de las poblaciones bacterianas durante el proceso de fermentación, comparando la microbiota epífita del forraje fresco con aquella asociada al producto final, con o sin la adición de inoculantes. También para comparar entre estas poblaciones microbianas durante el ensilaje de distintos tipos de forrajes o la variabilidad temporal y espacial de las comunidades en ensilajes a gran escala. En estos trabajos se ha informado como comportamiento general una disminución de la diversidad bacteriana en el transcurso del proceso de fermentación, y un dominio de BAL a lo largo del proceso. Asimismo, la naturaleza de la microbiota epífita y del silaje al final del proceso depende en gran medida de la naturaleza del forraje y de las condiciones ambientales. Si bien las técnicas dependientes de cultivos siguen siendo fundamentales en el aislamiento y caracterización de nuevas cepas con potencial para el desarrollo de inoculantes bacterianos, las técnicas NGS profundizarán el

conocimiento de la ecología microbiana de ensilajes, lo cual es importante para la mejora de la calidad y seguridad de los productos y para el desarrollo nuevos inoculantes.

3.8 Bacterias lácticas como probióticos en rumiantes

La microbiota de rumiantes se ha convertido en un foco de interés para veterinarios, nutricionistas y microbiólogos, con vista a seleccionar microorganismos con un impacto positivo en la salud y productividad animal, para promover su permanencia y eficacia como aditivos en la alimentación del ganado. Los efectos más significativos de probióticos en rumiantes han sido informados durante periodos específicos de estrés como destete, durante la lactancia y luego de un cambio de dieta. El objetivo principal del uso de probióticos en el ganado vacuno es la promoción de la salud, evitando y/o reduciendo la acidosis ruminal, mejorando el aumento de peso y la eficiencia alimentaria, así como la reducción de patógenos como *Escherichia coli* O157:H7 en materia fecal [59]. Por otro lado, los alimentos fermentados, como silajes, son una fuente rica en microorganismos vivos, con efectos beneficiosos potenciales que pueden ejercer su acción a través de distintos mecanismos, como la producción de compuestos inhibidores, la exclusión competitiva, la mejora de los parámetros de fermentación ruminal o tener efectos inmunomoduladores (Fig. 7). Sin embargo, la investigación en rumiantes no es tan extensa como en los monogástricos, y la mayoría de los estudios solo se han centrado en el impacto de estos microorganismos sobre la fermentación ruminal y el rendimiento productivo, dejando de lado el análisis de los efectos a nivel intestinal [60].

Aunque hasta el momento, los efectos y mecanismos de acción de estos microorganismos en el intestino no han sido bien definidos en rumiantes, en general se acepta que pueden mejorar el equilibrio microbiano, reducir la concentración de patógenos, afectar la absorción de nutrientes y las respuestas inmunitarias, tal y como se ha definido en los animales monogástricos (Fig. 8). Entre los mecanismos de acción se han propuesto la inhibición del desarrollo de patógenos por disminución del pH intestinal, competencia por sitios de adhesión y/o nutrientes, secreción de compuestos antimicrobianos, mejora de la función de la barrera intestinal y estimulación del sistema inmune. Los productos comerciales más comunes para los rumiantes son levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*), bacterias lácticas, *Bifidobacterium*, *Propionibacterium* y *Bacillus*. Entre las BAL, *L. acidophilus*, *L. plantarum*, *L. casei*, *L. lactis* *E. faecium* se han utilizado como probióticos en el ganado de engorde [59].

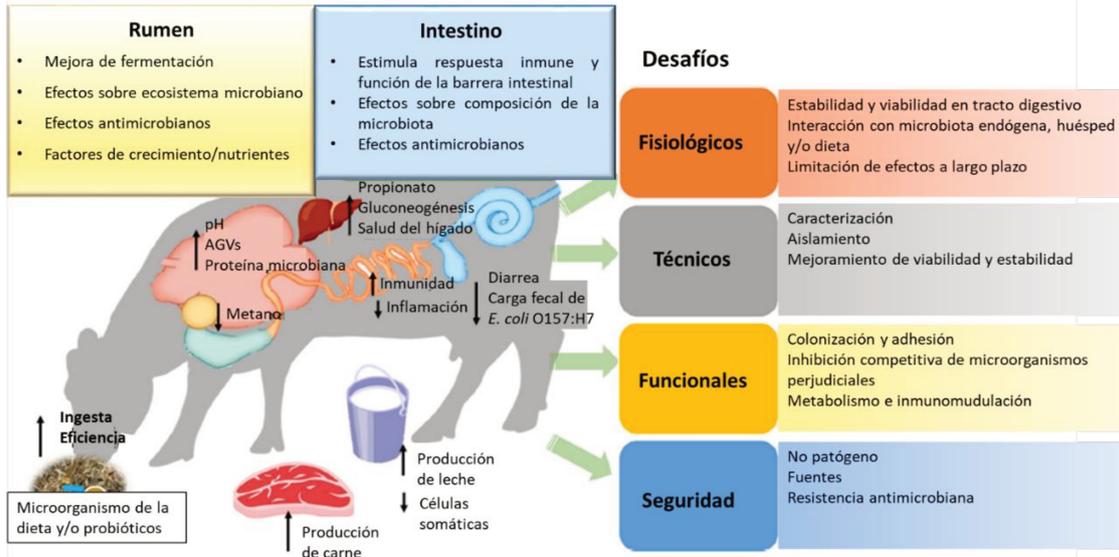


Figura 7 – Panorama general de los potenciales beneficios del consumo de microorganismos administrados en la dieta y/o probióticos, y los desafíos para el desarrollo de los mismos. Imagen adaptada de Ban & Guan (2021).

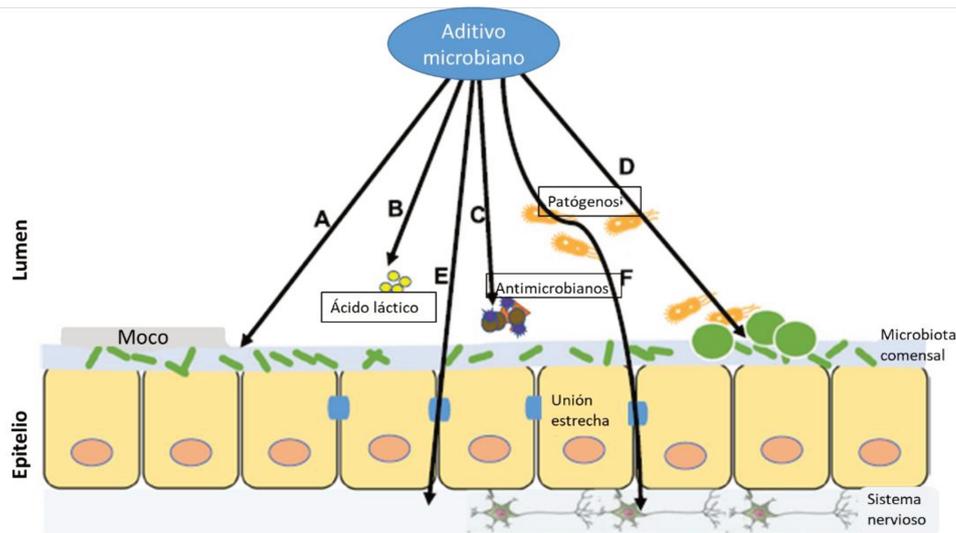


Figura 8 – Modos de acción de los microorganismos beneficiosos y/o probióticos a nivel intestinal propuestos en rumiantes. A) Aumento de la función de la barrera intestinal, B) Reducción del pH ruminal por producción de ácido láctico, C) producción de compuestos con acción antimicrobiana (ej. ácidos orgánicos, bacteriocinas), D) adherencia y competencia por nutrientes, E) estimulación de la respuesta inmune del hospedador, F) estimulación del sistema nervioso (ej. serotonina). Imagen adaptada de Ban & Guan (2021).

OBJETIVOS

Objetivo General

Desarrollar nuevos productos tecnológicos en base a bacterias lácticas autóctonas con capacidad fermentadora de matrices vegetales.

Objetivos específicos

- Aislar e identificar cepas de BAL presentes naturalmente en diversos forrajes.
- Caracterizar cepas aisladas de BAL homofermentantes en función de su capacidad de fermentación en ensilajes de diferentes materiales forrajeros.
- Caracterizar cepas aisladas de BAL heterofermentantes en función de su potencial para incrementar la estabilidad aeróbica de silajes.
- Estudiar la dinámica bacteriana en ensilajes de sorgo utilizando técnicas independientes del cultivo.
- Estudiar el potencial inmunomodulador de las BAL.
- Estudiar la capacidad promotora de la salud intestinal de silos de sorgo como un potencial plus probiótico de inoculantes.
- Estudiar la *performance* de BAL en el desarrollo de alimentos vegetales fermentados a base de avena o zanahoria.
- Estudiar la capacidad promotora de la salud intestinal de vegetales fermentados, inoculados con cepas de BAL con potencial inmunomodulador

CAPÍTULO 1

AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS LÁCTICAS A PARTIR DE MATERIAL VEGETAL

1. INTRODUCCIÓN

Los forrajes conservados, particularmente en forma de silajes, constituyen una porción importante de la dieta del ganado vacuno en numerosos países productores de leche y carne. La calidad del silaje influye directamente en la producción animal, viéndose afectada la digestibilidad y el consumo, cuando la calidad disminuye. Para contribuir a la conservación del valor nutritivo del silaje, suelen utilizarse aditivos como conservantes químicos, enzimas, sustratos, nutrientes e inoculantes bacterianos, y hasta combinaciones de ellos como por ejemplo inoculantes que contienen bacterias ácido lácticas combinadas con enzimas celulolíticas. Algunas de las características buscadas en un aditivo son: seguro y de fácil manejo, reducción de pérdidas de materia seca, no aumentar producción de efluentes, mejorar la calidad higiénica del silaje, limitar fermentaciones secundarias, aumentar la estabilidad aeróbica y mejorar la eficiencia de utilización del silaje [61]. Los inoculantes biológicos son los aditivos más utilizados debido a que son los que mejor se adecúan a estas características. *Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus pentosaceus* y *Enterococcus faecium* son, probablemente, las especies de BAL más utilizadas en inoculantes para silos, siendo responsables del descenso acelerado del pH y estabilización del material forrajero, principalmente a través de la producción de ácido láctico [40]. En la etapa final, al abrir los silos para el suministro del alimento a los animales, el material fermentado es expuesto al aire y comienza un proceso de deterioro del silaje, llevado a cabo principalmente por levaduras que asimilan lactato, manifestándose en un incremento de la temperatura de la masa vegetal seguido de un aumento del valor de pH. Esto último permite el crecimiento de microorganismos no deseados, ya sean deteriorantes y hasta posibles patógenos [62], lo cual disminuye el rendimiento por un menor consumo de alimento y riesgos para la salud del animal, además de posibles efectos negativos sobre la población humana. Para superar este problema, se utilizan las BAL heterofermentantes, las cuales a través de la producción principalmente de ácido acético, inhiben el desarrollo de hongos y levaduras, aportando a la conservación del material en contacto con el aire. La especie *L. buchneri* es actualmente, y ha sido por más de dos décadas, la más utilizada con este objetivo [63], [64]. Actualmente existen inoculantes compuestos de varias especies que combinan homofermentantes con heterofermentantes y hasta la adición de enzimas. En general, un uso adecuado de los inoculantes depende de los propósitos específicos que se persiguen. Por otro lado, existen cuestiones de gran interés en el desarrollo de inoculantes para ensilados, como la eficiencia de las cepas en la fermentación de distintos forrajes y la concentración a ser aplicada para alcanzar los efectos deseados.

El aumento en la demanda de estos aditivos por parte del sector productivo fomenta el desarrollo de inoculantes cada vez más eficientes y multifuncionales. Las empresas que desarrollan este tipo de productos están en constante búsqueda de nuevas cepas de BAL que

posean características deseables y sean capaces de preservar el material y evitar así pérdidas a lo largo del proceso de ensilaje y la alimentación animal. El aislamiento de nuevas cepas de BAL para su aplicación en ensilados ha sido una práctica común llevada a cabo a lo largo de los años, y posee aún gran importancia a nivel global [65]–[67] debido, además, al interés en coleccionar diversas cepas para futuras aplicaciones, no solo como inoculantes sino también en otros alimentos vegetales para uso animal y humano [68]. En Argentina, el mercado de inoculantes es altamente dominado por productos importados producidos con cepas extranjeras, siendo los países Europeos los que lideran este mercado, con un 44% del mercado de aditivos para ensilajes [69]. La disponibilidad de cepas de origen local podría promover el desarrollo de productos nacionales que fomenten nuestra economía. Asimismo, las principales empresas de inoculantes del mercado están ampliando sus unidades de negocio en varias zonas geográficas, centrándose en acuerdos y asociaciones con actores locales, incluyendo a los investigadores, introduciendo nuevos productos mediante inversiones en I+D [69]. Por ejemplo, la empresa Fragaría S.R.L. (Villa Cañas, Santa Fe) y el INLAIN (UNL-CONICET) han desarrollado, a través de un convenio de I+D, un inoculante para silos liofilizado compuesto por cepas de BAL de las especies *L. plantarum*, *P. acidilactici* y *L. buchneri*, aisladas a partir de maíz. Además, la importancia de la investigación y evaluación de nuevas cepas adaptadas a los procesos de fermentación de distintos forrajes locales ha sido destacada recientemente en un estudio realizado por Amaral et al. [70], resaltando que los resultados dependen principalmente de la cepa en estudio y de su interacción con el forraje.

El presente capítulo se centra en el aislamiento de cepas de BAL a partir de distintos sustratos vegetales, el estudio de la capacidad de fermentación cruzada en silos de distintos materiales, y en la búsqueda de nuevas especies candidatas a aumentar la estabilidad aeróbica.

2. OBJETIVOS

- ✓ Aislar e identificar cepas autóctonas de BAL presentes naturalmente en diversos forrajes.
- ✓ Caracterizar cepas aisladas de BAL homofermentantes en función de su cinética de crecimiento en distintos medios de cultivo y su capacidad de fermentación cruzada en ensilajes de diferentes materiales forrajeros.
- ✓ Caracterizar cepas aisladas de BAL heterofermentantes en función de su capacidad de producción de ácidos orgánicos e incremento de la estabilidad aeróbica de silajes.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Aislamiento de bacterias lácticas a partir de sustratos vegetales

3.1.1 Recolección de muestras y confección de micro-silos para fermentación espontánea

Se recolectaron muestras de una amplia variedad de materiales vegetales en campos de la provincia de Santa Fe (zona de Esperanza, Rafaela, Cavour, Grutly, Pozo Borrado y Candiotti) y Buenos Aires (Pergamino y Tandil) durante el año 2016: alfalfa (*Medicago sativa*), maíz (*Zea mays*), sorgo (*Sorghum* spp.), ryegrass (*Lolium perenne*), arroz (*Oryza sativa*), cebada (*Hordeum vulgare*), canola, *Gatton panic*, *Melilotus albus*, soja (*Glycine max*), trébol blanco (*Trifolium repens*), trigo (*Triticum* spp.), girasol (*Helianthus annuus*), avena (*Avena sativa*), y moha (*Setaria itálica*). Se cosecharon aproximadamente 2 kg de cada vegetal en el estado fisiológico adecuado para el ensilado (de acuerdo al criterio del productor local del cual se obtuvieron las muestras), se transportaron inmediatamente hacia el laboratorio y se procesaron (aproximadamente 1 kg) utilizando un triturador de laboratorio (BIMG-METVISA, Brasil), excepto el maíz y sorgo, los cuales fueron triturados a campo mediante el equipamiento agrícola adecuado (picadoras de maíz y sorgo). Luego de ser triturado, el material fue ensilado a pequeña escala, utilizando el siguiente sistema: se envasaron porciones de 500 g de cada material en bolsas de polietileno (Cryovac: BB4LA), se sellaron al vacío en envasadora (Turbovac, Bosch) y se incubaron a 35 °C (MiLab, SPX-250 B III, China). Se permitió la fermentación hasta que el silaje alcanzó un valor de pH menor o igual a 4,5 (Orion 3 Star, Thermo Fisher Scientific, Beverly, MA, Estados Unidos), el cual fue medido en réplicas de los micro-silos.

3.1.2 Aislamiento de bacterias lácticas

En la figura 9 se muestra un esquema general del proceso de aislamiento, selección y caracterización desarrollado en este capítulo de Tesis. Para el aislamiento de BAL, se tomaron muestras de 10 g del material fermentado en los micro-silos ($\text{pH} \leq 4,5$) y se homogeneizaron en *stomacher* (3 min, alta velocidad, 3 ciclos) con 90 ml de agua destilada estéril en bolsas Nasco Whirl-Pak® (Estados Unidos). Se realizaron diluciones seriadas de los sobrenadantes en agua de peptona 0,1 % (p/v) (Britania, Buenos Aires, Argentina) y se sembraron en superficie en MRS agar (Biokar, Beauvais, Francia). Las placas de Petri fueron incubadas en aerobiosis a 35 °C durante 48 h. Las colonias que presentaron morfología compatible con BAL en el microscopio de contraste de fases (1000 ×) fueron aisladas y purificadas por estrías sucesivas en MRS agar. A continuación, se realizó coloración de Gram y se analizó movilidad, actividad de catalasa,

formación de esporos y producción de gas (campana de Dürham) en MRS utilizando procedimientos estándares. Los aislamientos de BAL homo y heterofermentantes presuntivos fueron almacenados a -20 y -70 °C en caldo MRS suplementado con glicerol al 20 % (v/v).

3.2 Identificación de los aislamientos por MALDI-TOF

La identificación preliminar de los aislamientos se realizó mediante el análisis de los espectros peptídicos obtenidos por espectrometría de masas MALDI-TOF MS (por sus siglas en inglés *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry*), usando el espectrómetro de masas AXIMA Performance™ (Shimadzu Scientific Instruments, Estados Unidos). La determinación fue llevada a cabo por el Laboratorio de Espectrometría de Masas de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral. Según el protocolo, se colocó una muestra de cada colonia fresca sobre un pocillo de la placa metálica específica, se agregó 1 µl de la matriz orgánica ácido α -ciano-4-hidroxicinámico (HCCA) y se dejó evaporar el solvente a temperatura ambiente. Por último, se introdujo la placa con las muestras en el equipo y se procedió al análisis, utilizando la cepa *Escherichia coli* DH5- α como control positivo. Para el análisis de los espectros obtenidos se empleó el software SARAMIS (Kratos Analytical Ltd., Reino Unido), considerando un porcentaje de similitud mayor al 70 % con los espectros de la base de datos de referencia (SARAMIS) para la asignación taxonómica de las muestras analizadas.

3.3 Caracterización y selección de cepas de *L. plantarum*

3.3.1 Capacidad de crecimiento de *L. plantarum* en medio extracto vegetal

Se estudió la capacidad de desarrollo de los aislamientos correspondientes a *L. plantarum* obtenidos a partir de alfalfa, avena, sorgo y maíz, en medios de crecimiento vegetales preparados a partir de cada uno de estos cuatro forrajes. Los medios extracto vegetal (MEV) se prepararon a partir de muestras frescas de alfalfa (MEAl), avena (MEAv), sorgo (MES) y maíz (MEM), las cuales fueron trituradas y homogeneizadas con agua destilada (1:10) en *stomacher* (3 min, alta velocidad, 3 ciclos) y la suspensión obtenida se filtró (papel filtro Quanty JP41 Faixa Preta, Brasil) y centrifugó (5000 x g, 10 min, 8 °C). Finalmente, se recolectó el sobrenadante, se ajustó su pH a 6,5 con NaOH 1 M, y se esterilizó (121 °C, 15 min). Para obtener la cinética de crecimiento, cada cultivo *overnight* en caldo MRS ($2-3 \times 10^9$ ufc/ml) se lavó 2 veces con *buffer* PBS (solución salina de fosfato, pH 7,4), se realizó una dilución 1/10 en *buffer* PBS y se inoculó al 1% (v/v) en cada MEV en una concentración final del orden de 10^6 ufc/ml. La suspensión de cada *L. plantarum* fue distribuida en microplacas de 96 pocillos (300 µl/pocillo) y se midió densidad óptica (570 nm) cada 30 min en un Fotómetro de microplacas (Thermo Scientific Multiskan FC)

a 35 °C en aerobiosis. Los parámetros cinéticos μ_{\max} (tasa máxima de crecimiento como variación de DO_{570nm} en función del tiempo (h)) y λ (fase lag, h) se obtuvieron utilizando el complemento DMFit versión 3.5 (Institute of Food Research, Norwich Research Park) de Microsoft Excel, ajustando las curvas obtenidas al modelo de Gompertz modificado según Zwietering et al. [71]. En paralelo, 5 ml de cada MEV inoculado fue incubado en tubos de ensayo a 35 °C en aerobiosis, y se determinó pH y recuento celular a las 24 y 48 h. Los resultados se expresaron como $\Delta \log_{10}$ (ufc/ml), donde Δ se refiere a la diferencia entre el recuento a las 24 y 48 h con respecto al recuento celular inicial (tiempo 0). Cada aislamiento fue ensayado independientemente por triplicado. Por último, una vez seleccionadas las cepas de *L. plantarum* a partir de su comportamiento en el presente ensayo, las mismas fueron utilizadas en un ensayo de fermentación cruzada (todas las cepas en cada uno de los MEV), utilizando la misma metodología aquí descrita.

3.3.2 Confirmación de identidad y diversidad genotípica de las cepas de *L. plantarum*

La identidad de los aislamientos de *L. plantarum* seleccionados a lo largo de esta tesis fue confirmada por secuenciación parcial del gen 16S ARNr. Para esto, la extracción del ADN total se realizó de la siguiente manera: se partió de 1,5 ml de cultivo fresco (MRS, 37 °C, 18 h), se centrifugó (16000 \times g, 2 min, 4 °C), se lavó el pellet y se procedió con la extracción usando el kit comercial GenElute Bacterial Genomic DNA (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, Estados Unidos) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Para la amplificación de los fragmentos de ADN de 1500 pb, correspondientes al gen 16S ARNr, se utilizaron los cebadores pA *forward* (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y pA *reverse* (5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3') [72]. Las amplificaciones (reacciones PCR) fueron realizadas utilizando 2 μ l del ADN diluido (1:50), 2,5 U Taq DNA polimerasa (GE Healthcare, Reino Unido), 200 μ l dNTPs (GE Healthcare) y 100 nM de cada cebador (Sigma-Genosys, Estados Unidos) en un volumen final de 50 μ l. Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador GenAmp PCR System (Applied Biosystem, Estados Unidos) en las siguientes condiciones: 3 min a 94 °C, 36 ciclos de desnaturalización de 1 min a 94 °C, etapa de hibridación de los cebadores durante 2 min a 51 °C, y un ciclo de extensión durante 6 min a 72 °C. Los productos de la PCR fueron separados en gel de agarosa 0,8 % (p/v) en TBE *buffer*, teñidos con GelRed (Biotium, Hayward, CA, Estados Unidos) y visualizados bajo luz UV. La posterior purificación de los amplicones se realizó con GenElute™ PCRClean-Up Kit (Sigma-Aldrich, Estados Unidos). La secuenciación de los fragmentos purificados se realizó en el Servicio de Secuenciación Macrogen (Seúl, Corea) y las secuencias nucleotídicas obtenidas fueron comparadas con las secuencias disponibles en la base de datos GenBank del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), a través de un alineamiento básico BLAST para determinar la identidad de los aislamientos seleccionados.

La diversidad genotípica de los aislamientos de *L. plantarum* seleccionados se estudió mediante un análisis de RAPD-PCR (Random Amplification of Polimorphic DNA), usando dos cebadores arbitrarios B10 (5'-CTGCTGGGAC -3') y M13 (5'- GAGGGTGGCGGTTCT-3'), en reacciones independientes. Las reacciones de PCR se realizaron en las siguientes condiciones: volumen final de 25 μ l con 1 μ l de ADN como templado, 2,5 U de Taq polimerasa (Sigma, Estados Unidos) y una concentración final de 500 nmol/l para el cebador B10 y 1000 nmol/l para el cebador M13, Las reacciones de RAPD-PCR se realizaron según Binetti et al. [73] para el cebador B10, y según Giraffa et al. [74] para el cebador M13, El marcador molecular de ADN 1 kb plus DNA Ladder (Sigma, Estados Unidos) fue utilizado como estándar en los geles de agarosa. Las imágenes digitales de los geles de agarosa obtenidos se analizaron mediante el software BioNumeric 6.1 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Bélgica). El método de agrupamientos, Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Average (UPGMA) [75], se utilizó para generar el dendrograma a partir de los perfiles de bandas obtenidos, luego de normalizar y medir la densidad de las mismas.

3.3.3 Evaluación de cepas de *L. plantarum* como inoculante en micro-silos

3.3.3.1 Confección de micro-silos

Se confeccionaron micro-silos de avena, alfalfa, sorgo y maíz utilizando el procedimiento general [36], descrito a continuación. El material vegetal correspondiente (avena, sorgo y maíz) fue cosechado y picado a campo (largo aproximado 10-17 mm) por máquinas agrícolas, y trasladado al laboratorio para ser inmediatamente procesado. Por otro lado, se prepararon las suspensiones de BAL a ser estudiadas: cultivos *overnight* (16 h, 37°C, aerobiosis, caldo MRS) fueron centrifugados (5000 \times g, 15 min, 8°C), lavados 2 veces con *buffer* PBS y resuspendidos en NaCl 0,85 % (p/v). Para la confección de los micro-silos, el material picado se roció, a razón de 20 ml/kg de forraje fresco, con la suspensión de la cepa correspondiente de BAL en una concentración adecuada, según el diseño experimental. El control (no inoculado) fue rociado con la misma cantidad de NaCl 0,85% (p/v). En cada ensayo, todos los tratamientos se aplicaron al mismo tiempo. El material inoculado fue distribuido en porciones de 1 kg y envasado en bolsas de polietileno (Cryobac: BB4LA) y cerrados al vacío (Turbovac, Bosch). Los micro-silos fueron mantenidos a temperatura ambiente (25 °C) por diferentes periodos de tiempo dependiendo del ensayo específico. Los micro-silos se confeccionaron por triplicado para cada punto de muestreo. Este protocolo fue utilizado a lo largo de este trabajo de Tesis para el estudio de la capacidad de ensilado de las cepas de BAL seleccionadas.

En el caso particular de la alfalfa, la misma se dejó orear durante 4 h previo al traslado al laboratorio, donde fue ensilada en baldes de 5 kg.

3.3.3.2 Ensayo de dosis-respuesta

Se estudió el efecto de la dosis de inoculación de BAL en la fermentación del maíz utilizando las cuatro cepas de *L. plantarum* seleccionadas en base a su comportamiento en los MEV (LpAv, LpA3, LpS13 y LpM15), para lo cual se confeccionaron micro-silos de maíz según lo descrito anteriormente (3.3.3.1). *L. plantarum* LpAv, LpA3, LpS13 y LpM15 se inocularon a una concentración inicial de 10^4 , 10^5 , 10^6 y 10^7 ufc/g de material fresco. Se usó el control sin tratar rociado con NaCl 0,85 % (p/v). El recuento de BAL totales y el valor de pH fueron determinados en triplicados independientes a tiempo inicial y luego de 24, 48, 72 h y 30 días de fermentación.

3.3.3.3 Fermentación cruzada

Denominamos fermentación cruzada a la utilización de una cepa de *L. plantarum* para la fermentación de un forraje diferente al forraje del cual se aisló la misma. En este ensayo se confeccionaron micro-silos de avena, alfalfa, sorgo y maíz, según lo descrito (3.3.3.1), inoculados con *L. plantarum* LpAv, LpA3, LpS13 y LpM15 en una concentración del orden de 10^6 ufc/g de forraje picado. El silo control fue rociado con el mismo volumen de NaCl 0,85 % (p/v). Se realizaron los recuentos microbiológicos y la determinación de pH a distintos tiempos de almacenaje, dependiendo de la naturaleza del forraje: 0, 2 y 30 días (avena); 0, 3 y 30 días (alfalfa); 0, 1, 3 y 30 días (sorgo y maíz). Los micro-silos fueron realizados por triplicado para cada tiempo de muestreo. El recuento de BAL totales se realizó en MRS agar (37 °C, 48 h, aerobiosis) y el de levaduras y hongos en Glucosa Cloranfenicol agar (Biokar, Francia) (25 °C, 7 días, aerobiosis). Las siguientes determinaciones fueron realizadas solo a tiempo inicial y luego de 30 días de fermentación: materia seca (% MS; PROMEFA-v2 AOAC, 1990 N°130.15 and N° 167.03), proteína bruta (% PB; AOAC, 1998 N° 976.05), cenizas (% Cz, AOAC1990 N1C 942.05), fibra detergente ácido (% FDAs; Método ANKOM basado en la norma ISO13906:2008), fibra detergente neutro (% FDNa; método ANKOM basado en la norma ISO16472:2006), Lignina detergente ácido (% LDA; PROMEFA-v2, ANKOM), extracto etéreo (% EE; AOAC 1999 N°920.39). Además, se cuantificó el Nitrógeno amonio/Nitrógeno total (N-NH₃/NT; Blain and Urtunette, 1954) luego de 2 y 30 días para avena, 3 y 30 días para alfalfa, 1 y 30 días para sorgo y maíz. Los análisis se realizaron por triplicado en el Laboratorio de Forrajes del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA, Rafaela, Santa Fe, Argentina).

3.4 Selección de BAL heterofermentantes

3.4.1 Producción de ácido láctico y acético

Se evaluó la capacidad de producción de ácido láctico y acético de 37 cepas de BAL heterofermentantes aisladas en este trabajo. Además, dos cepas de *L. buchneri*, Ls141 y 463, fueron usadas como referencia. Ls141 fue aislada de silos de maíz en un trabajo previo [36] y es actualmente utilizada en un inoculante comercial producido en Argentina (Biosilo), producto de la transferencia tecnológica de tres cepas aisladas por el grupo de trabajo a la empresa santafesina Fragaría S.R.L. (Villa Cañas, Santa Fe). Por otro lado, *L. buchneri* 463 fue aislada de salsa de tomate comercial deteriorada, siendo amablemente proporcionada por el Dr. Juan Martín Oteiza (CIATI, Villa Regina, Río Negro). Se partió de un cultivo *overnight* en MRS caldo (35 °C) de cada cepa y se realizaron dos repiques sucesivos al 1 % (v/v) en 10 ml de MRS caldo suplementado con cisteína (0,1 % (p/v)), y se incubaron a 35 °C en anaerobiosis durante 18 h. Se realizó un tercer repique en las mismas condiciones, incubando durante 72 h. Los cultivos fueron centrifugados (5000 xg, 10 min, 8 °C) y los sobrenadantes recolectados y filtrados (filtros de 0,45 µm de Nitrato de Celulosa, Sartorius, Francia). La cuantificación de ácidos láctico y acético se llevó a cabo por cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC). El sistema cromatográfico consistió en una bomba cuaternaria, desgasificador en línea, inyector manual, horno para control de temperatura de la columna y dos detectores en línea de UV-visible (210 nm) e índice de refracción (Perkin Elmer, Estados Unidos). La separación cromatográfica se realizó a 65 °C con H₂SO₄10 mM como fase móvil a un flujo isocrático de 0,6 ml/min, utilizando una columna Aminex HPX-87H (300 x 7,8 mm) equipada con un protector de columna Aminex Cation-H (Bio-Rad Laboratories, Estados Unidos). Los sobrenadantes de cultivo fueron diluidos 1:3 con H₂SO₄10 mM, filtrados a través de membranas de 0,45 µm (Millex, Millipore, Brasil) e inyectados en el cromatógrafo, usando un *loop* de 60 µl. Los datos fueron recolectados y procesados con el software Chromera (Perkin Elmer).

3.4.2 Estabilidad aeróbica en micro-silos de maíz

Se confeccionaron micro-silos de maíz (3.3.3.1) para estudiar la capacidad de inhibición de mohos y levaduras, por parte de las cepas de BAL heterofermentantes seleccionadas previamente en función de la producción de ácido acético (3.4.1). *Lactobacillus fermentum* (actualmente denominado *Limosilactobacillus fermentum*) LfSY1 y LfM1, *Lactobacillus brevis* (actualmente denominado *Levilactobacillus brevis*) LbB2 y LbM6 y *L. buchneri* Ls141 y 463 fueron inoculados en una concentración inicial de 1x10⁶ ufc/g de forraje fresco picado. Los valores de pH y recuentos de BAL totales fueron determinados en silos controles y tratados, al tiempo inicial y luego de 45 y 90 días de fermentación. Además, se determinó materia seca como se indicó

anteriormente (3.3.3.3). Luego de 90 días, los silos fueron abiertos y se determinó estabilidad aeróbica de acuerdo a Burns et al. [76], en una habitación con temperatura controlada (21 ± 1 °C), en triplicados. Se define estabilidad aeróbica como el tiempo necesario para que la temperatura interna del material ensilado aumente 2 °C con respecto a la temperatura ambiente, es decir, el tiempo en que el silo se mantiene sin señales de deterioro microbiano una vez expuesto al aire por su apertura.

3.5 Análisis estadístico

Todas las mediciones se determinaron por triplicado y los resultados se presentaron como promedio \pm desviación estándar (SD). Los datos obtenidos fueron analizados mediante el método ANOVA de un factor, verificando la homogeneidad de varianzas, utilizando el *software* SPSS 15.0 (SPSS Inc., Chicago, Estados Unidos). Las diferencias entre medidas fueron analizadas por las pruebas *post hoc* de Tuckey, para la comparación entre todos los grupos, o prueba de Dunnet, para la comparación de un grupo tratado con respecto al control. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando el valor p obtenido fue menor a 0,05.

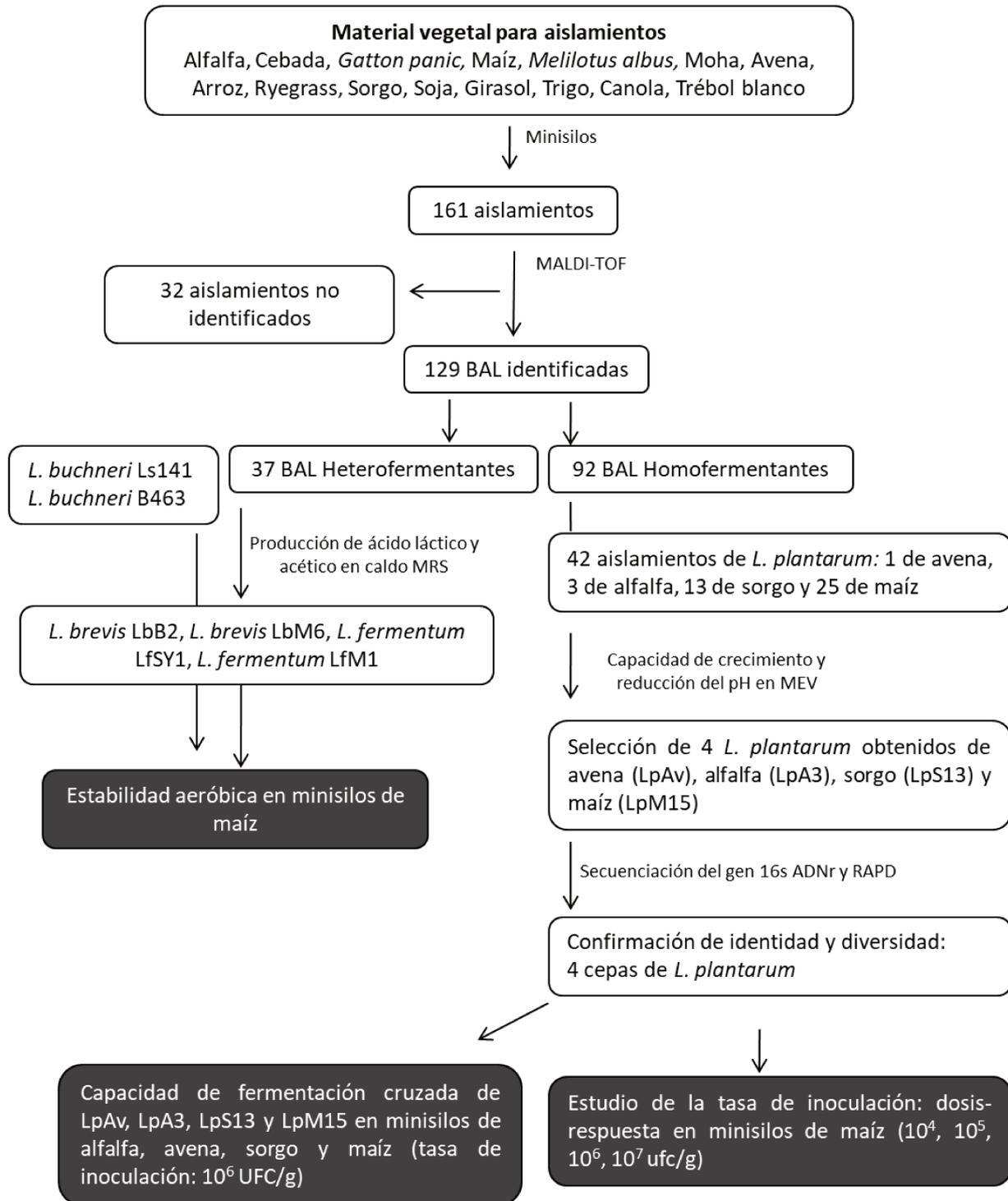


Figura 9 – Diagrama de flujo del proceso de aislamiento, selección y caracterización de BAL.

4. RESULTADOS

4.1 Aislamiento de BAL a partir de material vegetal e identificación de los aislados por MALDI-TOF

Se procesaron un total de 51 muestras de 15 tipos de cultivos vegetales diferentes, siendo 14 los sustratos que permitieron obtener 161 aislamientos presuntivos de BAL: alfalfa, maíz, sorgo, ryegrass, arroz, cebada, *Gatton panic*, *Melilotus albus*, soja, trébol blanco, trigo, girasol, avena, y moha. La canola fue la excepción de la cual no se obtuvieron aislamientos, aunque solo una muestra de este material fue procesada. Un total de 129 aislamientos fueron identificados por MALDI-TOF MS (Tabla 4). El resto de los aislamientos, no identificados, no se consideraron para el estudio posterior. La especie mayormente aislada en este trabajo fue *L. plantarum*, la cual fue obtenida a partir de 10 especies de plantas. Por otro lado, las heterofermentantes *L. brevis* y *L. fermentum* fueron aisladas a partir de 6 de los 14 tipos de vegetales incluidos en este estudio. Además, se obtuvieron aislamientos de *L. paracasei*, *L. rhamnosus*, algunas del género *Pediococcus* (*P. acidilactici*, *P. pentosaceus*), *Leuconostoc* (*L. citreum*, *L. pseudomesenteroides*), *Weisella* (*W. confusa*, *W. cibaria*) y algunas especies del género *Lactococcus* y *Enterococcus*.

Tabla 4 –Identificación por MALDI-TOF MS de las BAL obtenidas a partir de sustratos vegetales.

Muestra ^a	Especies aisladas	Identificación
Alfalfa (5)	<i>Lactiplantibacillus pentosus/plantarum</i>	LpA1, LpA2, LpA3
	<i>Pediococcus acidilactici</i>	PaA1, PaA2, PaA3, PaA4
	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	PpA1, PpA2
Cebada (5)	<i>Levilactobacillus brevis</i>	LbB1, LbB2, LbB3
	<i>Lactococcus garvieae</i>	LgB1, LgB2
	<i>Enterococcus hirae</i>	EB1, EB2
	<i>Enterococcus avium/raffinosis</i>	EB3
	<i>Enterococcus faecium</i>	EB4
<i>Gatton panic</i> (2)	<i>Enterococcus durans</i>	EG1
Maíz (11)	<i>Lactiplantibacillus pentosus/plantarum</i>	LpM0, LpM1, LpM2, LpM3, LpM4, LpM5, LpM6, LpM7, LpM8, LpM9, LpM10, LpM11, LpM12, LpM13, LpM14, LpM15, LpM16, LpM17, LpM18, LpM19, LpM20, LpM21, LpM22, LpM23, LpM24
	<i>Lactocaseibacillus paracasei</i>	LpaM1

	<i>Levilactobacillus brevis</i>	LbM1, LbM2, LbM3, LbM4, LbM5, LbM6, LbM7, LbM8, LbM9, LbM10, LbM11, LbM12, LbM13, LbM14, LbM15, LbM16, LbM17
	<i>Limosilactobacillus fermentum</i>	LfM1, LfM2, LfM3, LfM4
	<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i>	LrM1
	<i>Pediococcus acidilactici</i>	PaM1
	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	PpM1, PpM2, PpM3
	<i>Leuconostoc citreum</i>	LciM1
	<i>Weissella confusa</i>	WcM1
	<i>Lactobacillus</i> sp.	LspM
Melilotus albus (1)	<i>Lactiplantibacillus pentosus/plantarum</i>	LpML1
	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	PpML1
Moha (1)	<i>Limosilactobacillus fermentum</i>	LfMH
	<i>Lactiplantibacillus pentosus/plantarum</i>	LpAv
Avena (5)	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	LcAv
	<i>Levilactobacillus brevis</i>	LbAv
	<i>Pediococcus acidilactici</i>	PaAv1, PaAv2, PaAv3
	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	LeuAv
Arroz (3)	<i>Limosilactobacillus fermentum</i>	LfRi1
Ryegrass (1)	<i>Lactiplantibacillus pentosus/plantarum</i>	LpRY1, LpRY2, LpRY3, LpRY4, LpRY5
	<i>Levilactobacillus brevis</i>	LbRY1, LbRY2, LbRY3
	<i>Weissella confusa</i>	WcRY1
Sorgo (6)	<i>Lactiplantibacillus pentosus/plantarum</i>	LpS1, LpS2, LpS3, LpS4, LpS5, LpS6, LpS7, LpS8, LpS9, LpS10, LpS11, LpS12, LpS13
	<i>Levilactobacillus brevis</i>	LbS1
	<i>Lactiplantibacillus pentosus/plantarum</i>	LpSY1
Soja (2)	<i>Levilactobacillus brevis</i>	LbSY1
	<i>Limosilactobacillus fermentum</i>	LfSY1, LfSY2, LfSY3, LfSY4
	<i>Pediococcus acidilactici</i>	PaSY1
Girasol (3)	<i>Lactiplantibacillus pentosus/plantarum</i>	LpSF1
	<i>Enterococcus hirae</i>	EhSF1
	<i>Lactiplantibacillus pentosus/plantarum</i>	LpW1, LpW2
Trigo (3)	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	LeuW1, LeuW2
	<i>Lactococcus lactis</i>	LIW1
	<i>Lactiplantibacillus pentosus/plantarum</i>	LpWC1, LpWC2
Trébol blanco (3)	<i>Enterococcus faecium</i>	EfWC1, EfWC2
	<i>Enterococcus</i> sp.	EspWC1, EspWC2, EspWC3

^a El número entre paréntesis se refiere al número de muestras analizadas de cada material. En la tabla se utilizan las nuevas denominaciones de las especies reclasificadas: *Lactiplantibacillus pentosus/plantarum* (*Lactobacillus pentosus/plantarum*), *Levilactobacillus brevis* (*Lactobacillus brevis*), *Limosilactobacillus fermentum* (*Lactobacillus fermentum*), *Lacticaseibacillus paracasei* (*Lactobacillus paracasei*), *Lacticaseibacillus rhamnosus* (*Lactobacillus rhamnosus*).

4.2 Capacidad de desarrollo de aislamientos de *L. plantarum* en MEV: selección y confirmación de identidad

Se estudió la capacidad de desarrollo de los aislamientos de *L. plantarum* de avena (LpAv), alfalfa (LpA1-LpA3), sorgo (LpS1-LpS13) y maíz (LpM1-LpM19, LpM21-LpM24), en los medios de crecimiento vegetal MEAv, MEAl, MES y MEM, respectivamente. En general, los cambios observados en el pH del cultivo (Tabla 5) reflejaron la capacidad de todos los aislamientos de *L. plantarum* de fermentar el MEV correspondiente. Particularmente, LpAv disminuyó el pH del MEAv desde 6,55 a 4,80 en 24 h. LpA1, LpA2 y LpA3 disminuyeron el pH del MEAl desde 6,26 a 5,80-5,95 luego de 24 h de fermentación, siendo el valor mínimo alcanzado en este extracto. Los *L. plantarum* aislados de sorgo disminuyeron el pH del MES desde 6,47 en el control a 3,43-4,03 en 24 h, y 3,78-3,90 en 48 h. Los aislamientos de *L. plantarum* obtenidos de maíz redujeron los valores de pH desde 6,19 a 3,91-4,25 luego de 24 h, generando una pequeña caída de pH adicional en las próximas horas de incubación. Los valores de pH de los controles permanecieron sin variaciones desde el tiempo inicial hasta las 72 h de incubación en los cuatro extractos vegetales.

En la figura 10 se muestran las curvas de crecimiento obtenidas, y en la tabla 6 se encuentran listados los parámetros cinéticos estimados. En particular, LpAv presentó una fase lag estimada en 1,20 h, alcanzando su fase estacionaria aproximadamente a las 8 h de incubación. Con respecto a los recuentos, tuvieron un máximo de 1×10^8 ufc/ml a las 24 h, disminuyendo la viabilidad para las 48 h de incubación. En el caso de los cultivos de *L. plantarum* aislados de alfalfa, LpA1 y LpA2 mostraron un comportamiento similar entre ellos, en base a los parámetros cinéticos, alcanzando ambos una DO_{570nm} máxima estimada de 0,22 – 0,23 a las 6 h de cultivo. Por otro lado, aunque LpA3 presentó una μ_{max} menor que los anteriores, su fase lag también fue menor (aproximadamente la mitad), alcanzando además valores de DO_{570nm} de 0,31 a partir de las 11 h de crecimiento aproximadamente. Esta diferencia se refleja también en los recuentos de BAL totales (Fig. 11) a las 24 h de incubación, al menos entre LpA2 y LpA3, siendo mayor el $\Delta \log_{10}$ ufc/ml para este último. Asimismo, LpA3 produjo un valor de pH significativamente menor comparados con LpA1 y LpA2. En general, los *L. plantarum* de alfalfa desarrollaron hasta un máximo de $2,5-4 \times 10^8$ ufc/ml en 24 h en el MEAl, manteniendo estos valores sin diferencias significativas para cada cepa hasta las 48 h. Para los cultivos de *L. plantarum* aislados de sorgo, todos produjeron una disminución satisfactoria del pH del medio en 24 h de incubación, el cual

partió en $6,46 \pm 0,08$ y se redujo a valores de 3,93-4,03. Además, con excepción de LpS3, los demás aislamientos mostraron un crecimiento de entre 1 y 1,5 ordenes logarítmicos. Particularmente, LpS5 y LpS13 fueron los que produjeron los menores valores de pH a las 24 h, siendo, además, los parámetros cinéticos y los recuentos totales similares entre ambos. En general, los cultivos de *L. plantarum* de sorgo tuvieron recuentos máximos de 7,5-8 órdenes logarítmicos a las 24 h, perdiendo viabilidad a las 48 h. Por último, al analizar el desempeño de los *L. plantarum* aislados de maíz en el extracto del mismo forraje, se observó que LpM3, LpM15 y LpM11 produjeron la mayor caída del pH, mostrando este último un μ_{max} menor y un λ mayor a los dos primeros. En general, para los *L. plantarum* de maíz se obtuvo un recuento máximo a las 24 h de 7,8-8,4 órdenes logarítmicos, con la excepción del LpM6, el cual presentó un recuento menor (7,4). Teniendo en cuenta la aptitud fermentativa de los *L. plantarum* evaluados para desarrollarse en el MEV a partir del que fueron aislados, se seleccionaron LpAv, LpA3, LpS13 y LpM15 para continuar con los estudios.

Tabla 5 - Valores de pH de los medios extracto vegetal (MEV) inoculado con cultivos de *L. plantarum* aislados de alfalfa (LpA1-LpA13), avena (LpAv), sorgo (LpS1-LpS13) y maíz (LpM1-LpM19, LpM21-LpM24), luego de 24, 48 y 72 h de cultivo en medio extracto de alfalfa, avena, sorgo y maíz, y al inicio (t = 0).

Medio	Nombre	Tiempo (h)			
		0	24	48	72
Medio extracto alfalfa (MEAl)	Control		$6,26 \pm 0,02^a$	$6,26 \pm 0,04^a$	Nd
	LpA1	$6,29 \pm 0,05$	$5,95 \pm 0,01^b$	$6,08 \pm 0,04^b$	Nd
	LpA2		$5,87 \pm 0,05^b$	$6,10 \pm 0,01^b$	Nd
	LpA3		$5,80 \pm 0,03^c$	$5,94 \pm 0,01^c$	Nd
Medio extracto avena (MEAv)	Control	$6,55 \pm 0,04$	$6,60 \pm 0,06^a$	$6,61 \pm 0,06^a$	Nd
	LpAv		$4,80 \pm 0,05^b$	$4,89 \pm 0,04^b$	Nd
Medio extracto sorgo (MES)	Control		$6,46 \pm 0,08^a$	$6,43 \pm 0,01^a$	$6,42 \pm 0,01^a$
	LpS1	$6,47 \pm 0,02$	$4,03 \pm 0,01^{b,c}$	$3,80 \pm 0,02^d$	$3,78 \pm 0,01^d$
	LpS2		$4,03 \pm 0,01^b$	$3,87 \pm 0,01^c$	$3,85 \pm 0,04^{b,c}$
	LpS3		$4,03 \pm 0,01^b$	$3,97 \pm 0,04^b$	$3,90 \pm 0,02^b$
	LpS4		$3,97 \pm 0,01^{b,c}$	$3,88 \pm 0,01^c$	$3,85 \pm 0,01^{b,c}$
	LpS5		$3,93 \pm 0,02^c$	$3,87 \pm 0,01^c$	$3,84 \pm 0,02^c$
	LpS6		$3,98 \pm 0,02^{b,c}$	$3,90 \pm 0,01^c$	$3,85 \pm 0,03^{b,c}$
	LpS7		$4,02 \pm 0,01^{b,c}$	$3,91 \pm 0,01^c$	$3,88 \pm 0,01^{b,c}$
	LpS8		$4,02 \pm 0,01^{b,c}$	$3,90 \pm 0,01^c$	$3,88 \pm 0,02^{b,c}$
	LpS9		$4,02 \pm 0,01^{b,c}$	$3,89 \pm 0,01^c$	$3,86 \pm 0,01^{b,c}$
	LpS10		$4,01 \pm 0,01^{b,c}$	$3,90 \pm 0,01^c$	$3,88 \pm 0,01^{b,c}$
	LpS11		$4,01 \pm 0,01^{b,c}$	$3,91 \pm 0,01^c$	$3,89 \pm 0,02^{b,c}$
	LpS12		$4,00 \pm 0,01^{b,c}$	$3,90 \pm 0,01^c$	$3,89 \pm 0,01^{b,c}$
LpS13	$3,96 \pm 0,01^c$		$3,91 \pm 0,01^c$	$3,89 \pm 0,02^{b,c}$	
Medio extracto maíz (MEM)	Control		$6,19 \pm 0,04^a$	$6,24 \pm 0,01^a$	$6,25 \pm 0,01$
	LpM1	$6,14 \pm 0,01$	$3,98 \pm 0,03^{d,e,f,g}$	$3,85 \pm 0,01^{d,e,f}$	$3,72 \pm 0,01$
	LpM2		$4,00 \pm 0,01^{d,e,f}$	$3,84 \pm 0,01^{d,e,f,g}$	$3,73 \pm 0,01$
	LpM3		$3,91 \pm 0,01^g$	$3,88 \pm 0,10^{c,d,e}$	$3,73 \pm 0,02$
	LpM4		$3,96 \pm 0,05^{e,f,g}$	$3,91 \pm 0,01^{b,c,d}$	$3,77 \pm 0,01$
	LpM5		$4,14 \pm 0,06^c$	$3,85 \pm 0,01^{d,e,f}$	$3,75 \pm 0,01$

LpM6	$4,25 \pm 0,03^b$	$3,99 \pm 0,05^b$	$3,95 \pm 0,01$
LpM7	$3,93 \pm 0,06^{f,g}$	$3,75 \pm 0,01^{h,i}$	$3,67 \pm 0,03$
LpM8	$4,01 \pm 0,03^{d,e,f}$	$3,79 \pm 0,01^{f,g,h,i}$	$3,72 \pm 0,03$
LpM9	$4,06 \pm 0,01^d$	$3,76 \pm 0,03^{g,h,i}$	$3,73 \pm 0,01$
LpM10	$4,21 \pm 0,03^{b,c}$	$3,98 \pm 0,03^b$	$3,96 \pm 0,04$
LpM11	$3,91 \pm 0,01^g$	$3,72 \pm 0,01^i$	$3,62 \pm 0,01$
LpM12	$3,95 \pm 0,01^{e,f,g}$	$3,85 \pm 0,05^{d,e,f}$	$3,81 \pm 0,01$
LpM13	$3,98 \pm 0,02^{e,f,g}$	$3,94 \pm 0,01^{b,c}$	$3,84 \pm 0,04$
LpM14	$3,95 \pm 0,03^{e,f,g}$	$3,86 \pm 0,01^{d,e,f}$	$3,79 \pm 0,02$
LpM15	$3,91 \pm 0,01^g$	$3,82 \pm 0,01^{e,f,g,h}$	$3,75 \pm 0,01$
LpM16	$4,02 \pm 0,02^{d,e}$	$3,80 \pm 0,01^{e,f,g,h,i}$	$3,72 \pm 0,01$
LpM17	$4,01 \pm 0,01^{d,e}$	$3,84 \pm 0,01^{d,e,f}$	$3,72 \pm 0,01$
LpM18	$3,96 \pm 0,01^{e,f,g}$	$3,85 \pm 0,01^{d,e,f}$	$3,70 \pm 0,01$
LpM19	$3,97 \pm 0,01^{e,f,g}$	$3,82 \pm 0,01^{e,f,g,h}$	$3,68 \pm 0,02$
LpM21	$3,96 \pm 0,04^{e,f,g}$	$3,83 \pm 0,01^{d,e,f,g,h}$	$3,73 \pm 0,02$
LpM22	$3,98 \pm 0,01^{e,f,g}$	$3,83 \pm 0,01^{d,e,f,g,h}$	$3,76 \pm 0,01$
LpM23	$3,95 \pm 0,01^{e,f,g}$	$3,84 \pm 0,01^{d,e,f}$	$3,75 \pm 0,01$
LpM24	$3,97 \pm 0,04^{e,f,g}$	$3,83 \pm 0,01^{d,e,f,g,h}$	$3,74 \pm 0,02$

Los valores son promedios (\pm SD) obtenidos de tres repeticiones. ^{a,b,c} Valores con diferentes superíndices en cada columna difieren significativamente ($p < 0,05$) para cada material.

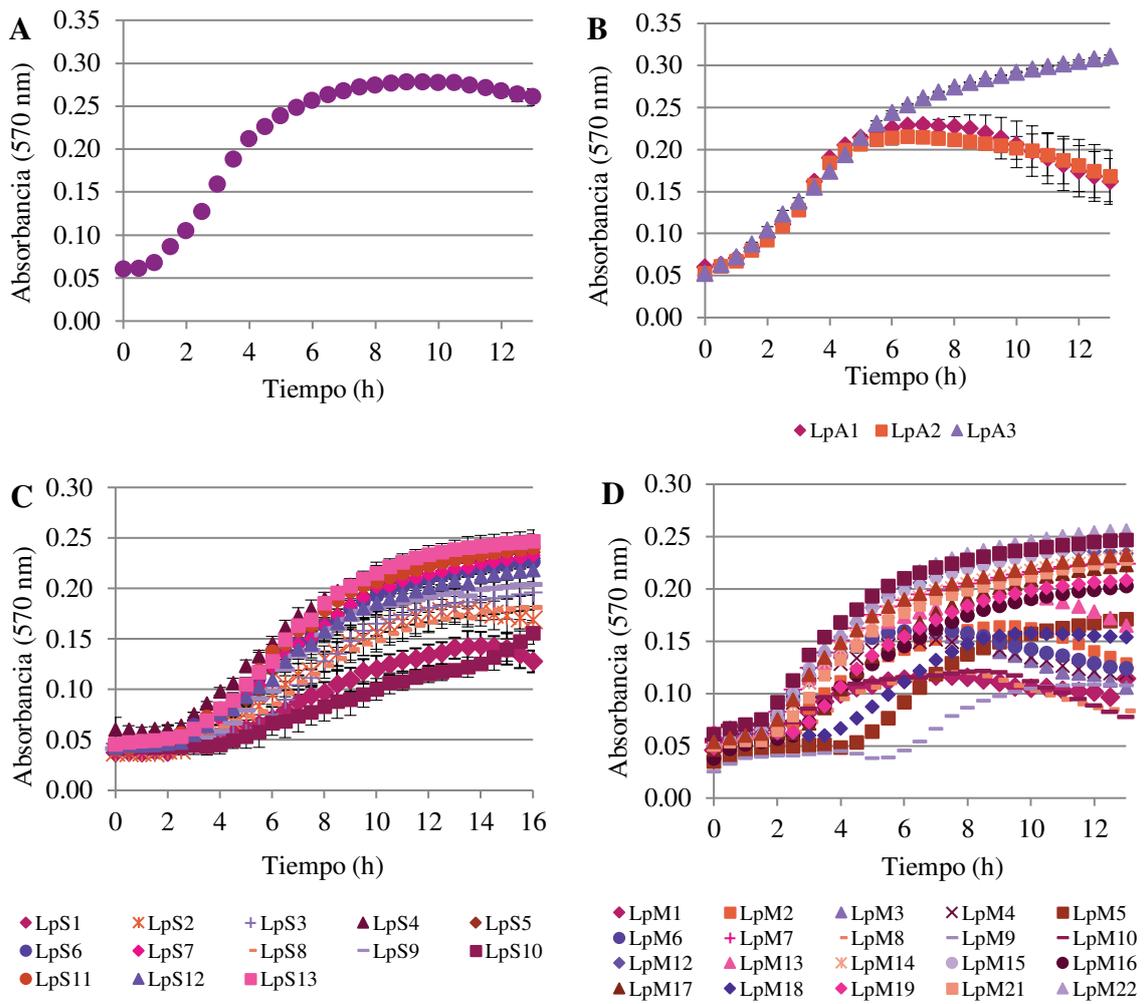


Figura 10 – Curvas de crecimiento de *L. plantarum* aislados de avena (LpAv), alfalfa (LpA1-LpA3), sorgo (LpS1-LpS13) y maíz (LpM1-LpM19, LpM21-LpM24) en medio extracto vegetal de avena (A), alfalfa (B), sorgo (C) y maíz (D), respectivamente. Los valores son promedios (\pm SD) obtenidos de tres repeticiones.

Tabla 6 – Parámetros cinéticos (μ_{\max} y λ) de los cultivos de *L. plantarum* aislados de avena (LpAv), alfalfa (LpA1-LpA3), sorgo (LpS1-LpS13) y maíz (LpM1-LpM19, LpM21-LpM24) en MEAv, MEAl, MES y MEM.

Aislamiento	MEV	μ_{\max}	λ	R ²	Aislamiento	MEV	μ_{\max}	λ	R ²
LpAv	MEAv	0,056	1,20	0,999	LpM4	MEM	0,026	0,98	0,991
LpA1	MEAl	0,053	1,61	0,994	LpM5		0,021	3,68	0,991
LpA2		0,053	1,55	0,990	LpM6		0,029	1,20	0,996
LpA3		0,040	0,70	0,999	LpM7		0,025	1,45	0,987
LpS1	MES	0,012	2,96	0,998	LpM8		0,017	1,79	0,991
LpS2		0,017	2,58	0,998	LpM9		0,020	5,69	0,984
LpS3		0,021	4,45	0,991	LpM10		0,018	1,58	0,986
LpS4		0,020	1,17	0,986	LpM11		0,013	2,37	0,994
LpS5		0,022	2,55	0,996	LpM12		0,028	0,59	0,989
LpS6		0,019	1,46	0,996	LpM13		0,025	0,91	0,990
LpS7		0,021	1,88	0,994	LpM14		0,023	1,53	0,976
LpS8		0,015	2,67	0,996	LpM15		0,024	1,31	0,978
LpS9		0,022	2,99	0,992	LpM16		0,018	2,30	0,989
LpS10		0,009	3,91	0,991	LpM17		0,022	1,23	0,990
LpS11		0,022	1,72	0,995	LpM18		0,024	3,86	0,994
LpS12		0,019	2,00	0,995	LpM19		0,022	1,34	0,992
LpS13		0,025	1,54	0,996	LpM21		0,021	1,97	0,976
LpM1		0,018	1,28	0,990	LpM22		0,027	1,72	0,987
LpM2		0,020	1,07	0,991	LpM23		0,027	1,71	0,982
LpM3		0,020	1,30	0,995	LpM24		0,023	1,72	0,978

μ_{\max} : tasa máxima de crecimiento como variación de DO_{570nm} en función del tiempo (h). λ : fase lag (h)

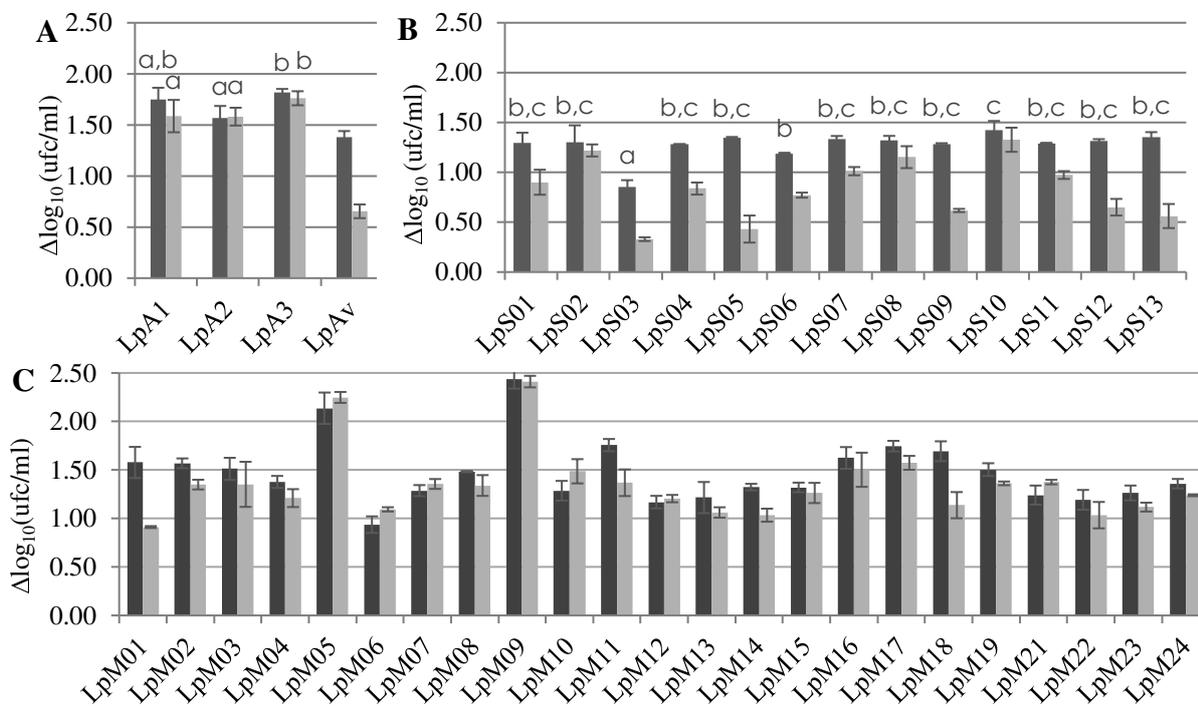


Figura 11 - Desarrollo ($\Delta \log_{10}$ ufc/ml \pm SD) de *L. plantarum* aislado de alfalfa (LpA1-LpA3), avena (LpAv), sorgo (LpS1-LpS13) y maíz (LpM1-LpM19, LpM21-LpM24), luego de 24 (■) y 48 (▒) h de cultivo en medio extracto de alfalfa y de avena (A), de sorgo (B) y de maíz (C). Los

valores son promedios (\pm SD) de tres repeticiones. ^{a,b} Los valores correspondientes a un tiempo, con letras distintas, difieren significativamente ($p < 0,05$).

Antes de continuar con los ensayos, se llevó a cabo la secuenciación parcial del gen 16S ARNr de las cuatro cepas de *L. plantarum* seleccionadas (LpAv, LpA3, LpS13 y LpM15), confirmando que los aislamientos pertenecen a la especie *L. plantarum*. Los datos están disponibles en [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/MT798595\(LpAv\)](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/MT798595(LpAv)), <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/MT799877> (LpA3), <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/MT798596> (LpS13) y <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/MT799876> (LpM15). Asimismo, se confirmó, por análisis de RAPD-PCR, que los 4 aislamientos pertenecen a cepas diferentes (no mostrado).

Continuando con los ensayos de caracterización, se realizó un estudio de desarrollo “cruzado” en los cuatro MEV, con cada una de las cepas de *L. plantarum* seleccionadas (LpAv, LpA3, LpS13 y LpM15), empleando la metodología anterior. En general, las cuatro cepas fueron capaces de desarrollarse y fermentar los cuatro extractos vegetales. Particularmente en MEAv, LpAv fue la que generó una mayor disminución del pH a las 24 h (Tabla 7), aunque a las 72 h fue LpA3 la que mantuvo el menor pH comparado con las otras. En el MEAl, LpA3 y LpS13 produjeron un pH significativamente menor a LpAv y LpM15 a las 24 h, siendo LpA3 la que mantuvo un pH menor hasta el final del ensayo. Por otro lado, en el MES no se observaron diferencias significativas en los pH de los cultivos de las distintas cepas a lo largo de los tiempos de muestreo. Finalmente, en el MEM solo LpAv produjo un pH significativamente menor a las 24 h comparado con las demás cepas, aunque a las 48 h ya no hay diferencias con LpA3 y LpM15.

A partir de las curvas de cinética de crecimiento de los *L. plantarum* en los cuatro MEV (Fig. 12) se obtuvieron los parámetros cinéticos (Tabla 8), observándose que los valores estimados de μ_{\max} para cada cepa fueron más homogéneos en los medios MES y MEM al compararlos con MEAv y MEAl. Por otro lado, las μ_{\max} estimadas mostraron valores superiores en los medios MEAv y MEAl, comparado con MES y MEM. LpA3 resultó en la menor μ_{\max} estimada en todos los MEV, principalmente en MEAv y MEAl, y además es la cepa que presentó un crecimiento ($\Delta \log_{10}$ ufc/ml) (Fig. 13) igual o menor a las demás cepas en los todos los MEV. Sin embargo, esta cepa tiene la capacidad de mantener valores de pH igual o menor a las demás en cada MEV luego de 72 h de incubación. Según los recuentos de BAL totales a las 24 h, podría decirse que se obtuvieron los mayores valores de $\Delta \log_{10}$ (ufc/ml) en MEAl para todas las cepas ensayadas, mientras los menores valores se observaron en el caso de MES en general.

Tabla 7 – Valores de pH de los medios extracto vegetal (MEAv, MEAl, MES y MEM) inoculados con *L. plantarum* LpAv, LpA3, LpS13 y LpM15, al inicio (t = 0) y luego de 24, 48 y 72 h de fermentación.

Medio	Nombre	Tiempo (h)			
		0	24	48	72
Medio extracto de avena (MEAv)	Control		6,56 ± 0,01 ^a	6,65 ± 0,04 ^a	6,64 ± 0,01 ^a
	LpAv		4,68 ± 0,01 ^b	4,92 ± 0,02 ^{b,c}	4,96 ± 0,02 ^b
	LpA3	6,55 ± 0,01	4,71 ± 0,01 ^c	4,91 ± 0,04 ^b	4,87 ± 0,03 ^c
	LpS13		4,77 ± 0,01 ^d	5,01 ± 0,04 ^{b,c}	4,99 ± 0,02 ^b
	LpM15		4,79 ± 0,01 ^d	5,02 ± 0,01 ^c	4,99 ± 0,01 ^b
Medio extracto de alfalfa (MEAl)	Control		6,18 ± 0,01 ^a	6,27 ± 0,02 ^a	6,16 ± 0,03 ^a
	LpAv		5,77 ± 0,01 ^b	5,91 ± 0,01 ^b	5,88 ± 0,03 ^b
	LpA3	6,20 ± 0,01	5,68 ± 0,01 ^c	5,74 ± 0,03 ^c	5,74 ± 0,02 ^c
	LpS13		5,68 ± 0,01 ^c	5,86 ± 0,02 ^{b,c}	5,82 ± 0,02 ^b
	LpM15		5,78 ± 0,01 ^b	5,94 ± 0,07 ^b	5,96 ± 0,02 ^d
Medio extracto de sorgo (MES)	Control		6,44 ± 0,04 ^a	6,43 ± 0,03 ^a	6,38 ± 0,03 ^a
	LpAv		3,97 ± 0,05 ^b	3,98 ± 0,04 ^b	3,85 ± 0,01 ^b
	LpA3	6,37 ± 0,03	4,03 ± 0,01 ^b	3,96 ± 0,01 ^b	3,87 ± 0,02 ^b
	LpS13		3,95 ± 0,05 ^b	3,94 ± 0,02 ^b	3,86 ± 0,01 ^b
	LpM15		3,93 ± 0,01 ^b	3,95 ± 0,01 ^b	3,89 ± 0,01 ^b
Medio extracto de maíz (MEM)	Control		6,24 ± 0,03 ^a	6,20 ± 0,02 ^a	6,19 ± 0,03 ^a
	LpAv		3,93 ± 0,01 ^b	3,81 ± 0,01 ^b	3,74 ± 0,02 ^b
	LpA3	6,20 ± 0,03	4,03 ± 0,01 ^c	3,83 ± 0,02 ^{b,c}	3,74 ± 0,01 ^b
	LpS13		4,07 ± 0,01 ^c	3,88 ± 0,01 ^c	3,77 ± 0,02 ^c
	LpM15		4,04 ± 0,01 ^c	3,83 ± 0,01 ^{b,c}	3,78 ± 0,02 ^c

Los valores son promedios (±SD) obtenidos de tres repeticiones. ^{a,b,c} Valores con diferentes superíndices difieren significativamente (p <0,05) en cada columna correspondiente a un tiempo de incubación y para cada material.

Tabla 8 - Parámetros cinéticos (μ_{max} y λ) de los cultivos de *L. plantarum* LpAv, LpA3, LpS13 y LpM15 desarrollados en MEAv, MEAl, MES y MEM, respectivamente.

Cepa	MEV	μ_{max}	λ	R ²	Cepa	MEV	μ_{max}	λ	R ²
LpAv	MEAv	0,066	1,60	0,996	LpAv	MES	0,029	1,32	0,989
LpA3		0,050	1,11	0,977	LpA3		0,021	0,69	0,992
LpS13		0,062	2,07	0,993	LpS13		0,025	1,40	0,993
LpM15		0,068	1,59	0,984	LpM15		0,029	1,35	0,991
LpAv	MEAl	0,058	1,12	0,997	LpAv	MEM	0,023	1,05	0,991
LpA3		0,033	0,73	0,996	LpA3		0,021	0,78	0,991
LpS13		0,058	1,69	0,995	LpS13		0,025	1,78	0,992
LpM15		0,047	0,92	0,997	LpM15		0,026	1,22	0,989

μ_{max} : tasa máxima de crecimiento como variación de DO_{570nm} en función del tiempo (h). λ : fase lag (h)

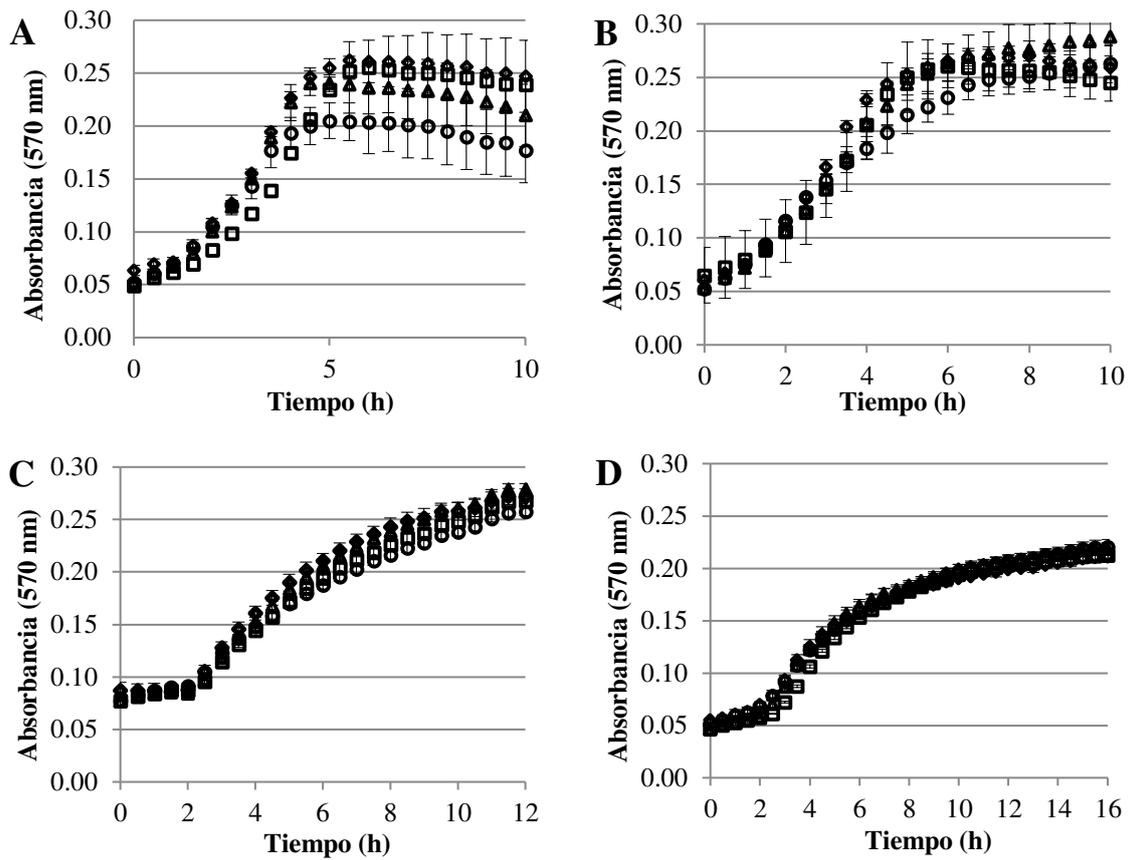


Figura 12 – Curvas de desarrollo de *L. plantarum* aislados de avena (LpAv, \blacklozenge), alfalfa (LpA3, \circ), sorgo (LpS13, \square) y maíz (LpM15, \blacktriangle) en medio extracto vegetal de avena (A), alfalfa (B), sorgo (C) y maíz (D), respectivamente. Los valores son promedios (\pm SD) obtenidos de tres repeticiones.

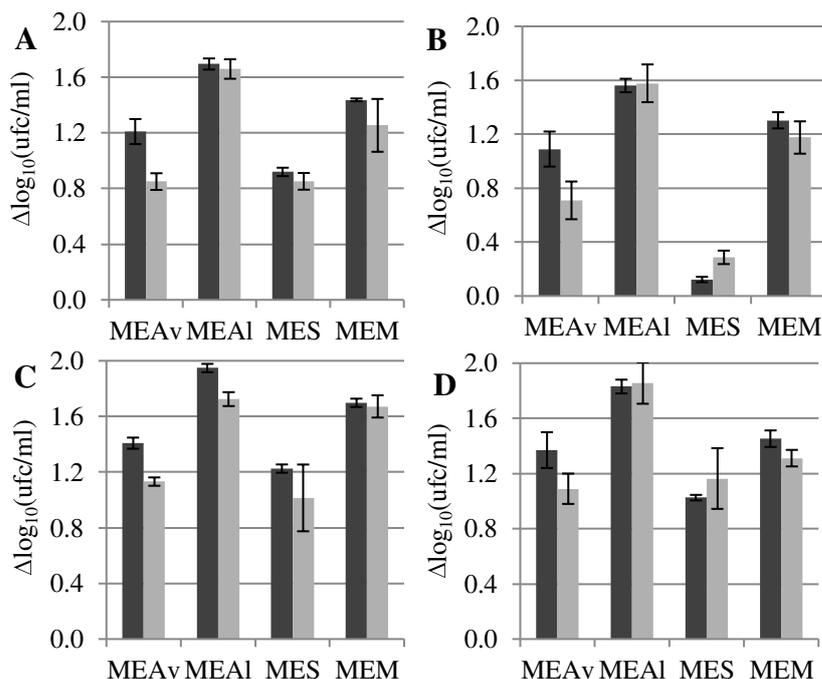


Figura 13 - Desarrollo ($\Delta \log_{10} \text{ufc/ml} \pm \text{SD}$) de *L. plantarum* LpAv (A), LpA3 (B), LpS13 (C) y LpM15 (D) luego de 24 (\blacksquare) y 48 (\square) h de cultivo en medio extracto de avena (MEAv), alfalfa (MEAl), sorgo (MES) y maíz (MEM). Los valores son promedios (\pm SD) obtenidos de tres repeticiones.

4.3 Dosis-respuesta de *L. plantarum* en ensilados de maíz

Para estudiar el efecto de la concentración inicial de inóculo sobre el proceso de ensilado, se llevó a cabo un ensayo en micro-silos de maíz inoculados en distintas concentraciones iniciales (10^4 , 10^5 , 10^6 y 10^7 ufc/g de maíz picado fresco) de *L. plantarum* LpAv, LpA3, LpS13 y LpM15. Los micro-silos se dejaron fermentar durante 30 d, determinando los valores de pH a las 24, 48 y 72 h, y a tiempo final (Fig. 14A-D). Se realizaron análisis estadísticos para comparar entre los ensilajes inoculados a las distintas dosis (test de Tuckey) y entre los ensilajes inoculados y el control sin inocular (test de Dunnett).

Al comparar los valores de pH de los silajes inoculados con LpAv (Fig. 14A), se observó que las dosis de 10^5 , 10^6 y 10^7 ufc/g disminuyeron significativamente el pH, con respecto al control, a las 24, 48 y 72 h (Dunnett, $p < 0,014$). En particular, la dosis de 10^4 produjo una diferencia significativa con el control recién a las 72 h ($p = 0,000$). A los 7 días, solo las dosis de 10^6 y 10^7 ufc/g mostraron diferencias con el control ($p < 0,001$). En los ensilajes con LpA3, LpS13 y LpM15 (Fig. 14B-D), todas las dosis indujeron una reducción significativa del pH comparado con el control a las 24, 48 y 72 h (Dunnett, $p < 0,009$), con la excepción de LpS13 en 10^4 a las 72 h (Dunnett, $p = 0,247$). En general, a los 30 días, los valores de pH de los controles no mostraron diferencias significativas con los silos inoculados con cada una de las cepas.

A las 24 h de incubación, los silajes inoculados con cada una de las cepas mostraron diferencias significativas entre las dosis 10^5 , 10^6 y 10^7 ufc/g ($p < 0,002$). Además, al comparar entre las distintas cepas, para la dosis de 10^6 ufc/g, LpAv mostró mayor eficiencia en la disminución de pH comparado a LpA3 ($p = 0,014$), LpS13 ($p = 0,000$) y LpM15 ($p = 0,001$), no habiendo diferencias entre las últimas tres.

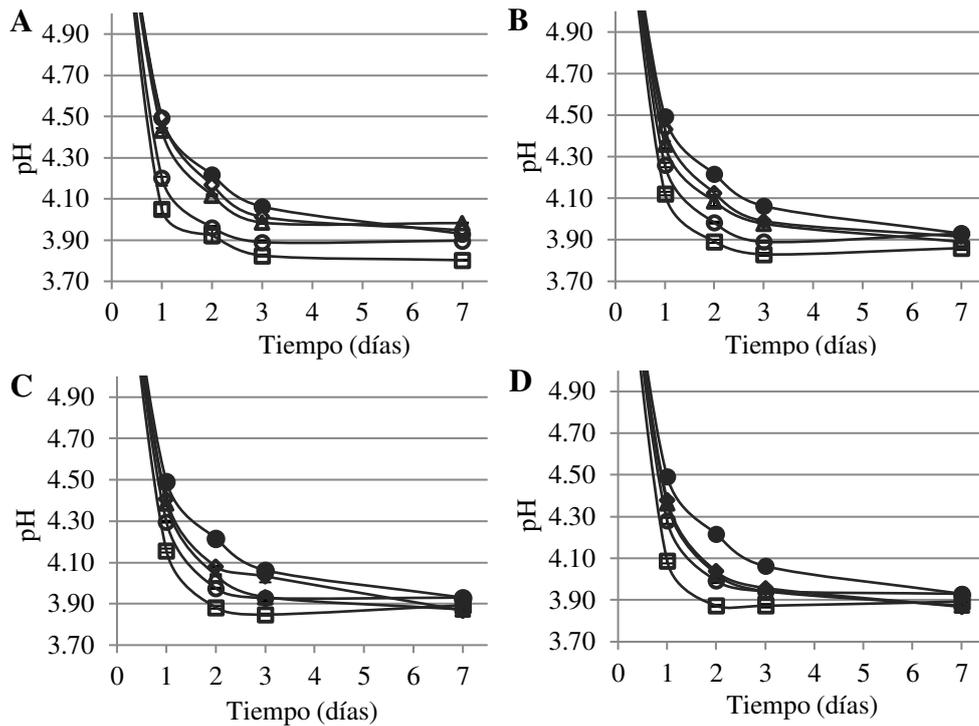


Figura 14 - Valores de pH del silaje de maíz no inoculado (●) e inoculados con *L. plantarum* LpAv (A), LpA3 (B), LpS13 (C) y LpM15 (D), en una concentración inicial de inóculo de 10^4 (◇), 10^5 (Δ), 10^6 (○) o 10^7 (□) ufc/g. Los valores son promedios (\pm SD) obtenidos de tres repeticiones.

En los recuentos de BAL totales a los 30 días de fermentación, se observó un comportamiento común en todos los silajes inoculados, a mayor tasa de inoculación inicial, menor el recuento de BAL totales a los 30 días (Fig. 15). Además, los recuentos de BAL totales en el control a los 30 días fueron similares a los recuentos en los silajes inoculados con 10^4 ufc/g.

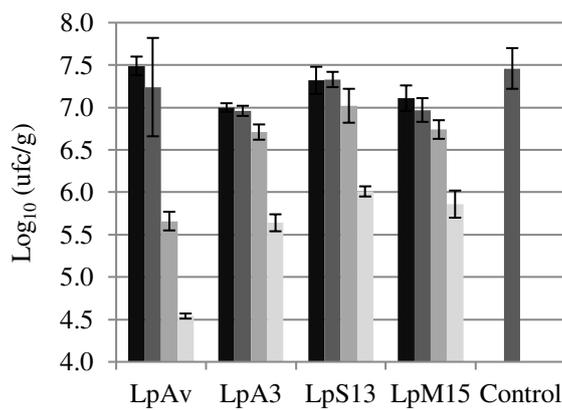


Figura 15 – Recuentos de BAL totales (\log_{10} ufc/g) en silajes de maíz no inoculado (control) e inoculados con 10^4 (■), 10^5 (■), 10^6 (■) y 10^7 (■) ufc/g de *L. plantarum* LpAv, LpA3, LpS13y LpM15, luego de 30 días de fermentación a temperatura ambiente (25 °C). Los valores son promedios (\pm SD) de tres repeticiones.

4.4 Capacidad de cepas de *L. plantarum* de fermentar sustratos diferentes del que fueron aisladas

Las cuatro cepas de *L. plantarum* (LpAv, LpA3, LpS13 y LpM15) fueron capaces de crecer e inducir el descenso del pH en los MEV preparados a partir de avena, alfalfa, sorgo y maíz. En este contexto, se estudió la capacidad fermentativa de estas cepas en mini-ensilajes de avena, alfalfa, sorgo y maíz. En la tabla 9 se muestran los valores de pH y recuentos totales de BAL y hongos y levaduras (ufc/g) a lo largo del proceso de fermentación, y en la tabla 10 se observan los valores de las determinaciones químicas de los silajes a tiempo inicial ($t = 0$) y final (30 días). Cabe destacar que, en el caso de los silajes de alfalfa y sorgo, los recuentos de BAL totales en MRS en el día de la inoculación (día 0), fueron significativamente más altos (más de 1 orden de logaritmo) que el recuento total en los controles no inoculados, sugiriendo que la diferencia puede deberse a las cepas inoculadas. Por el contrario, en los ensilajes de avena y maíz, la población epífita de BAL al día 0, reflejado por el recuento en MRS, supera a la concentración inoculada de *L. plantarum* por más de 1 orden de logaritmo.

Ensilado de avena: a las 48 h de fermentación, los recuentos de BAL totales fueron más altos (Dunnett, $p < 0,001$) en el material inoculado con LpAv, LpA3 y LpM15 que en el control. Por otro lado, los pH disminuyeron significativamente para en silos inoculados con LpAv, LpS13 y LpM15, con respecto al control (Dunnett, $p < 0,010$), sin diferencias entre las cepas. Por otro lado, LpM15 condujo a una reducción temprana del desarrollo de hongos y levaduras ($t = 2$ d) y mantuvo un recuento de BAL significativamente más alto que los demás a los 30 días ($p < 0,001$). Por último, de acuerdo a las determinaciones químicas, luego de 30 días de fermentación, FDAs (%) y FDNa (%) fueron significativamente menores ($p = 0,026$ y $0,030$, respectivamente) en los ensilajes con LpM15 comparados con el control.

Ensilado de alfalfa: en el caso de este forraje, los recuentos iniciales en los ensilajes tratados fueron alrededor de 1 orden de logaritmo más altos que el control, debido posiblemente a que la flora epífita de BAL fue menor que la concentración de BAL inoculadas. Sin embargo, no hubo diferencias significativas en los recuentos de BAL alcanzados por todos los ensilajes a los 3 días de incubación ($p > 0,300$). Finalmente, a los 30 d, los recuentos del material fermentado inoculado con cada una de las cepas fueron menores al de las muestras sin inocular ($p < 0,001$). Con respecto al pH, únicamente la inoculación con LpAv redujo significativamente el pH en comparación con el control, tanto a los 3 como a los 30 días de incubación ($p = 0,045$ y $0,016$, respectivamente). Si bien los recuentos de hongos y levaduras fueron menores en todos los silajes inoculados comparados al control, no existieron diferencias a los 30 días. Por otro lado, la inoculación generó silajes con menor relación NH_3/NT (%) a comparación del control, siendo LpAv la que produjo la alfalfa fermentada con el menor valor de este parámetro químico ($3,10 \pm 0,73$ %).

Ensilado de sorgo: al igual que lo ocurrido con la alfalfa, en el ensilaje de sorgo los recuentos de BAL iniciales en silos tratados fueron 1,2-1,6 más altos que el control ($p < 0,001$). A los 3 días de fermentación, los recuentos de las muestras inoculadas continuaron siendo mayores al control ($p < 0,001$) y todas las cepas disminuyeron significativamente el pH ($p < 0,001$). A tiempo final, el silaje con LpM15 fue el único tratado en el cual se detectaron BAL totales (\log_{10} ufc/g = $5,19 \pm 0,16$), siendo menor que en el control (\log_{10} ufc/g = $7,49 \pm 0,17$). Además, las cuatro cepas mantuvieron valores de pH menores al control ($p < 0,021$). Con respecto a los recuentos de mohos y levaduras, los silos inoculados tuvieron recuentos similares o mayores al control a los 3 y 30 días. Por último, ninguna de las cepas modificó los parámetros químicos determinados en el material fermentado luego de 30 días de incubación, comparado con el control.

Ensilado de maíz: al igual que en el caso de la avena, los recuentos iniciales de las BAL epífitas fueron mayores que la concentración inoculada. Aunque no se observaron diferencias significativas en los recuentos de BAL totales entre todas las muestras a las 24 h, la adición de las cuatro cepas de *L. plantarum* redujo el pH de manera significativa al compararlos con el control ($p < 0,001$). Luego de los 30 días de fermentación, los valores de pH fueron menores a 3,90 en todos los casos, siendo el ensilaje con LpS13 el único que mostró diferencia significativa con el control ($p < 0,001$). Los tratamientos con LpAv, LpA3 y LpS13 mostraron un aumento en los recuentos de mohos y levaduras a los 30 días, al compararlos con el control. Finalmente, en la tabla 10 se observa que LpAv, LpS13 y LpM15 produjeron silajes con menor relación NH_3/NT ($4,56 \pm 0,05$, $4,51 \pm 0,30$, $4,91 \pm 0,10$ %, respectivamente) al compararlos con el control ($5,83 \pm 0,11$ %), sin diferencias entre los tratamientos.

Tabla 9 – Capacidad de fermentación de *L. plantarum* LpAv, LpA3, LpS13 y LpM15 de sustratos diferentes de los cuales fueron aislados.

Ensilaje	Recuentos celulares (\log_{10} ufc/g \pm SD)						pH		
	Bacterias lácticas			Hongos filamentosos y levaduras			t = 0 d	t = 2 d	t = 30 d
Avena	t = 0 d	t = 2 d	t = 30 d	t = 0 d	t = 2 d	t = 30 d	t = 0 d	t = 2 d	t = 30 d
Control	7,04 \pm 0,04	9,20 \pm 0,03 ^a	8,07 \pm 0,01 ^a	7,57 \pm 0,07	4,89 \pm 0,46 ^a	< 2	6,33 \pm 0,03	4,25 \pm 0,03 ^a	3,87 \pm 0,02 ^a
LpAv	7,15 \pm 0,04	9,53 \pm 0,10 ^{b,c}	8,15 \pm 0,13 ^a	7,57 \pm 0,07	4,62 \pm 0,17 ^{a,b}	5,43 \pm 2,27	6,33 \pm 0,03	4,08 \pm 0,04 ^b	3,89 \pm 0,02 ^a
LpA3	7,18 \pm 0,05	9,44 \pm 0,05 ^b	7,99 \pm 0,10 ^a	7,57 \pm 0,07	5,12 \pm 0,39 ^a	6,36 \pm 2,24	6,33 \pm 0,03	4,17 \pm 0,08 ^{a,b}	3,89 \pm 0,02 ^a
LpS13	7,19 \pm 0,08	9,29 \pm 0,01 ^a	8,16 \pm 0,06 ^a	7,57 \pm 0,07	3,70 \pm 0,05 ^{b,c}	< 2	6,33 \pm 0,03	4,05 \pm 0,04 ^b	3,92 \pm 0,02 ^a
LpM15	7,32 \pm 0,08	9,58 \pm 0,03 ^c	8,71 \pm 0,07 ^b	7,57 \pm 0,07	3,34 \pm 0,51 ^c	< 2	6,33 \pm 0,03	4,12 \pm 0,03 ^b	4,01 \pm 0,04 ^b
Alfalfa	t = 0 d	t = 3 d	t = 30 d	t = 0 d	t = 3 d	t = 30 d	t = 0 d	t = 3 d	t = 30 d
Control	5,25 \pm 0,18 ^a	9,61 \pm 0,12	8,58 \pm 0,13 ^a	5,07 \pm 0,21	4,80 \pm 0,19 ^a	2,60 \pm 0,30	6,28 \pm 0,03	5,49 \pm 0,24 ^a	4,49 \pm 0,03 ^a
LpAv	6,64 \pm 0,21 ^b	9,64 \pm 0,08	6,65 \pm 0,17 ^b	5,07 \pm 0,21	4,20 \pm 0,23 ^b	3,06 \pm 0,25	6,28 \pm 0,03	4,84 \pm 0,23 ^b	4,39 \pm 0,03 ^b
LpA3	6,41 \pm 0,18 ^b	9,57 \pm 0,07	6,55 \pm 0,25 ^b	5,07 \pm 0,21	4,51 \pm 0,23 ^b	2,81 \pm 0,16	6,28 \pm 0,03	4,98 \pm 0,19 ^{a,b}	4,45 \pm 0,04 ^{a,b}
LpS13	6,47 \pm 0,21 ^b	9,75 \pm 0,05	7,30 \pm 0,25 ^c	5,07 \pm 0,21	4,04 \pm 0,17 ^b	2,88 \pm 0,09	6,28 \pm 0,03	4,91 \pm 0,48 ^{a,b}	4,42 \pm 0,06 ^{a,b}
LpM15	6,66 \pm 0,18 ^b	9,53 \pm 0,23	7,03 \pm 0,15 ^{b,c}	5,07 \pm 0,21	4,29 \pm 0,11 ^b	2,89 \pm 0,11	6,28 \pm 0,03	5,12 \pm 0,39 ^{a,b}	4,46 \pm 0,03 ^{a,b}
Sorgo	t = 0 d	t = 3 d	t = 30 d	t = 0 d	t = 3 d	t = 30 d	t = 0 d	t = 3 d	t = 30 d
Control	5,17 \pm 0,10 ^a	8,78 \pm 0,05 ^a	7,49 \pm 0,17 ^a	5,33 \pm 0,02	6,62 \pm 0,24 ^a	4,29 \pm 0,02 ^a	5,76 \pm 0,04	3,89 \pm 0,03 ^a	4,19 \pm 0,03 ^a
LpAv	6,78 \pm 0,08 ^c	9,45 \pm 0,05 ^b	<2,00	5,33 \pm 0,02	7,03 \pm 0,10 ^b	4,50 \pm 0,15 ^{a,b}	5,76 \pm 0,04	3,67 \pm 0,01 ^{b,c}	3,80 \pm 0,01 ^{b,c}
LpA3	6,72 \pm 0,11 ^c	9,48 \pm 0,01 ^b	<2,00	5,33 \pm 0,02	6,98 \pm 0,03 ^{a,b}	4,59 \pm 0,14 ^b	5,76 \pm 0,04	3,69 \pm 0,01 ^b	3,84 \pm 0,02 ^b
LpS13	6,40 \pm 0,01 ^b	9,48 \pm 0,05 ^b	<2,00	5,33 \pm 0,02	6,81 \pm 0,24 ^{a,b}	4,70 \pm 0,10 ^b	5,76 \pm 0,04	3,64 \pm 0,01 ^c	3,78 \pm 0,02 ^c
LpM15	6,64 \pm 0,05 ^c	9,32 \pm 0,02 ^c	5,19 \pm 0,16 ^b	5,33 \pm 0,02	6,68 \pm 0,03 ^{a,b}	4,66 \pm 0,11 ^b	5,76 \pm 0,04	3,70 \pm 0,01 ^b	3,82 \pm 0,02 ^{b,c}
Maíz	t = 0 d	t = 1 d	t = 30 d	t = 0 d	t = 1 d	t = 30 d	t = 0 d	t = 1 d	t = 30 d
Control	7,82 \pm 0,08	9,16 \pm 0,04	7,05 \pm 0,12 ^a	6,79 \pm 0,10	Nd	3,86 \pm 0,26 ^a	5,96 \pm 0,08	4,37 \pm 0,02 ^a	3,89 \pm 0,02 ^a
LpAv	7,83 \pm 0,12	9,20 \pm 0,05	6,52 \pm 0,08 ^b	6,79 \pm 0,10	Nd	5,23 \pm 0,17 ^c	5,96 \pm 0,08	4,17 \pm 0,02 ^b	3,89 \pm 0,01 ^a
LpA3	7,80 \pm 0,09	9,09 \pm 0,04	7,04 \pm 0,03 ^a	6,79 \pm 0,10	Nd	4,35 \pm 0,25 ^b	5,96 \pm 0,08	4,22 \pm 0,01 ^b	3,88 \pm 0,01 ^a
LpS13	7,86 \pm 0,01	8,99 \pm 0,07	6,68 \pm 0,02 ^b	6,79 \pm 0,10	Nd	4,50 \pm 0,04 ^b	5,96 \pm 0,08	4,19 \pm 0,04 ^b	3,83 \pm 0,01 ^b
LpM15	7,88 \pm 0,18	9,09 \pm 0,08	6,88 \pm 0,04 ^a	6,79 \pm 0,10	Nd	3,76 \pm 0,11 ^a	5,96 \pm 0,08	4,21 \pm 0,03 ^b	3,89 \pm 0,01 ^a

Los valores son promedios (\pm SD) de tres repeticiones. ^{a,b,c} Valores en columnas con diferentes superíndices difieren significativamente ($p < 0,05$). Nd: no determinado.

Tabla 10 – Análisis químico de silajes de avena, alfalfa, sorgo y maíz, sin inocular (control) e inoculados con *L. plantarum* aislados de avena (LpAv), alfalfa (LpA3), sorgo (LpS13) y maíz (LpM15) al inicio (t = 0) y luego de 30 días de fermentación.

Ensilaje	Muestra	Tiempo (d)	MS (%)	Pérdida MS (%)	PB (%)	FDNa (%)	FDAs (%)	LDA (%)	EE (%)	Cz (%)	NH3/NT (%)
Avena	-	0	20,18 ± 0,30	-	11,75 ± 0,43	63,94 ± 0,37	35,81 ± 0,48	5,16 ± 0,24	3,41 ± 0,35	18,25 ± 0,43	Nd
	Control		19,72 ± 0,46	1,82 ± 0,39	11,80 ± 0,46	55,18 ± 0,40 ^a	35,53 ± 0,47 ^a	6,48 ± 0,15	3,77 ± 0,27	16,51 ± 0,27	0,93 ± 0,29
	LpAv		19,37 ± 0,24	2,05 ± 0,25	11,60 ± 0,42	53,80 ± 0,61 ^{a,b}	34,63 ± 0,21 ^{a,b}	6,07 ± 0,16	3,22 ± 0,06	15,56 ± 0,51	1,25 ± 0,29
	LpA3	30	19,65 ± 0,56	1,95 ± 0,28	12,09 ± 0,74	55,12 ± 1,78 ^{a,b}	34,90 ± 1,40 ^{a,b}	6,38 ± 0,08	3,44 ± 0,47	14,35 ± 2,82	1,13 ± 0,17
	LpS13		19,56 ± 0,56	1,92 ± 0,22	11,69 ± 0,46	53,59 ± 0,89 ^{a,b}	34,10 ± 0,37 ^{a,b}	5,94 ± 0,62	3,56 ± 0,28	15,47 ± 2,00	0,99 ± 0,20
	LpM15		19,85 ± 0,24	1,61 ± 0,50	12,75 ± 0,48	52,20 ± 2,02 ^b	33,37 ± 1,39 ^b	6,27 ± 1,01	3,61 ± 0,43	17,35 ± 1,96	0,94 ± 0,24
Alfalfa	-	0	32,86 ± 0,31	-	21,83 ± 1,15	37,78 ± 1,35	26,53 ± 1,10	6,81 ± 0,30	2,10 ± 0,55	12,00 ± 0,98	Nd
	Control		33,33 ± 0,45 ^a	0,53 ± 0,64	20,17 ± 1,40	36,31 ± 2,41	27,95 ± 3,44	8,28 ± 0,77	3,69 ± 0,82	13,26 ± 0,26 ^a	6,53 ± 0,46 ^a
	LpAv		33,19 ± 0,72 ^a	-0,59 ± 0,60	20,68 ± 0,98	35,33 ± 0,65	26,50 ± 0,31	7,41 ± 0,10	2,63 ± 1,01	12,49 ± 0,42 ^b	3,10 ± 0,73 ^b
	LpA3	30	33,64 ± 0,34 ^{a,b}	-0,30 ± 0,58	23,27 ± 3,02	36,38 ± 1,80	27,32 ± 2,22	7,87 ± 0,45	3,51 ± 0,37	12,82 ± 0,20 ^{a,b}	3,53 ± 0,47 ^{b,c}
	LpS13		33,01 ± 0,31 ^{a,b}	-0,66 ± 0,62	20,38 ± 0,36	35,95 ± 1,21	27,28 ± 1,36	7,96 ± 0,06	4,43 ± 1,22	13,18 ± 0,14 ^a	4,38 ± 0,09 ^c
	LpM15		32,32 ± 0,45 ^b	0,24 ± 0,68	20,02 ± 0,83	36,12 ± 1,55	30,87 ± 7,40	7,63 ± 0,24	3,52 ± 1,32	12,82 ± 0,14 ^{a,b}	4,68 ± 0,06 ^c
Sorgo	-	0	29,34 ± 0,22	-	6,61 ± 0,27	54,10 ± 0,76	30,38 ± 0,20	4,47 ± 0,90	1,34 ± 0,21	7,62 ± 0,14	Nd
	Control		26,79 ± 0,14	4,14 ± 0,95	6,39 ± 0,52	58,30 ± 1,38	32,91 ± 1,00	4,93 ± 0,38	3,63 ± 0,82	7,97 ± 0,31	1,24 ± 0,24
	LpAv		27,23 ± 0,33	4,56 ± 1,04	6,38 ± 0,21	56,26 ± 1,10	31,03 ± 1,48	4,66 ± 0,34	3,43 ± 0,59	7,84 ± 0,26	1,14 ± 0,17
	LpA3	30	26,87 ± 0,60	3,84 ± 0,83	6,72 ± 0,32	55,45 ± 1,33	30,14 ± 0,53	5,20 ± 1,16	3,60 ± 0,69	8,50 ± 0,57	1,12 ± 0,22
	LpS13		26,98 ± 0,21	3,85 ± 0,90	6,36 ± 0,19	56,54 ± 2,56	30,84 ± 2,15	4,80 ± 0,18	4,96 ± 0,57	7,88 ± 0,78	1,05 ± 0,08
	LpM15		27,51 ± 0,37	3,82 ± 0,28	6,73 ± 0,16	56,18 ± 4,44	31,62 ± 3,06	4,45 ± 0,17	4,13 ± 1,94	8,05 ± 0,89	1,10 ± 0,01
Maíz	-	0	37,42 ± 0,35	-	5,42 ± 0,04	35,91 ± 3,69	17,73 ± 1,91	1,64 ± 0,11	3,00 ± 0,16	4,40 ± 0,91	Nd
	Control		37,10 ± 0,86	1,12 ± 0,62	5,46 ± 0,03 ^a	37,18 ± 2,98	21,41 ± 1,86	1,85 ± 0,16	3,94 ± 0,12 ^a	4,59 ± 0,57 ^a	5,83 ± 0,11 ^a
	LpAv		37,49 ± 0,79	1,20 ± 0,25	6,09 ± 0,17 ^{a,b}	34,32 ± 1,85	19,16 ± 1,09	1,73 ± 0,06	4,36 ± 0,12 ^{a,c}	4,99 ± 0,16 ^{a,b,c}	4,56 ± 0,05 ^b
	LpA3	30	36,03 ± 0,94	1,66 ± 0,23	6,26 ± 0,35 ^{b,c}	35,78 ± 4,31	19,16 ± 2,56	1,57 ± 0,45	5,45 ± 0,13 ^b	5,41 ± 0,21 ^b	5,71 ± 0,23 ^a
	LpS13		37,44 ± 0,40	1,71 ± 0,70	6,12 ± 0,29 ^{a,b}	34,28 ± 3,52	17,89 ± 1,94	1,48 ± 0,23	4,58 ± 0,21 ^c	5,36 ± 0,05 ^{a,b,c}	4,51 ± 0,30 ^b
	LpM15		36,24 ± 0,25	1,56 ± 0,51	7,00 ± 0,43 ^c	34,13 ± 1,98	18,03 ± 1,21	1,66 ± 0,12	4,02 ± 0,43 ^{a,c}	4,49 ± 0,41 ^{a,c}	4,91 ± 0,10 ^b

Materia Seca (MS), pérdida de MS, Proteína Bruta (PB), Fibra Detergente Neutra (FDNa), Fibra Detergente Ácida (FDAs), Lignina Detergente Ácido (LDA), Extracto Etéreo (EE), Cenizas (Cz), Nitrógeno Amoniacal/Nitrógeno Total (NNH₃/NT). Los valores son promedios (±SD) de tres repeticiones. ^{a,b,c} Valores en columnas con diferentes superíndices difieren significativamente (p <0,05). Nd: No determinado.

4.5 Bacterias ácido lácticas heterofermentantes

4.5.1 Selección de cepas heterofermentantes

Se analizó la producción de ácido láctico y acético por parte de las BAL heterofermentantes aisladas en este trabajo. En la figura 16 se pueden observar los niveles de estos dos ácidos producidos en cultivos en MRS, por cada una de las cepas. En base a estos resultados se seleccionaron cuatro cepas para continuar con el estudio: *L. brevis* LbB2 ($6,39 \pm 0,58$ g/l), *L. brevis* LbM6 ($6,89 \pm 0,43$ g/l), *L. fermentum* LfSY1 ($5,87 \pm 0,25$ g/l) y *L. fermentum* LfM1 ($7,56 \pm 0,73$ g/l). Por otro lado, la concentración de ácido acético producido por las cepas de *L. buchneri* Ls141 y 463 fueron $5,42 \pm 0,36$ g/l y $5,30 \pm 0,53$ g/l, respectivamente.

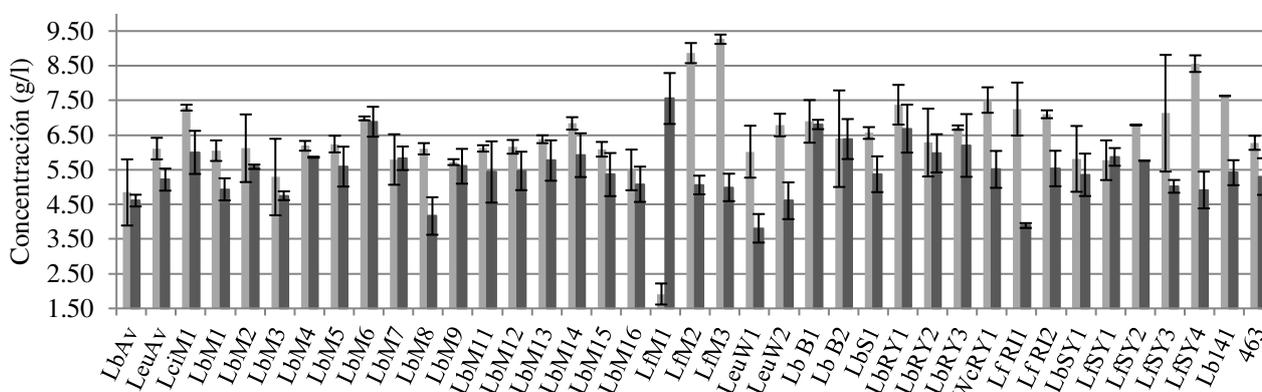


Figura 16 – Concentración (g/l) de ácido láctico (■) y acético (■) en cultivos *overnight* de cepas de BAL heterofermentantes en medio MRS. Los valores son promedios (\pm SD) de tres repeticiones.

4.5.2 Estabilidad aeróbica de silos de maíz

Se estudió el potencial para mejorar la EA de silos de maíz por cepas de BAL heterofermentantes seleccionadas (*L. brevis* LbB2, *L. brevis* LbM6, *L. fermentum* LfSY1 y *L. fermentum* LfM1, *L. buchneri* Lb141 y *L. buchneri* 463). Al momento de confección de los silos (tiempo inicial), los valores de MS fueron de $42,6 \pm 0,4\%$ a $43,6 \pm 1,5\%$, sin diferencias entre tratados y control. Luego de 90 días de fermentación, el rango de MS fue de $38,9 \pm 0,2\%$ a $43,1 \pm 3,4\%$, sin diferencias entre los silos. Con respecto a los recuentos de BAL totales (\log_{10} ufc9ml), a los 45 días de fermentación, todos los silajes mostraron recuentos significativamente mayores que el control ($p < 0,003$), excepto LfSY1 ($p < 0,112$) (Fig. 17A). Luego de 90 días, los recuentos más altos se observaron en las muestras inoculadas con LfM1 ($p < 0,004$). Con respecto a los pH, en la figura 17B puede observarse que los silajes inoculados con LfM1, Ls141 y 463

mostraron valores significativamente mayores a las demás muestras, tanto a los 45 como a los 90 días ($p < 0,028$ y $< 0,001$, respectivamente).

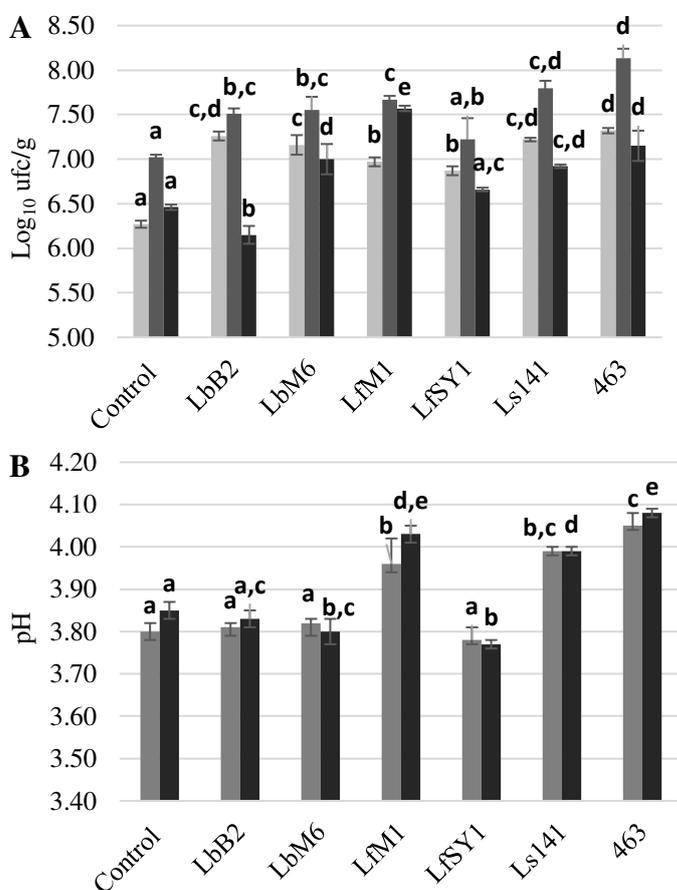


Figura 17 - Recuentos de BAL totales (\log_{10} ufc/g) (A) y pH (B) en micro-silos de maíz sin inocular (control) e inoculados con *L. brevis* LbB2 y LbM6, *L. fermentum* LfM1 y LfSY1 y *L. buchneri* Ls141 y 463, al inicio ($t = 0$) (■) luego de 45 (■) y 90 (■) días. ^{a,b,c,d,e} Valores con letras distintas difieren significativamente ($p < 0,05$) para cada tiempo.

En la figura 18A se puede observar que los silajes control e inoculados con las dos cepas de *L. brevis* y con *L. fermentum* LfSY1, no mostraron diferencias en los niveles de ácido láctico y acético luego de 90 días, mientras que aquellos tratados con *L. fermentum* LfM1 y las dos cepas de *L. buchneri* mostraron concentraciones de ambos ácidos 2-3 veces mayores que el control ($p = 0,000$). Particularmente, LfM1 condujo a concentraciones de ácido láctico mayores que la cepa comercial *L. buchneri* Ls141 ($p = 0,000$).

Por último, la figura 18B muestra la diferencia de temperaturas ΔT ($^{\circ}C$) de los silajes de 90 días luego de su apertura y exposición al aire, durante 234 h (aproximadamente 12 d). Los controles fueron los primeros en perder la estabilidad ($\Delta T > 2^{\circ}C$), en 123 h (5 d). En general, todas las cepas en estudio fueron capaces de conferir un aumento de la estabilidad aeróbica, con diferencias entre ellas. Las cepas que confirieron menor tiempo de estabilidad aeróbica fueron *L. brevis* LbB2 (212 h, 8 d), seguida por *L. fermentum* LfSY1 (224 h, 9 d), mientras que las más efectivas fueron *L. buchneri* Lb141, *L. buchneri* 463, *L. fermentum* LfM1 y *L. brevis* LbM6, las cuales aumentaron la estabilidad aeróbica por lo menos hasta 12 d.

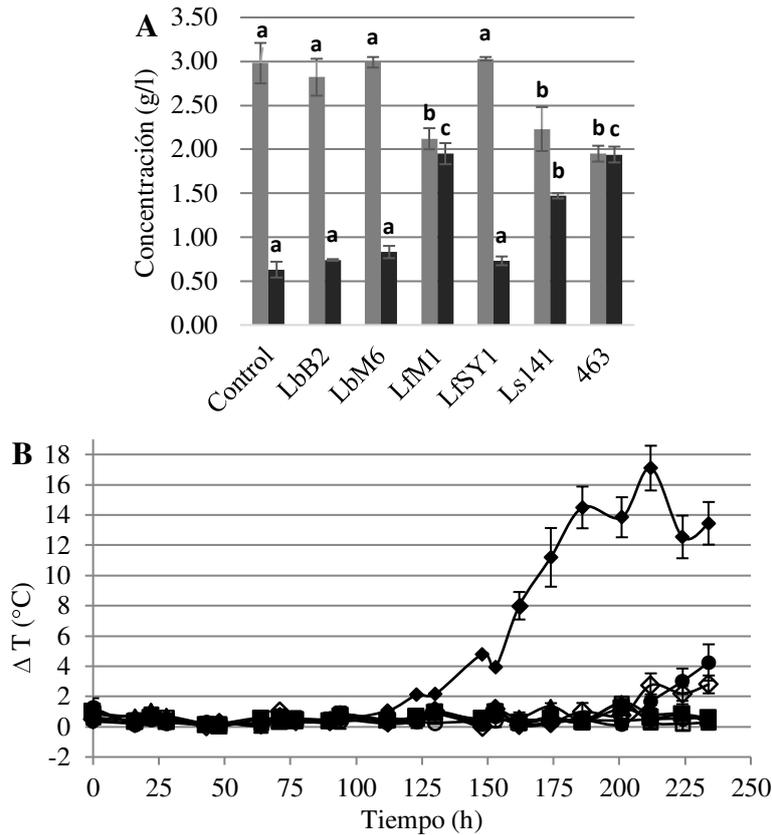


Figura 18 - (A) Concentración de ácido láctico (■) y acético (▲) (g/l) de silajes de maíz, sin tratar (C) e inoculados con cepas heterofermentantes, luego de 90 días de fermentación. ^{a,b,c} valores de concentración con letras distintas difieren significativamente ($p < 0,05$) para cada ácido orgánico determinado. **(B)** Estabilidad aeróbica ($\Delta T \text{ } ^\circ\text{C} = T_{\text{silos}} - T_{\text{ambiente}}$) de silajes de maíz expuestos al aire luego de 90 días de fermentación. Control (◆) y muestras inoculadas con *L. buchneri* 463 (▲), *L. buchneri* Ls141 (■), *L. fermentum* LfSY1 (●), *L. fermentum* LfM1 (○), *L. brevis* LbB2 (◇) y *L. brevis* LbM6 (□). Los valores son promedios (\pm SD) de tres repeticiones.

5. DISCUSIÓN

La población epífita de BAL presente en vegetales varía ampliamente en su diversidad y cantidad ($10^1 - 10^7$ ufc/g), dependiendo de numerosos factores, como la composición química del vegetal, su estado de madurez y las condiciones ambientales [77]. Cuando existen condiciones favorables para el desarrollo de las BAL (como anaerobiosis, actividad acuosa y temperatura adecuadas) puede ocurrir la fermentación láctica espontánea, liderada por estas bacterias naturalmente presentes en el sustrato vegetal de partida [11]. De esta manera, una estrategia ampliamente utilizada para el aislamiento de nuevas cepas de BAL es el enriquecimiento de las mismas en el material vegetal, proporcionando las condiciones adecuadas para su desarrollo. Luego, estas cepas aisladas pueden ser caracterizadas y seleccionadas para su aplicación potencial, por ejemplo, en el ensilado de forrajes [36]. Este ha sido el método utilizado en el presente trabajo de tesis, a través del cual se han obtenido un total de 129 aislamientos de diversas especies de BAL, tanto homofermentantes como heterofermentantes. *Lactiplantibacillus plantarum* fue la especie aislada con mayor frecuencia. Esta especie, caracterizada por una capacidad metabólica amplia y flexible, ha sido aislada a partir de una gran diversidad de plantas y forrajes como alfalfa [78], [79], maíz [36], *ryegrass* [80], arroz [81], trigo [82], entre otros. Asimismo, *L. plantarum* es muy utilizada para ensilados de distintos sustratos tales como alfalfa [83], [84], sorgo [85], maíz [86], *ryegrass* [87], [88] y otros [89]. De hecho, es la especie más utilizada en inoculantes comerciales (Tabla 3), sola o en combinación con otras especies de BAL [69]. Esto se debe a que posee características deseables como robustez, crecimiento vigoroso, rápida producción de ácido láctico, tolerancia a la acidez y buena estabilidad al tratamiento de liofilización [78], [90], [91]. Por otro lado, la especie heterofermentante aislada con mayor frecuencia en esta tesis fue *Lactobacillus brevis*, seguida por *Lactobacillus fermentum*. La presencia de estas especies en diversos forrajes y su participación en el proceso de fermentación es muy común [78], [92], sin embargo, no son muy utilizadas en inoculantes comerciales. *Lactobacillus buchneri* es la especie heterofermentante utilizada por excelencia en inoculantes para ensilado, debido principalmente a la capacidad de una alta producción de ácido acético, debido a características metabólicas particulares de esta especie [93].

Particularmente la alfalfa, avena, sorgo y maíz son cultivos frecuentemente utilizados para el ensilaje en nuestra región, por lo tanto, la atención de este trabajo ha sido enfocada en estos cuatro forrajes [37]. El estudio de la capacidad de desarrollo, la cinética y acidificación de las cepas de *L. plantarum* en los distintos MEV confirma el gran potencial de esta especie para su uso en la fermentación de forrajes. Sin embargo, se observaron diferencias significativas entre cepas aisladas a partir del mismo sustrato, lo que resalta la existencia de características intrínsecas de las cepas, y la importancia de la caracterización fenotípica [94]. Considerando que la velocidad

de acidificación y desarrollo son características de primordial importancia en inoculantes [95], se seleccionaron cuatro cepas (una obtenida de cada forraje) en base a la fermentación del MEV preparado a partir del mismo forraje del cual fueron aisladas. LpA3, aunque con una μ_{\max} de crecimiento ligeramente menor a LpA1 y LpA2, presentó un $\Delta\log_{10}\text{ufc/ml}$ significativamente mayor y generó un mayor y más rápido descenso de pH. Particularmente, LpS5 y LpS13 generaron los menores valores de pH y, aunque se comportaron de manera similar en los recuentos totales y cinética, se seleccionó LpS13. Por último, en el caso de los numerosos *L. plantarum* aislados de maíz, la inoculación con LpM3, LpM11 y LpM15 fueron las que produjeron un mayor descenso del pH en 24 h, siendo LpM15 el seleccionado para continuar con la caracterización. Este método de *screening* ha sido utilizado en trabajos publicados [36].

Un eslogan (*claim*) comúnmente utilizado en inoculantes comerciales es que las cepas más adecuadas para fermentar un vegetal son las que fueron aisladas a partir del mismo vegetal, y no aquellas que se aislaron de un sustrato distinto [96]. En este trabajo se llevaron a cabo ensayos de cinética de crecimiento cruzados de las cuatro cepas (LpAv, LpA3, LpS13 y LpM15) en los cuatro extractos vegetales (MEAv, MEVAI, MES y MEM). Considerando los resultados obtenidos (cinética de crecimiento, recuentos y pH), se observó que la capacidad de crecimiento de estas cuatro cepas estuvo muy relacionada a la naturaleza del sustrato vegetal y no al origen de las mismas. Además, algunas diferencias en los valores de pH y parámetros cinéticos se observaron principalmente en MEAv y MEAI, no así en los medios MES y MEM, los medios más fácilmente fermentables.

Se estudió la capacidad de fermentación de *L. plantarum* LpAv, LpA3, LpS13 y LpM15 en minisilos de maíz inoculadas en distintas dosis, el principal material forrajero utilizado para ensilar en Argentina y en el mundo [97], [98]. Una rápida acidificación del sustrato ensilado es una característica muy valorada en inoculantes, para preservar el silaje ya sea por la inactivación de las proteasas del vegetal como por la reducción del desarrollo de microorganismos patógenos y/o deteriorantes del material a conservar [34], [99]. Al observar los resultados, se puede concluir que todas las cepas son capaces de acelerar la fermentación. Algunas diferencias entre cepas se observaron a las 24 y 48 h en las dosis más bajas, principalmente de 10^4 ufc/ml, siendo LpAv la de menor eficiencia. Sin embargo, a las 24 y 48 h todas las dosis, incluso las más bajas, generaron diferencias significativas con el control, con la excepción de LpAv en 10^4 ufc/g. Esto lleva a destacar la importancia de la inoculación aún en sustratos fácilmente fermentables, como el maíz. Además, al observar que a mayor concentración de inóculo el descenso del pH es más acelerado, también se refleja la importancia de la tasa de inoculación. Considerando que para la dosis de 10^5 ufc/g los pH de todos los silos inoculados mostraron diferencias significativas con el control a las 24 h de fermentación y que una dosis de 10^7 ufc/g no es económicamente viable [100], se seleccionó la dosis de 10^6 ufc/g para continuar con los estudios de fermentación en minisilos. Esta dosis es la más utilizada en los estudios publicados, y generalmente la recomendada en

inoculantes comerciales, por lo que fue elegida para continuar con los estudios en esta Tesis. Así, esta dosis aseguraría una fermentación apropiada, teniendo en cuenta que la microbiota epífita presente en los distintos forrajes varía dependiendo de numerosos factores como el tipo de planta, la madurez del cultivo y factores ambientales como el clima y las condiciones de cosecha [11], [101].

Es interesante resaltar que una tasa de inoculación menor resultó en mayores recuentos de BAL totales luego de 30 días de fermentación. Una hipótesis, aún a demostrarse, es que una tasa de inoculación baja, como 10^4 ufc/g, podría dar lugar a una mejor adaptación metabólica de las BAL inoculadas. Esta baja dosis implicó indudablemente más ciclos de duplicación hasta alcanzar la fase estacionaria que una dosis de inoculación alta, como 10^7 ufc/g. Esta última está más cerca de la concentración comúnmente alcanzada por las BAL en una fase estacionaria (10^8 ufc/g, aproximadamente), por lo que se necesitan menos ciclos de replicación para llegar a la fase estacionaria y, en consecuencia, hay menor tiempo disponible para adaptarse a las condiciones de estrés del ambiente a los que pueden estar expuestas las células. La adaptación es crucial para la supervivencia ya que estimula la producción de energía adicional y baja los niveles de estrés, por ejemplo a través de la alcalinización del citosol bajo condiciones ácidas [102]. Estos resultados también nos permiten confirmar que las cepas, incluso a las menores dosis de inoculación, fueron capaces de acelerar significativamente la fermentación. Por ejemplo, en los minisilos inoculados con 10^7 ufc/g, los recuentos de BAL totales luego de 30 días de fermentación fueron mucho más bajos, sugiriendo que las cepas inoculadas rápidamente alcanzaron la fase estacionaria, perjudicando la proliferación de la microbiota epífita, y entrando en la fase de muerte. En otras palabras, las cepas inoculadas no permitieron el desarrollo de la microbiota epífita, como puede observarse en el recuento del control sin inocular.

La *performance* de las cepas *Lactobacillus plantarum* LpAv, LpA3, LpS13 y LpM15, fue estudiada en un ensayo de fermentación cruzada, en el cual se ensayó su capacidad fermentativa en minisilos de avena, alfalfa, sorgo y maíz. Debido a que la fermentación del silaje depende de numerosos factores, entre los cuales se encuentra la naturaleza del vegetal, en este estudio se comparó la eficiencia de cada una de las cuatro cepas de *L. plantarum* en cada uno de los forrajes. En el ensilado de avena, el nivel inicial de BAL epífitas totales en el material de partida fue cercano a la concentración de BAL inoculadas. Por esto, el efecto potencial de la inoculación podría estar enmascarado por la población epífita, siendo un desafío adicional para las cepas seleccionadas con las que se busca dominar la fermentación [83]. A pesar de esto, LpAv, LpS13 y LpM15 fueron las más efectivas en la acidificación de la avena, disminuyendo considerablemente el pH en 48 h comparado con el control y LpA3. Además, LpM15 disminuyó los parámetros químicos FDA y FDN a los 30 días de fermentación, lo cual podría promover efectos positivos en el rendimiento animal, ya que ambos parámetros están indirectamente relacionados a la digestibilidad y consumo de materia seca, respectivamente [103], [104].

En general, el ensilado de alfalfa no es un proceso sencillo y presenta un gran desafío debido a que este forraje posee un bajo contenido de carbohidratos solubles y una alta capacidad buffer, dificultando el proceso de fermentación y disminución del pH [79]. A pesar de esto, *L. plantarum* ha sido utilizada exitosamente en la fermentación de alfalfa con un contenido de MS amplio, resultando en valores de pH que varían principalmente entre 4,29 y 5,01, según la bibliografía consultada [83], [105]. En el caso del ensilado de alfalfa, solo LpAv tuvo un efecto significativo en la disminución del pH del silaje tanto a las 72 h como a los 30 días. Por otro lado, la inoculación de todas las cepas generó silajes con una menor concentración de nitrógeno amoniacal con respecto al control, lo cual es visto como un efecto positivo, debido a que este parámetro es utilizado generalmente como indicador de la degradación proteica del material y, consecuentemente, de una mala conservación [106]. En base a lo anterior, se podría sugerir que la inoculación disminuyó la proteólisis y la tasa de desaminación en todos los casos y, particularmente, LpAv produjo un silaje con un valor de nitrógeno amoniacal dos veces menor que el control. Por otro lado, el uso de LpM15 indujo una disminución significativa del contenido de MS, comparado al control, lo cual podría deberse a la disminución más lenta del pH. Esto se considera un evento no deseado ya que podría influir en la pérdida de MS, dando origen a un silaje de menor calidad nutritiva [85]. En este trabajo se han obtenido valores de pérdida de MS negativos, con el uso de LpAv, LpA3 y LpS13, lo cual puede ocurrir cuando los valores MS antes y después de ensilar son muy cercanos entre ellos, por lo que las diferencias pueden ser negativas, pero no estadísticamente significativas, concluyendo así que hubo una conservación de la MS [106]–[108].

Aunque la inoculación del sorgo no modificó la composición química final del material con respecto al control, todas las cepas de *L. plantarum* mejoraron el proceso de fermentación acelerando significativamente la caída del pH y generando un pH menor luego de 30 días. A pesar de esto, solo en el caso de LpM15 se detectaron cantidades significativas de BAL viables al tiempo final. Un antecedente similar fue encontrado en un trabajo reciente [91], en el cual se utilizaron dos cepas de *L. plantarum* para el ensilado de sorgo (una comercial y otra aislada de sorgo) y, aunque ambas cepas mejoraron la conservación del material, no se detectaron BAL totales a los 30 días en el caso del inoculante comercial. La viabilidad celular a lo largo del proceso de conservación podría representar una ventaja debido a que, aunque es una hipótesis que necesita ser estudiada con mayor profundidad, las BAL viables presentes en el ensilaje tendrían un potencial efecto beneficioso para los rumiantes [69], [109], [110].

Generalmente se considera que una disminución rápida del pH hasta un valor cercano a 4,2 es adecuado para la conservación del forraje. En el caso del silaje del maíz, debido a su composición química, estos valores se alcanzan comúnmente en las primeras horas del proceso, incluso sin la utilización de un inoculante microbiano, por lo cual en este sustrato no habría margen considerable para observar un efecto significativo del inoculante en el pH [111]. Sin

embargo, en este trabajo, la inoculación con LpAv, LpA3, LpS13 y LpM15 aceleraron significativamente el proceso durante las primeras 24 h con respecto al control, reflejado en los pH, sin diferencias entre las cepas. Esto coincide con los resultados del ensayo previo de dosis-respuesta realizado en maíz, lo cual es consistente con la correlación entre los ensayos *in vitro* (con extractos vegetales) e *in situ* (minisilos) observada por Saarisalo et al. [112], siendo así un método de *screening* útil para la selección de cepas. Además, LpAv, LpS13 y LpM15 condujeron a silajes con menor contenido de nitrógeno amoniacal, comparado con el control. De manera similar a lo ocurrido en ensilajes de avena, puede observarse un efecto positivo de la inoculación en el valor nutricional y pH del forraje fermentado, a pesar de que la carga de BAL epífitas en el material de partida superan a la cantidad de BAL inoculadas.

A modo resumido, al realizar los ensayos de fermentación cruzada de las cepas *L. plantarum* LpAv, LpA3, LpS13 y LpM15, se observó que LpM15 (derivado de maíz) fue la más eficiente para el ensilado de avena y además sería la cepa de elección para la fermentación de sorgo, debido a su viabilidad, mientras que LpAv (aislada de avena) mostró una mejor *performance* que las demás en alfalfa, acelerando la caída del pH y disminuyendo la proteólisis. Asimismo, aunque todas las cepas pueden considerarse efectivas para la disminución del pH del silaje de maíz, en particular LpAv, LpS13 y LpM15 produjeron menor contenido de nitrógeno-NH₃ comparado al control. Estos resultados respaldan el hecho de que el origen de las cepas es de importancia secundaria, siendo su capacidad de fermentación intrínseca y la naturaleza del forraje las características principales a considerarse para el éxito del proceso de conservación del material vegetal [113].

Al momento de abrir los silos para la alimentación del ganado, existe otro desafío a enfrentar, el contacto del material fermentado con el aire, lo que da lugar a la posible fermentación por parte de los hongos filamentosos y las levaduras presentes. La estabilidad aeróbica (EA) es la capacidad de mantener la calidad nutricional y sanitaria del silaje, por un largo período de tiempo, en presencia del aire. Se considera que la EA se pierde cuando la temperatura del material fermentado aumenta 2 °C por encima de la temperatura ambiente [36]. La utilización de cepas de BAL heterofermentantes es una estrategia muy utilizada para aumentar la EA de silajes, siendo el ácido acético uno de los principales ácidos orgánicos responsable de promoverla [43]. En este sentido, se realizó una selección de cuatro cepas heterofermentantes (*L. brevis* LbB2, *L. brevis* LbM6, *L. fermentum* LfSY1 y *L. fermentum* LfM1) en base a la capacidad de producción de ácido acético en medio MRS caldo. Posteriormente, se estudió el efecto de estas cuatro cepas en la EA de micro-silos de maíz. Se observó que LbM6 y LfM1 generaron un aumento de EA similar a las cepas de *L. buchneri*, la especie más estudiada y utilizada por excelencia en inoculantes comerciales [114]–[116] (Tabla 3). Solo algunas cepas de otras especies de BAL heterofermentantes, distintas a *L. buchneri*, han sido estudiadas, como *L. brevis*, *L. diolovorans*, *L. hilgardii*, *L. kefir* y *L. parafarraginis* [117]. Sin embargo, la búsqueda de nuevas especies y

cepas siempre está activa. Hay disponibles publicaciones que informan que algunas cepas de *L. brevis* aumentan la EA, pero con menor eficiencia que *L. buchneri* [43], [118]. Por otro lado, existe una muy limitada evidencia publicada sobre la posibilidad de usar cepas de *L. fermentum* para el aumento de la EA [119]. Según nuestro conocimiento, *L. fermentum* no ha sido empleado en inoculantes comerciales para promover el aumento de la EA, al menos en América del Sur. En este sentido, los resultados de este estudio muestran un gran potencial de *L. fermentum* LfM1, entre otros aislamientos, a ser usado en inoculantes para silos para el mejoramiento de la estabilidad aeróbica.

6. CONCLUSIONES

En esta parte de este trabajo de tesis doctoral se obtuvieron 129 aislamientos de BAL, a partir de 14 sustratos vegetales recién cosechados, demostrándose la ubicuidad de las mismas. Además, la aplicación de una serie de ensayos experimentales sucesivos nos permitió la selección de un número reducido de candidatos con potencial para ser utilizados como inoculantes. En base a los estudios realizados, cuatro cepas de *L. plantarum* (LpAv, LpA3, LpS13 y LpM15) fueron seleccionados y su caracterización mostró su potencial para uso como inoculante para ensilado de alfalfa, avena, sorgo y maíz. Por otro lado, *L. fermentum* LfM1 fue seleccionado por su *performance* en estudios a escala de laboratorio, confiriendo un aumento en la estabilidad aeróbica de ensilajes de maíz. Sin embargo, es necesario profundizar los estudios para determinar su comportamiento ya sea solos, o en combinación. Asimismo, el resto de los aislamientos constituye una colección de cepas de BAL autóctonas de gran valor, las cuales podrán ser estudiadas en el futuro para aplicaciones en alimentación tanto animal como humana. Parte de esta colección (50 cepas) fue cedida en préstamo a través de un MTA (Material Transfer Agreement), por el plazo de 5 años, a la empresa Lactosan (Austria) para profundizar los estudios sobre su potencial de aplicación como inoculantes para silos y la eventual transferencia tecnológica de las cepas seleccionadas (Exp. UNL REC-0961465-19, 21/02/19).

CAPÍTULO 2

METAPROFILING DE SILOS DE SORGO INOCULADOS CON BACTERIAS LÁCTICAS

1. INTRODUCCIÓN

El ensilado es de gran importancia en numerosas zonas del mundo como medio para un suministro continuo de alimento al ganado a lo largo del año. Se trata de un proceso complejo dependiente de numerosos factores tales como condiciones ambientales, composición química del forraje y microorganismos presentes en el material inicial. En particular, las bacterias lácticas epífitas pueden encontrarse en las plantas en concentraciones muy variables que van de 10^1 a 10^7 ufc/g de material fresco, por lo que su abundancia puede no ser siempre suficiente para dirigir la fermentación láctica [35], [69]. Para garantizar una adecuada conservación pueden utilizarse diferentes aditivos, siendo los inoculantes compuestos por bacterias lácticas una de las alternativas más empleadas. Estas BAL inoculadas deben superar y dominar la microbiota compleja, y variable entre lotes del mismo material forrajero, presente en el material a ensilar, con el fin de obtener ensilados con calidad nutricional y microbiológica adecuadas [83].

El desarrollo de aditivos que permitan mejorar la conservación y calidad del forraje es un área de investigación muy activa, dentro de la cual se encuentra la búsqueda de nuevas cepas de BAL con características específicas que ayuden a resolver problemas comunes en la conservación del material vegetal. Existen aún numerosos desafíos que representan potenciales oportunidades en este campo de aplicación de las BAL, siendo continuo el aislamiento y/o caracterización de cepas para el desarrollo de nuevos inoculantes [62]. Las técnicas convencionales de cultivo en placa, las cuales utilizan medios de cultivo y condiciones selectivas, han sido empleadas históricamente en el aislamiento y estudio de cepas de BAL, por ejemplo, como en la primera parte de esta Tesis. Asimismo, estas técnicas dependientes del cultivo han sido utilizadas para el estudio de la composición microbiológica de ensilados, las cuales han sido muy útiles para comprender el papel de las BAL en este proceso, y la contribución de microorganismos perjudiciales como *Clostridium*, levaduras y mohos en el deterioro del material vegetal. Sin embargo, estas técnicas se limitan a microorganismos cultivables en condiciones específicas, resultando en la subestimación de la diversidad del microbioma del ensilaje [44].

El avance de las técnicas de secuenciación masiva ha permitido en los últimos años el estudio de las comunidades microbianas en su ambiente natural. El uso de las técnicas de secuenciación de nueva generación (“*Next Generation Sequencing*”, NGS) permite conocer de manera más completa las características de las poblaciones microbianas, así como su dinámica en el proceso de ensilado. Esto ha generado una nueva visión de la complejidad de la ecología microbiana, caracterizando el papel de las poblaciones epífitas en la calidad del ensilado y cómo los aditivos pueden generar poblaciones más propicias para la producción de un ensilado de alta calidad. El “*metaprofiling*”, o perfilado genético a gran escala, es una de las técnicas más utilizadas, la cual se basa en la amplificación de un solo gen, marcador o amplicón, por ejemplo,

el gen que codifica para el 16S rRNA en procariotas [44]. El estudio de la diversidad y dinámica microbiana en ensilajes aporta al conocimiento más amplio y profundo del proceso, lo cual puede contribuir al desarrollo de nuevos aditivos para mejorar la calidad sanitaria y nutricional de los ensilados y para hacer frente a los desafíos de este método de conservación tan utilizado [120].

Por otro lado, se han publicado estudios que sugieren que la alimentación del ganado con ensilajes podría aumentar la *performance* animal (mayor ingesta, mejora en el estado sanitario, mayor producción de leche y carne) y, aunque los mecanismos de acción no están completamente dilucidados y son necesarios más estudios, se proponen efectos beneficiosos potenciales de cepas de BAL en rumiantes [60]. Particularmente, para llegar a ejercer un efecto beneficioso a nivel intestinal, las BAL deberían resistir a las condiciones ruminales, lo cual ha sido informado en algunos estudios [121], [122], y además, se ha propuesto el ensilaje como vehículo para la administración de probióticos al ganado, aunque los efectos de estos a nivel intestinal no han sido muy estudiados [123]. Además, también podrían verificarse efectos benéficos para microorganismos no viables y sus metabolitos y fragmentos celulares, lo cual ha sido la base del desarrollo reciente del concepto de postbióticos [124].

En esta parte de la Tesis se utilizaron técnicas de NGS y citometría de flujo para analizar el efecto de la inoculación de sorgo con *L. plantarum* LpAv, *P. pentosaceus* PpM y *Lactobacillus paracasei* LcAv. Estas cepas fueron seleccionadas a partir de la caracterización ensayos *in vitro* de co-cultivos con macrófagos murinos RAW 264.7, detallado en el capítulo 3 de la Tesis, sección 4.1. Estas 3 cepas fueron las que indujeron la producción de IL-10 en mayor magnitud. Se llevó a cabo un ensayo con animales para una exploración preliminar del potencial del ensilaje para promover la salud intestinal.

2. OBJETIVOS

- ✓ Estudiar la dinámica bacteriana en silos de sorgo fermentados espontáneamente e inoculados con *Lactobacillus plantarum* LpAv, *Pediococcus pentosaceus* PpM y *Lactobacillus paracasei* LcAv, mediante técnicas independientes del cultivo.
- ✓ Estudiar la capacidad promotora de la salud intestinal de silos de sorgo inoculados con BAL con potencial inmunomodulador: *Lactobacillus plantarum* LpAv, *Pediococcus pentosaceus* PpM y *Lactobacillus paracasei* LcAv.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Bacterias lácticas

En este capítulo de Tesis se utilizaron tres cepas de BAL: *L. plantarum* LpAv, *L. paracasei* LcAv and *P. pentosaceus* PpM. Estas 3 BAL se utilizaron aquí por su potencial inmunomodulador, lo cual se describe en el capítulo 3 de este trabajo. Estas cepas son mantenidas a -70 °C, como parte de la colección de cultivos del INLAIN. Para su uso, las BAL fueron cultivadas dos veces sucesivas en caldo MRS e incubadas a 35°C en aerobiosis.

3.2 Confección de micro-silos

Los silos de sorgo fueron confeccionados a escala de laboratorio como se describe en la sección 3.3.3.1 (capítulo 1). Brevemente, cultivos de *L. plantarum* LpAv, *L. paracasei* LcAv y *P. pentosaceus* PpM1 en MRS caldo (37°C, 18 h, aerobiosis) fueron lavados con *buffer* PBS (pH 7,2) y resuspendidos todos juntos en NaCl 0,85 % (p/v). El sorgo, picado a campo, fue rociado con la suspensión anterior a razón de 20 ml/kg de forraje fresco, obteniendo una concentración de cada cepa de BAL del orden de 10⁶ ufc/g. Porciones de 1 kg del material inoculado y no inoculado (control) se dispusieron por separado en bolsas de polietileno (Cryovac: BB4LA), se sellaron al vacío (envasadora Turbovac, Bosch), y se incubaron a temperatura ambiente (25°C) durante 30 días. Los silos inoculados y control fueron realizados por triplicados independientes para cada tiempo de muestreo: 0, 24, 48, 72 h y 30 días de fermentación.

3.3 Análisis microbiológico y fisicoquímicos

Muestras de 10 g de cada microsilo se homogeneizaron con 90 ml de agua estéril en *stomacher* (3 ciclos de 3 min, alta velocidad). Se determinó pH, recuentos de BAL totales en placas de MRS-agar (35°C, 48 h, aerobiosis) y hongos y levaduras en Glucosa Cloranfenicol agar (25°C, 7 días, aerobiosis) a los 0, 1, 2, 3 y 30 días de fermentación. Asimismo, se realizaron las determinaciones químicas % MS, %PB, % Cz, % FDAs, % FDNa, % LDA, % EE y N-NH₃/NT, al inicio y luego de 30 días de fermentación, según se describe en la sección 3.3.4.3 (capítulo 1). Todas las determinaciones se realizaron en triplicados independientes.

3.4 Determinación de la composición bacteriana por secuenciación del gen 16S ARNr

3.4.1 Extracción y aislamiento del ADN total

Se realizó la extracción del ADN total de las muestras silajes de sorgo sin inocular y de los inoculados (*L. plantarum* LpAv, *L. paracasei* LcAv y *P. pentosaceus* PpM1) al inicio (t = 0) luego de 3 y 30 días de fermentación. Para esto, 30 g de cada muestra se homogeneizaron con 100 ml de NaCl 0,85 % (p/v) usando *stomacher* (3 ciclos de 3 min, baja velocidad), se filtraron con gasa estéril y los sobrenadantes se centrifugaron a 15000 xg por 20 min. Los *pellets* resultantes se lavaron dos veces con 30 ml de *buffer* de disociación (Tris-HCl 100 mM, EDTA 50 mM, NaCl 150 mM, pH 8.0) [125]. Para la extracción de ADN se usó el kit QIAamp DNA stool kit (Qiagen). Cada *pellet* (0,3 g) se resuspendió en solución ASL y, para facilitar la lisis celular, se agregaron perlas de vidrio (0,1, 0,4 y 0,6 mm) y se trató en disruptor celular “Mini BeadBeater” (Biospec, Bartlesville, IL, EEUU) 3 ciclos de 1 min con intervalos de 30 s en baño de hielo, continuando luego con el protocolo especificado por el fabricante. El ADN obtenido se cuantificó por fluorimetría en equipo Qubit (Thermo Fisher Scientific) usando el kit Qubit dsDNA BR Assay Kit. Las muestras de ADN total fueron congeladas a -20°C y enviadas a la Unidad de Genómica del Instituto de Biotecnología, perteneciente al Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA, Hurlingham, Buenos Aires, Argentina).

3.4.2 Secuenciación del gen 16S ARNr

La amplificación de la región V3-V4 del gen 16S ARNr y secuenciación por Illumina fue llevada a cabo por la Unidad de Genómica del Instituto de Biotecnología (INTA, Buenos Aires, Argentina). Brevemente, se realizó la amplificación del gen 16S ARNr (V3-V4) usando el par de cebadores universales 341F (5'-CCTACGGGNGGCWGCAG-3') y 805R (5'-GGACTACHVGGGTATCTAATCC-3'), con la adición de secuencias adaptadoras estándar para la plataforma MiSeq [126]. La secuenciación se realizó en el equipo MiSeq (Illumina), siguiendo las especificaciones del fabricante para una corrida “*paired-end*” de 2x250 pb, en el servicio CATG-INTA.

3.4.3 Análisis bioinformático de los datos de secuenciación masiva

Las secuencias crudas fueron procesadas utilizando una versión modificada de pipeline propuesto por Logares (2017) (<https://github.com/ramalok>). Primero se corrigieron errores de sustitución, ocurridos durante la secuenciación, utilizando el *software* “SPAdes v3.5.0” [128], el cual emplea algoritmos basados en el agrupamiento de HAMMER en base a los valores de calidad

de las secuencias e introduce sanciones bayesianas (BAYES HAMMER *tool*) [129]. A continuación, se filtraron las secuencias en base a su calidad usando la función “*fastq_filter*”, del programa “USEARCH-v10” [130] (Edgar & Flyvbjerg, 2015). Las secuencias que pasaron el control de calidad fueron analizadas usando “UNOISE2” [131] para definir las OTUs (“*operational taxonomic units*”) sin agrupamiento (zero-radius OTUs [zOTUs]) [132], [133]. Posteriormente, las zOTUs fueron asignadas taxonómicamente mediante BLAST [134] usando la base de datos SILVA (SSU Ref 132 NR 99), y se construyeron las tablas de zOTU con la función “*otutab*” en USEARCH-v10 [130]. A continuación, se usó la función “*rarefy*” el paquete de datos “*vegan v.2.5*” [135] para obtener la tabla de zOTU normalizada, compuesta solo por aquellas OTUs con abundancia mayor o igual a 10 secuencias, para que nuestras conclusiones no estén sesgadas por errores de secuenciación. Asimismo, con este mismo paquete de datos se obtuvieron las curvas de rarefacción de las zOTU, para evaluar si la riqueza alcanzó la saturación.

3.5 Estudio de las poblaciones celulares por citometría de flujo

Se utilizó citometría de flujo para cuantificar las proporciones de bacterias viables, no viables y dañadas presentes en el ensilado de sorgo. Las poblaciones celulares fueron analizadas tanto en los ensilados control (sin inocular) como en los ensilados inoculados (*L. plantarum* LpAv, *L. paracasei* LcAv y *P. pentosaceus* PpM1) al comienzo ($t = 0$) y luego de 3 y 30 días de fermentación. Se homogeneizaron 50 g de muestra de cada ensilado con 200 ml de agua destilada en *stomacher* (3 ciclos de 3 min, baja velocidad). Las muestras homogeneizadas fueron luego filtradas con gasa y centrifugadas ($12000 \times g$, 15 min). Los *pellets* obtenidos se lavaron dos veces con solución fisiológica de fosfato y se resuspendieron en solución fisiológica de fosfato que contenía 0,01 % (v/v) de TWEEN® y 1 mmol/l de EDTA, hasta alcanzar una densidad celular aproximada de 10^7 ufc/mL [136]. Las suspensiones celulares obtenidas se filtraron con filtros de $40 \mu\text{m}$ y se tiñeron usando con yoduro de propidio (PI, $43 \mu\text{mol/l}$) y naranja de tiazol (TO, 420nmol/l) del kit BD™ Cell Viability (BD Biosciences, CA, Estados Unidos) durante 5 min a temperatura ambiente en la oscuridad, según las instrucciones del fabricante. Se realizó control positivo con células vivas no tratadas, y control negativo con células muertas ($80 \text{ }^\circ\text{C}$ por 20 min en *buffer* potásico). Las células muertas (rojas) y las no tratadas (verdes) se utilizaron para designar las subpoblaciones muertas (R1) y vivas (R3), mientras que todas las células situadas entre R1 y R3 se marcaron como dañadas (R2). Para obtener los datos se utilizó el *software* GuavaCytoSoft™ 3.6.1, y los mismos se analizaron con el *software* FlowJo 10 (BD Biosciences). Se registraron al menos un total de 30.000 eventos para cada muestra.

3.6 Ensayo de sobrevida contra la infección por *Salmonella Typhimurium*

3.6.1 Animales

Se emplearon ratones machos BALB/c, de seis semanas de edad ($20,1 \pm 1,0$ g), provenientes del Centro de Medicina Comparada del Instituto de Ciencias Veterinarias del Litoral (CMC-ICiVet-Litoral, CONICET-UNL), Facultad de Ciencias Veterinarias, UNL (Esperanza, Santa Fe, Argentina). Los animales fueron distribuidos aleatoriamente en cajas plásticas (4-5 ratones/caja) y mantenidos una semana en el bioterio del INLAIN previo al comienzo de las experiencias. Se mantuvo un ambiente controlado a 21 ± 2 °C con 55 ± 2 % de humedad y un ciclo de luz/oscuridad de 12 h, con 20 renovaciones del volumen de aire del ambiente/hora. Los animales fueron mantenidos y tratados de acuerdo con los lineamientos establecidos por el *National Institute of Health* (NIH, EEUU) y los experimentos fueron aprobados por el Comité de ética animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias, UNL. Todos los animales recibieron, en simultáneo y *ad libitum*, agua potable y alimento balanceado estéril (Cooperación, Buenos Aires, Argentina) con 230 g/Kg de proteína, 60 g/kg de fibra cruda, 100 g/kg de minerales totales, 13 g/kg de Ca, 8 g/kg de P, 120 g/kg de agua y vitaminas. Los ingredientes utilizados por el proveedor en la formulación fueron: harina de maíz, trigo y soja, aceite de soja, gluten de maíz, aceite de girasol, harina de pescado, vitamina A, B1, B2, B6, B12, C, D3, K, biotina, ácido fólico, ácido pantoténico, ácido nicotínico, cloruro de colina, carbonato de calcio, cloruro de sodio, selenito de sodio yodato de calcio, óxido de cobre, sulfato ferroso, óxido manganeso, óxido de magnesio, óxido de zinc, lisina, metionina, treonina y extracto de romero.

3.6.2 *Salmonella Typhimurium*

Salmonella enterica serovar. Thyphimurium 1724/12, obtenida del Instituto Malbrán (Buenos Aires, Argentina) y conservada a -70°C en medio Triptona de Soja (TS, Biokar) adicionada con 20 % (v/v) de glicerol (Cicarelli), en la colección del INLAIN. La cepa de *Salmonella* fue reactivada *overnight* (18 h) en caldo TS a 37 °C en aerobiosis para la infección de los animales en el ensayo de sobrevida.

3.6.3 Ensayo de sobrevida

Para la realización de este ensayo, el tamaño de las muestras (cantidad de animales) fue calculado de acuerdo a Charan y Kantharia [137], considerando un nivel de significancia del 5%, con una potencia del 80 % y una tasa de sobrevida del 40 % en el grupo control y 90 % en el grupo que recibe el tratamiento en estudio, dando como resultado un mínimo de 10 animales por

grupo. Todos los animales recibieron, vía intragástrica (*gavage*), 0,3 ml de las muestras correspondientes, durante 10 días consecutivos. Al día 11, se desafiaron (intubación intragástrica o *gavage*) los ratones con una única dosis infectiva (10^6 ufc/ratón) de *S. Typhimurium* 1724/12. Para este ensayo, se conformaron tres grupos experimentales de 12 animales cada uno: 1) grupo control (GC), el cual recibió agua de canilla estéril; 2) ensilaje inoculado (EI), el cual recibió un extracto acuoso del ensilaje inoculado (LpAv, LpAc y PpM) y fermentado durante 30 días; 3) ensilaje control (EC), el cual recibió un extracto del ensilaje control fermentado durante 30 días; y 4) sorgo fresco no inoculado (SF), el cual recibió un extracto del sorgo picado previo al ensilaje. Todos los extractos se obtuvieron homogenizando 50 g del material correspondiente (ensilaje inoculado fermentado, ensilaje control fermentado, sorgo fresco sin inocular) con 200 ml de agua de canilla estéril en *stomacher* (3 ciclos de 3 min, alta velocidad), y se filtró con gasa, siendo la suspensión resultante el extracto a administrar a los animales.

La sobrevida post-infección fue monitoreada diariamente y se consideró el ensayo finalizado cuando no se registró ninguna muerte en ninguno de los grupos estudiados después de tres días consecutivos. Se graficó la mortalidad acumulada en el período post-infección en función del tiempo, y se expresaron los resultados como % de sobrevida frente la infección.

3.7 Análisis estadístico

Las determinaciones fisicoquímicas y análisis microbiológicos fueron realizados por triplicados y los resultados fueron presentados como el valor promedio \pm desviación estándar (SD). Se utilizó el *software* SPSS 15.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, Estados Unidos) para el análisis ANOVA de los datos. Las pruebas *post hoc* de Tuckey y Duncan fueron usadas para detectar diferencias significativas entre valores cuando $p < 0,05$.

Se usó el *software* PAST [138] para examinar diferencias en la composición bacteriana de las zOTUs correspondientes a las muestras inoculadas y control a los tiempos 0, 3 y 30 días, a través de un análisis NMDS (*non-metric multi-dimensional scaling plot*) y ANOSIM (9999 permutaciones) en matrices triangulares Bray-Curtis. Para estudiar la estructura taxonómica general de las comunidades bacterianas, se estimaron la riqueza, por medio del índice Chao1 [139], y la diversidad, por el índice Shannon [140], a partir de la tabla zOTU normalizada. Las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas cuando $p < 0,05$. Para comparar entre las muestras control y tratadas se aplicaron los test t y de Mann-Whitney. Para comparar entre muestra control y tratada a distintos tiempos (muestras pareadas) se usaron ANOVA (paramétrica) con la prueba *post hoc* de Tuckey o Friedman (no paramétrica) y Wilcoxon.

El análisis estadístico de los resultados obtenidos en el ensayo con animales se realizó con el programa Sigma Plot 12.0 (Systat Software Inc., San Jose, CA, Estados Unidos) usando la prueba “*log Rank test*”.

4. RESULTADOS

4.1 Análisis microbiológico y fisicoquímico de los ensilados de sorgo

Los recuentos de BAL totales, de hongos filamentosos y levaduras y los valores de pH del ensilaje de sorgo previo a la fermentación ($t=0$) y luego de 1, 2, 3 y 30 días de fermentación se muestran en la tabla 11. Aunque la inoculación incrementó el recuento de BAL totales (\log_{10} ufc/g) en aproximadamente 1 orden logarítmico, no hubo diferencias significativas en los recuentos durante los tres primeros días de fermentación entre los ensilajes control y tratado. Sin embargo, la inoculación con LpAv, LpAc y PpM redujo significativamente el valor del pH del ensilaje desde el día 1 ($p = 0,003$) y hasta el final del experimento ($p = 0,029$), cuando se comparó con el control. Asimismo, el pH mostró valores mínimos a los 2 días en ambos ensilajes, permaneciendo sin cambios notables aún al día 30. Después de 30 días, los ensilados inoculados mostraron recuentos de BAL de aproximadamente 1 orden logarítmico mayor que el control ($p = 0,000$). Por último, no se observó un efecto significativo de la inoculación sobre la concentración de hongos y levaduras a los 30 días de ensilaje.

Tabla 11 –Recuento de BAL totales y de hongos filamentosos y levaduras (\log_{10} ufc/g) y valores de pH de los ensilados de sorgo control (sin inocular) e inoculados con *Lactobacillus plantarum* LpAv, *Lactobacillus paracasei* LcAv y *Pediococcus pentosaceus* PpM, previo a la fermentación ($t = 0$) y luego de 1, 2, 3 y 30 días de fermentación.

Tiempo (días)	Recuentos celulares (\log_{10} ufc/g \pm SD)					
	Bacterias lácticas		Hongos filamentosos y levaduras		pH	
	Control	Inoculado	Control	Inoculado	Control	Inoculado
0	5,69 \pm 0,02 ^a	6,90 \pm 0,01 ^b	6,36 \pm 0,03	6,30 \pm 0,02	5,86 \pm 0,02	5,86 \pm 0,02
1	9,07 \pm 0,14	9,17 \pm 0,06	Nd	Nd	4,21 \pm 0,09 ^a	4,06 \pm 0,04 ^b
2	9,12 \pm 0,17	9,05 \pm 0,05	Nd	Nd	4,01 \pm 0,02 ^a	3,81 \pm 0,04 ^b
3	9,02 \pm 0,09	9,13 \pm 0,05	Nd	Nd	4,02 \pm 0,04 ^a	3,89 \pm 0,02 ^b
30	7,64 \pm 0,03 ^a	8,34 \pm 0,07 ^b	3,68 \pm 0,33	4,12 \pm 0,12	4,00 \pm 0,02 ^a	3,88 \pm 0,02 ^b

Los valores son promedios (\pm SD) de 3 repeticiones. Nd: no disponible. ^{a,b} valores con diferente superíndice en la misma fila, para cada parámetro determinado, difieren significativamente ($p < 0,05$).

Con respecto a los análisis químicos de los ensilajes (Tabla 12), el contenido de MS del material al inicio del ensilaje fue $31,17 \pm 0,05$ %. Luego de 30 días, los parámetros que mostraron diferencias entre muestras inoculadas y controles fueron MS y LDA, sin diferencias significativas para el resto de las determinaciones realizadas.

Tabla 12 – Análisis químico de ensilaje de sorgo control e inoculado con *L. plantarum* LpAv, *L. paracasei* LcAv y *P. pentosaceus* PpM. Las muestras fueron tomadas de los ensilajes previo a la fermentación (S0) y luego de 30 días de fermentación del control (C30) e inoculado (I30).

	N-NH ₃ /NT (%)	Pérdida de MS (%)	PB (%)	FDNa (%)	FDAs (%)	LDA (%)	EE (%)	Cz (%)
S0	$3,64 \pm 0,25^a$	-	$5,69 \pm 0,34$	$52,67 \pm 5,49$	$28,86 \pm 2,94$	$5,09 \pm 0,18^{a,b}$	$2,20 \pm 0,36^a$	$7,45 \pm 0,24$
C30	$3,70 \pm 0,01^{a,b}$	$2,73 \pm 0,23^a$	$5,64 \pm 0,65$	$45,94 \pm 5,73$	$25,54 \pm 2,95$	$4,81 \pm 0,38^a$	$3,06 \pm 0,55^{a,b}$	$6,90 \pm 1,15$
I30	$4,05 \pm 0,19^b$	$1,42 \pm 0,39^b$	$5,62 \pm 0,39$	$45,07 \pm 3,71$	$24,93 \pm 2,09$	$5,71 \pm 0,42^b$	$3,76 \pm 0,27^b$	$6,77 \pm 0,74$

Los valores son promedios (\pm SD) de 3 repeticiones. ^{a,b,c} valores en columna con distinto superíndice difieren significativamente ($p < 0,05$).

4.2 Análisis de la comunidad bacteriana de los ensilados de sorgo

4.2.1 Secuenciación del gen 16S ARNr

Se estudió la composición de la comunidad microbiana durante el experimento mediante secuenciación masiva del gen 16S ARNr (plataforma Illumina). Según las curvas de rarefacción obtenidas (Fig. S1, material suplementario), el proceso fue suficiente para secuenciar una gran fracción de la riqueza bacteriana en todos los tiempos de muestreo. Brevemente, el análisis de la secuenciación generó 3.558.692 lecturas crudas (*forward + reverse*) de una longitud de 250 nt. Se obtuvo una primera tabla de zOTUs de 917 zOTUs y 811.690 lecturas, la cual se procesó para generar la tabla de zOTUs normalizada compuesta por 881 zOTUs bacterianos y una media de 19.933 lecturas por muestra. Los detalles del número de lecturas generadas por muestra antes y después del filtrado de calidad, junto con el número de OTUs detectadas en cada muestra, se presentan en la Tabla S1 (material suplementario).

4.2.2 Análisis de la diversidad bacteriana

Para estudiar la similitud en la estructura taxonómica de las muestras se realizó un análisis NMDS (*Non-Metric Multi-Dimensional Scaling*). El NMDS produce un ordenamiento basado en una matriz de distancias: es probable que los objetos que se muestran más cerca entre sí sean más similares que los que se ubican más lejos. En este caso, las muestras ubicadas más cerca entre sí presentan mayor similitud entre ellas. El gráfico NMDS mostró tres *clusters* claramente definidos basados en las similitudes de la composición taxonómica (Fig. 19). El primer *cluster*

(A), situado del lado izquierdo del gráfico, está compuesto por las muestras inoculadas y control antes de la fermentación. Las muestras inoculadas luego de 3 y 30 días de fermentación se agruparon en la parte superior derecha de gráfico (B), mientras que las muestras control después de 3 y 30 días de fermentación se agruparon en la parte inferior derecha del gráfico (C). Para confirmar si las diferencias en la estructura de la comunidad bacteriana de las muestras son significativas, se realizó un análisis de similitudes (ANOSIM), el cual confirmó las diferencias entre los 3 *clusters*: $p = 0,0027$ (A-B), $0,0026$ (A-C) y $0,0003$ (B-C). Cabe resaltar que las diferencias en la estructura de la comunidad se observaron ya a los 3 días de fermentación. Por otro lado, para cuantificar la contribución de cada OTU a las diferencias observadas entre los grupos, se realizó una prueba de porcentajes de similitud (SIMPER). Las OTUs que más contribuyeron a la disimilitud entre los grupos A y B fueron la OTU 2 (21,20 %), seguida de la OTU 3 (14,14 %), ambas asignadas a *Lactobacillus* sp. y *L. plantarum*, respectivamente. Cuando se contrastaron los grupos A y C, la OTU 2 contribuyó con un 21,54 % a la diferencia. Por otro lado, la OTU 3 y la OTU 2 ofrecieron un 24,38 y un 9,37 % de contribución, respectivamente, en las diferencias entre los grupos B y C.

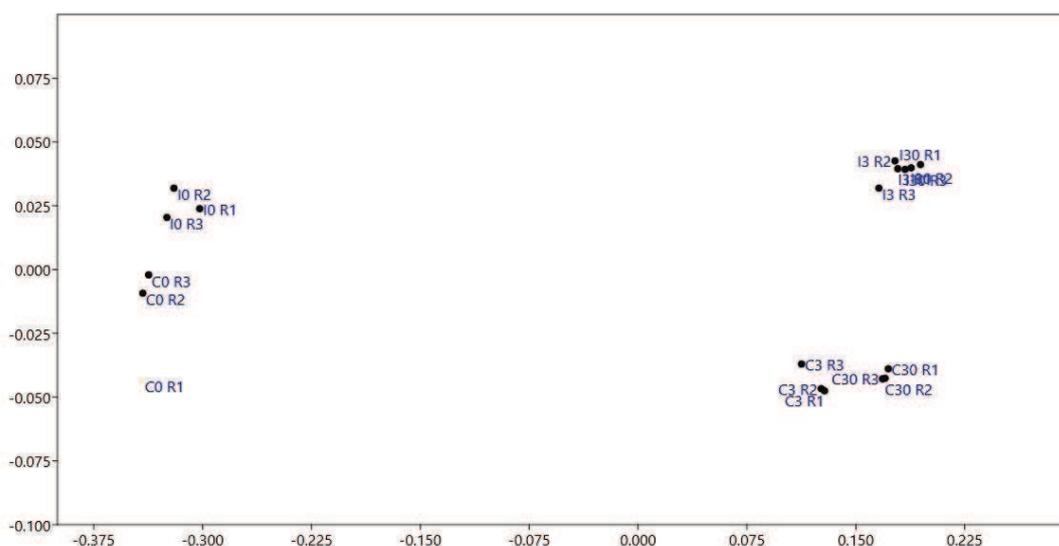


Figura 19 – Gráfico NMDS (siglas en inglés de *Non-Metric Multidimensional Scaling*) de la microbiota de silos de sorgo control (sin inocular) e inoculados con *L. plantarum* LpAv, *L. paracasei* LcAv y *P. pentosaceus* PpM1 antes de la fermentación ($t = 0$) y luego de 30 días. Ensilado control al tiempo 0 (C0), 3 (C3) y 30 días (C30) e inoculado al tiempo 0 (I0), 3 (I3) y 30 días (I30). R1, R2 y R3 en cada muestra indican el número de replicado. Todos los ensilajes se realizaron por triplicado.

Se realizó un análisis de diversidad bacteriana en las muestras mediante el cálculo de los índices de riqueza (Chao1) y diversidad (Shannon). La inoculación con LpAv, LcAv y PpM, aumentó significativamente la riqueza de la comunidad bacteriana al tiempo inicial con respecto al control ($p = 0,030$), según el índice Chao1 (Fig. 20A). Luego de 3 y 30 días de fermentación, este índice se mantuvo sin cambios significativos en el control ($p = 0,657$), mientras que disminuyó a lo largo del tiempo en los ensilados inoculados. El índice de riqueza disminuyó en la muestra inoculada ($p = 0,001$) desde $758,37 \pm 17,78$ al comienzo hasta $448,57 \pm 31,73$ luego de 30 días de fermentación. Asimismo, al comparar entre el control y el ensilaje inoculado, la riqueza estimada fue menor en el tratado a los 3 ($p = 0,038$) y 30 días ($p = 0,002$).

Por otro lado, la inoculación no afectó significativamente la diversidad bacteriana de los ensilajes al inicio, pero el índice de Shannon disminuyó después de 3 y 30 días de fermentación en ambas muestras (Fig. 20B). La mayor caída de diversidad se observó en los ensilajes inoculados, desde $5,086 \pm 0,130$ a $3,055 \pm 0,046$, a los 3 días ($p = 0,000$). Además, al comparar entre control e inoculado, la diversidad fue menor en el ensilaje tratado a los 3 y 30 días ($p = 0,000$ y $0,003$, respectivamente).

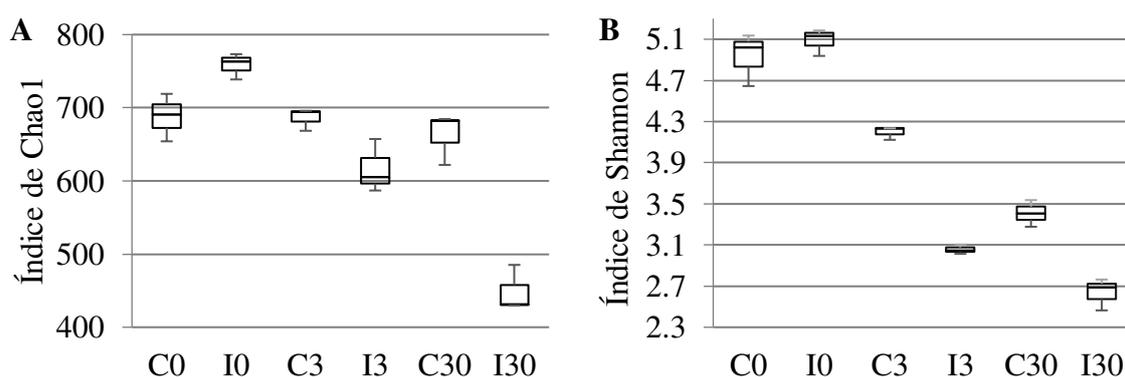


Figura 20 –Análisis de diversidad bacteriana de silos de sorgo control (C) e inoculado (I) con *L. plantarum* LpAv, *L. paracasei* LcAv y *P. pentosaceus* PpM1, al inicio ($t = 0$) y después de 3 y 30 días de fermentación. A) Riqueza (índice de Chao1) y B) diversidad (índice de Shannon).

4.2.3 Análisis de la composición bacteriana

La figura 21A muestra la abundancia relativa de los distintos filos, en las muestras de sorgo control y tratado, antes ($t = 0$) y después de 3 y 30 días de fermentación. El filo predominante en el material fresco antes de la fermentación fue Proteobacteria, disminuyendo su abundancia relativa con la inoculación desde $86,19 \pm 1,80\%$ a $78,37 \pm 3,70\%$ ($p = 0,030$). Luego de 3 y 30 días, su valor relativo disminuyó significativamente en ambos ensilajes, siendo siempre mayor en el control *versus* el tratado, con valores finales de $16,60 \pm 2,39\%$ y $7,45 \pm 1,84\%$, respectivamente ($p = 0,006$). Por el contrario, al inocular las 3 cepas pertenecientes al filo

Firmicutes, su abundancia relativa aumentó de $2,52 \pm 0,61$ a $9,34 \pm 3,07$ % ($p = 0,020$). Este filo tuvo valores considerablemente mayores a los 3 y 30 días en ambos ensilados, siendo siempre mayor en la muestra inoculada ($p = 0,010$ y $0,003$, respectivamente). El aumento de la abundancia de Firmicutes en el control fue significativo tanto a los 3 ($p = 0,000$) como a los 30 ($p = 0,001$) días. En el caso de las muestras inoculadas, el aumento de abundancia fue significativo a los 3 días ($p = 0,000$) y, aunque muestra un valor mayor también a los 30 días, esa diferencia no fue estadísticamente significativa comparada con su valor a los 3 días ($p = 0,061$). Firmicutes fue el filo predominante en ambas muestras tanto a los 3 como a los 30 días, mostrando una abundancia relativa cercana al 80% en el control y al 90% en el ensilado inoculado al tiempo final del ensayo. El filo Actinobacteria, representado principalmente por la clase Actinobacteria, disminuyó de un 5-6% a 0,6-1,2% a los 3 días de fermentación, sin significancia estadística entre control e inoculado en ningún tiempo de muestreo ($p > 0,05$). Asimismo, la abundancia relativa de Bacteroidetes, representado por la clase Bacteroidia, con valores de 5,71-6,03% previo a la fermentación, mostró un mayor descenso en ensilajes inoculados ($0,30 \pm 0,05$ %) que en control ($0,88 \pm 0,09$ %) a los 3 días ($p = 0,000$). Por último, se detectaron los filos Acidobacteria, Epsilonbacteraeota, Patescibacteria, Planctomycetes y Verrucomicrobia en las muestras frescas, con abundancias relativas menores a 0,04%, siendo indetectables en ambas muestras luego de 3 y 30 días de fermentación.

El filo Proteobacteria estuvo representado mayoritariamente por las clases Alpha proteobacteria y Gamma proteobacteria (Fig. 21B). Los valores relativos de las primeras se estimaron en $33,84 \pm 7,98$ % en el control y $39,71 \pm 4,05$ % en el forraje inoculado, antes del inicio del proceso de fermentación. Estos contenidos disminuyeron significativamente a $7,01 \pm 1,35$ % en control y a $3,30 \pm 1,30$ % en inoculado, con $p = 0,026$ al comparar entre muestras, y $p = 0,000$ al comparar cada ensilado con el tiempo inicial. Luego de 30 días, la abundancia relativa se mantuvo en valores menores en inoculados ($2,85 \pm 0,83$ %) *versus* control ($5,56 \pm 0,14$ %), aunque al comparar cada muestra con el tiempo de 3 días no se registró una disminución significativa. No se observó una disminución estadísticamente significativa a los 30 días con respecto al tiempo anterior, siendo aún los valores relativos menores para las muestras inoculadas con respecto al control. Después de 3 días, el contenido relativo de esta clase disminuyó significativamente ($p = 0,000$) a $7,01 \pm 1,35$ % en el control y a $3,30 \pm 1,30$ % en inoculado, con $p = 0,026$ al comparar entre muestras. La abundancia relativa en la muestra inoculada ($2,85 \pm 0,83$ %) fue significativamente menor que en el control ($5,56 \pm 0,14$ %) después de 30 días, pero no se encontraron diferencias con el tiempo de 3 días. El contenido relativo de Gamma proteobacteria no se modificó significativamente ($p = 0,116$) con la inoculación, aunque los valores fueron de $52,31 \pm 9,79$ % en el control y $38,60 \pm 6,71$ % en el inoculado. Ya a los 3 días sus valores disminuyeron a $26,38 \pm 4,21$ % y $12,47 \pm 3,92$ %, respectivamente, y a los 30 días fueron de 11,04

$\pm 2,52\%$ y $4,59 \pm 1,00\%$, respectivamente, siendo las diferencias entre ambas muestras significativas con un $p = 0,014$ para 3 días y $0,015$ para 30 días.

Como la clase Clostridia fue muy baja ($0,00 - 0,02\%$) desde el principio hasta el final del ensayo, el filo Firmicutes estuvo representado casi en su totalidad por la clase Bacilli.

Con respecto a los órdenes pertenecientes a Alphaproteobacteria, sus abundancias relativas iniciales no fueron modificadas significativamente por la inoculación (Fig. 21C). Entre ellos, Rhizobiales se redujo significativamente de $18,32-22,45\%$ a un nivel de $1,30-2,93\%$ después de 3 días, aunque sin diferencias entre control y tratado. Por otro lado, el descenso de las abundancias de Sphingomonadales, Acetobacterales, Caulobacterales y Rhodobacterales también fue significativo a los 3 días en ambos ensilajes, siendo los valores de los primeros 3 significativamente más altos en el control *versus* el inoculado ($p = 0,039, 0,026$ y $0,001$, respectivamente). Al punto de muestreo final, la diferencia entre las muestras de control y las inoculadas fue significativa para los órdenes Sphingomonadales, Caulobacterales y Rhodobacterales ($p = 0,005, 0,005$ y $0,001$, respectivamente). Los principales órdenes de la clase Gammaproteobacteria fueron Enterobacterales y Pseudomonadales, seguidos de Xanthomonadales. Cuando las abundancias relativas en el ensilaje inoculado se compararon con el control, no hubo diferencias previo a la fermentación, pero las tres fueron significativamente menores en las muestras inoculadas *versus* el control a los 3 días ($p = 0,022, 0,015$ y $0,000$, respectivamente) y 30 días ($p = 0,031, 0,004$ y $0,026$, respectivamente). Enterobacterales disminuyó desde $34,18 \pm 9,12\%$ (control) y $22,54 \pm 3,89\%$ (inoculado) a $24,14 \pm 4,50$ y $11,51 \pm 4,03\%$, respectivamente, a los 3 días, con valores de $9,58 \pm 2,74$ y $4,16 \pm 0,88\%$, respectivamente, a los 30 días. Además, el orden Cellvibrionales mostró diferencias en el ensilado inoculado en comparación con el control después de 30 días ($p = 0,018$ y $0,020$). El género *Klebsiella*, perteneciente al orden Enterobacterales, mostró una abundancia significativamente menor ($p = 0,002$) en los ensilados tratados con las BAL ($1,237 \pm 0,422\%$) en comparación con las muestras control ($3,885 \pm 0,471\%$) después de 30 días.

Dentro de la clase Bacilli, el orden Lactobacillales aumentó, su abundancia con la inoculación de $1,52 \pm 0,46$ a $8,89 \pm 3,09 \%$ ($p = 0,015$). Este orden incrementó su abundancia relativa con el progreso de la fermentación en ambos ensilajes, siendo las diferencias significativas entre los inoculados y los controles en cada punto de muestreo. Ya a los 3 días la abundancia relativa en el control fue $64,33 \pm 4,87\%$ y $83,27 \pm 4,99\%$ en inoculado, con un $p = 0,009$. Al tiempo final del ensayo, las abundancias fueron aún mayores: $81,61 \pm 2,06\%$ en el control y $91,77 \pm 1,97 \%$ en las muestras tratadas ($p = 0,003$). Por otro lado, dentro de esta misma clase, no hubo diferencias en la abundancia de Bacillales cuando se comparó entre control e inoculado, siendo menor a $0,10$ ya a los 3 días.

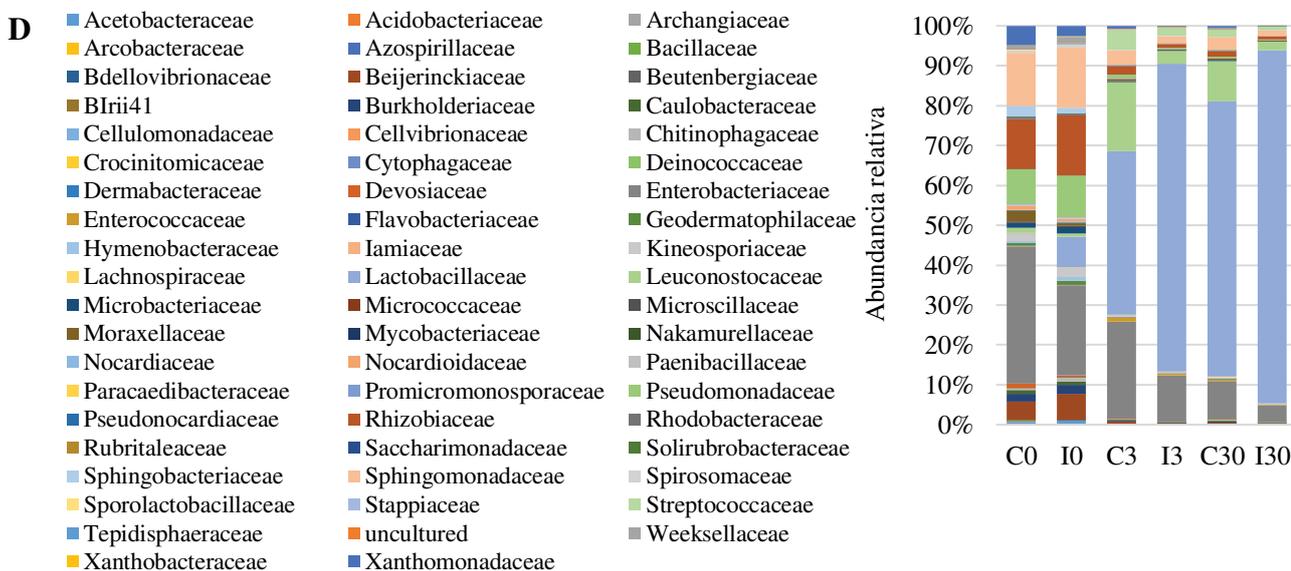
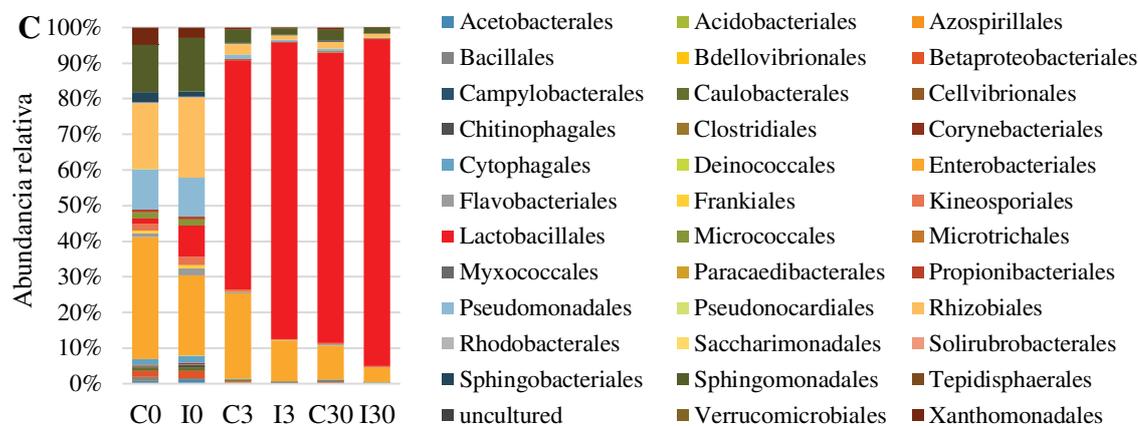
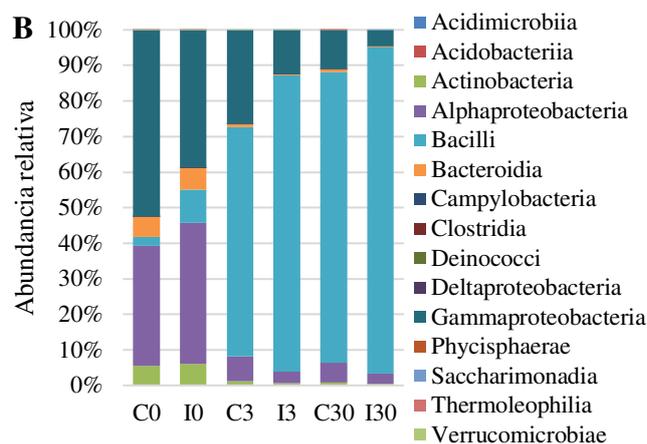
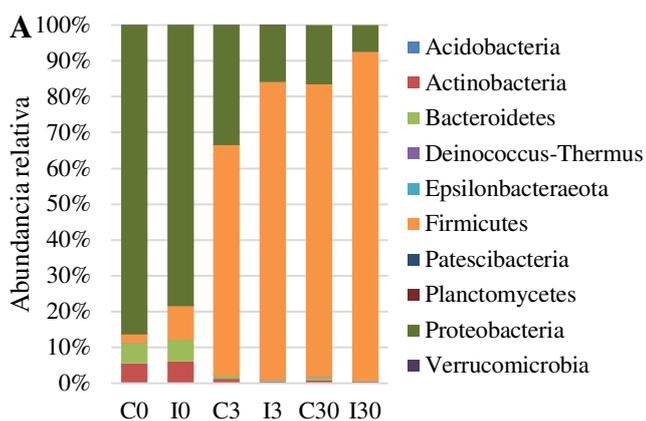
En general, las familias predominantes en el material de partida fueron Enterobacteriaceae ($23-33\%$), Sphingomonadaceae ($13-15\%$), Rhizobiaceae ($13-15\%$),

Pseudomonadaceae (9-11%), Beijerinckiaceae (5-6%) y Xanthomonadaceae (3-4%) (Fig. 21D). Con la fermentación, las abundancias relativas de todas estas disminuyeron, siendo los valores estimados para las tres últimas menores al 1% ya a los 3 días. Particularmente, Enterobacteriaceae fue más abundante en el control ($9,58 \pm 2,74\%$) al día 30, con un valor $p = 0,031$ al compararlo con el ensilaje inoculado ($4,16 \pm 0,88$). Por otro lado, Lactobacillaceae tuvo una abundancia muy baja ($<0,1\%$) en el sorgo fresco sin inocular, la cual aumentó a $7,74 \pm 2,76\%$ con la inoculación. Al tercer día de fermentación, se convirtió en la familia más abundante, alcanzando valores de $40,93 \pm 0,94 \%$ en control y casi el doble ($77,32 \pm 3,00\%$) en inoculado. Estas abundancias fueron aún mayores a los 30 días, con $69,09 \pm 2,25$ en control y $88,55 \pm 2,27\%$ en tratado. Asimismo, Leuconostocaceae se convirtió en una de las familias más abundantes al día 30, junto con Lactobacillaceae y Enterobacteriaceae, aunque su abundancia fue baja al principio (1% aproximadamente). Sus valores alcanzaron unos $17,28\%$ en control a los 3 días y $3,18\%$ en inoculado, y a los 30 días los valores fueron de $10,16$ y $2,16\%$, respectivamente.

Dentro la familia Lactobacillaceae, ya a nivel de género, tanto el control como los ensilados tratados mostraron una rápida predominancia de *Lactobacillus* a los 3 días, lo que también ocurrió a los 30 días (Fig. 21E). El control tuvo un valor estimado bajo al principio ($0,057 \pm 0,029 \%$), el cual se incrementó a $40,20 \pm 0,92$ y $68,41 \pm 2,30\%$ luego de 3 y 30 días, respectivamente. Por otro lado, la inoculación aumentó la abundancia relativa de esta población al inicio ($p = 0,043$), siendo $6,39 \pm 2,31\%$ su valor previo a la fermentación. En los tiempos de muestreo siguientes, la abundancia de *Lactobacillus* fue mayor en inoculados *versus* control, con valores de $73,54 \pm 1,78 \%$ ($p = 0,000$) y $86,38 \pm 2,23 \%$ ($p = 0,001$) a los 3 y 30 días, respectivamente. La inoculación también incrementó el nivel inicial de *Pediococcus*, desde $0,01 \pm 0,01$ en el control, a $1,36 \pm 0,45\%$ en tratado, con un $p = 0,035$. La abundancia relativa de este género se mantuvo más alta en los siguientes puntos de muestreo en el ensilaje inoculado con respecto al control, con valores máximos de $0,73 \pm 0,03\%$ (control) y $3,78 \pm 1,29\%$ (inoculado) y un $p = 0,015$ a los 3 días. A los 30 días los niveles se mantuvieron y también la diferencia entre ambos ensilajes ($p = 0,001$). Todos los taxones pertenecientes a *Pediococcus* fueron asignados como *P. pentosaceus* y *Pediococcus* sp. Dentro de la familia Leuconostocaceae, el género Leuconostoc no sufrió cambios significativos en su abundancia relativa por la inoculación previo a la fermentación, encontrándose en niveles de $0,01$ aproximadamente. Asimismo, su abundancia relativa fue significativamente mayor en el control, en contraste con el inoculado, en ambos tiempos de muestreo. Sus valores fueron de $0,60 \pm 0,11$ en control y $0,085 \pm$ en inoculado a los 3 días ($p = 0,001$), y $0,35 \pm 0,05$ en control y $0,05 \pm 0,03$ en inoculado a los 30 días ($p = 0,001$). Además, el género Weisella, también tuvo mayor abundancia en el control en comparación al ensilaje inoculado, tanto a los 3 como a los 30 días. Los valores de este fueron de $16,69 \pm 3,60$ (control) y $3,09 \pm 0,97\%$ (inoculado) a los 3 días con $p = 0,003$, y $9,80 \pm 0,88$ (control) y $2,11 \pm 0,15\%$ (inoculado) a los 30 días con $p = 0,000$.

A nivel especie, dentro del género *Lactobacillus*, las OTUs asignadas a *L. plantarum* no se detectaron en el material de partida sin inocular, mientras que la abundancia relativa en el sorgo fresco inoculado fue de $0,739 \pm 0,329$ %. Luego de 3 días, su abundancia aumentó en ambos ensilajes, siendo mayor en el inoculado ($25,94 \pm 0,75$ %) que en control ($2,93 \pm 0,08$ %) ($p = 0,000$). A los 30 días, los valores fueron $26,70 \pm 1,59$ % en el inoculado y $5,34 \pm 0,04$ % en el control ($p = 0,000$). Asimismo, *L. paracasei* no fue detectado en el material fresco y la inoculación elevó su abundancia a $2,84 \pm 0,76$ %. Al cabo de 3 días, la abundancia de estos OTUs fue de $0,01 \pm 0,01$ % en el control y $0,95 \pm 0,42$ % en el inoculado ($p = 0,011$). En el último tiempo de muestreo sus valores fueron $0,01 \pm 0,01$ % en el control y $6,00 \pm 1,46$ % en el inoculado ($p = 0,000$). *L. xiangfangensis*, no detectado en el sorgo previo a la fermentación, tuvo abundancias relativas de $0,10 \pm 0,03$ % (control) y $0,31 \pm 0,13$ % (inoculado) a los 3 días, y $0,20 \pm 0,02$ (control) y $1,28 \pm 0,25$ % (inoculado) a los 30 días, con $p = 0,001$ y $0,000$, respectivamente. Por otro lado, las especies *L. dextrinicus*, *L. modestisalitolans*, *L. namurensis*, *L. nantensis*, *L. odoratitofui*, *L. paralimentarius*, *L. pentosus*, *L. senmaizukei*, y *L. spicheri*, no fueron detectadas en el sorgo fresco (sin inocular e inoculado), sin embargo, su abundancia aumentó luego de 3 días solo en el control, con valores menores a 1%. Un comportamiento similar se observó a los 30 días, siendo las abundancias esta vez menores a 0,2% en el control, excepto para *L. nantensis* el cual tuvo valores de $1,77 \pm 0,18$ % en el control y $0,06 \pm 0,04$ % en el inoculado ($p = 0,000$). Los OTUs asignados a *Lactobacillus* sp. mostraron un aumento significativo ($p = 0,000$) al inocular el material, desde $0,06 \pm 0,03$ % a $2,15 \pm 0,96$ %. Luego de 3 días las OTUs asignadas tuvieron valores de $34,42 \pm 0,59$ % (control) y $44,25 \pm 1,34$ % (inoculado) con $p = 0,001$. Finalmente, a los 30 días, la abundancia de estos OTUs fue mayor en el control ($58,93 \pm 2,39$ %) versus inoculado ($47,68 \pm 1,74$ %) con $p = 0,009$.

La clase Actinobacteria estuvo compuesta principalmente por los órdenes Corynebacteriales, Frankiales, Kineosporiales, Micrococcales, Propionibacteriales y Pseudonocardiales. Frankiales fue la única clase que mostró diferencias significativas en la abundancia entre las muestras inoculadas y control después de 3 días ($p = 0,044$). Algunas OTUs asignadas a Actinobacteria (Corynebacteriales, Frankiales, Propionibacteriales) disminuyeron su abundancia relativa con el tiempo hasta un nivel inferior a 0,10 después de 30 días, y Pseudonocardiales ya no se detectó a los de 3 días. La máxima abundancia al final del experimento fue del 0,30 al 0,39% (Kineosporiales). El orden Chitinophagales (clase Bacteroidia) no mostró diferencias significativas entre las muestras de control y las inoculadas a lo largo de los tiempos de muestreo, mientras que las abundancias relativas de Cytophagales y Flavobacteriales fueron significativamente menores en los ensilados inoculados, en comparación con las muestras control, después de 3 días ($p = 0,001$ y $p = 0,033$; respectivamente).



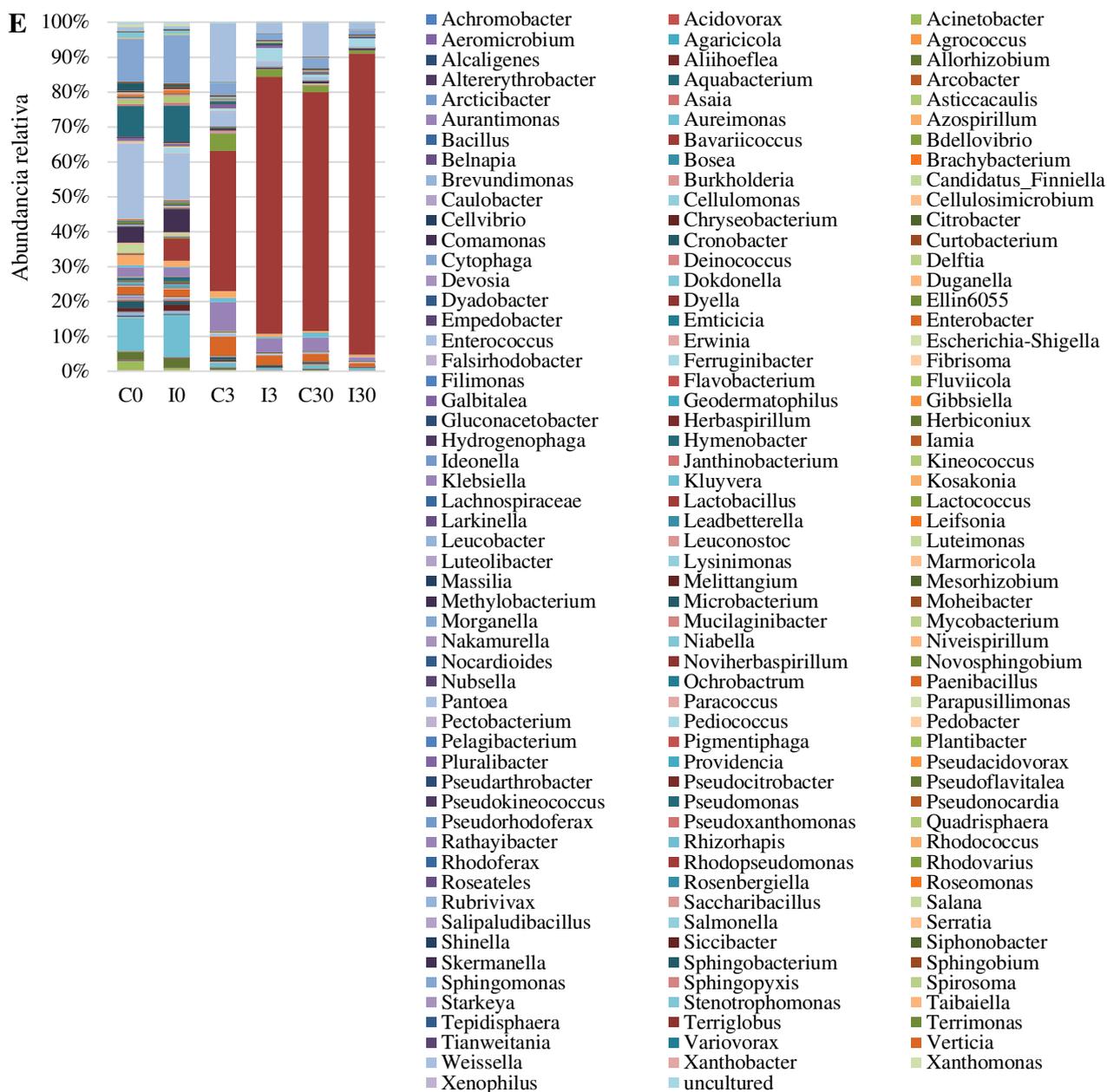


Figura 21 – Cambios en la composición bacteriana de silos de sorgo control (C) e inoculado (I) con *L. plantarum* LpAv, *L. paracasei* LcAv y *P. pentosaceus* PpM1, antes (0) y luego de 3 y 30 días de fermentación. Abundancia relativa del gen 16S ARNr a nivel A) Filo, B) Clase, C) Orden, D) Familia y E) Género.

4.3 Citometría de flujo

Se utilizó citometría de flujo, además del recuento total de BAL en medios agarizados, para determinar las subpoblaciones de bacterias viables, dañadas y no viables, presentes en los ensilados. Esta metodología se llevó a cabo usando una combinación de dos tinciones para distinguir las subpoblaciones bacterianas. Mientras que el TO penetra en todas las células y genera una señal de fluorescencia verde, el PI penetra sólo en aquellas con membranas dañadas o comprometidas, desplazando al TO y generando una señal de fluorescencia roja, relacionada con la extensión del daño. Se observaron tres zonas distinguibles 1) población de células intactas/altamente viables (TO+, PI-), 2) población no viable/altamente dañada o permeabilizada (TO-, PI+) y 3) células permeabilizadas/dañadas con capacidad de crecimiento o reproducción dudosa (TO+, PI+). Los porcentajes de las diferentes poblaciones celulares se muestran en la figura 22. Se observó un nivel muy alto de células dañadas en todos los ensilajes en cada tiempo de muestreo (> 80 %). Asimismo, a los 30 días de fermentación, en el control se detectó un porcentaje de células muertas de aproximadamente 10-20 veces mayor que en los dos primeros puntos de muestreo, mientras que en los ensilados inoculados, el porcentaje de células no viables fue alrededor de 5 veces más en comparación con los tiempos de muestreo anteriores. Se observaron diferencias significativas entre los ensilados control y los inoculados luego de 3 días de fermentación. En este tiempo, el nivel de células vivas fue significativamente mayor en el ensilado inoculado ($11,30 \pm 4,45\%$) en comparación con el control ($2,98 \pm 1,58\%$).

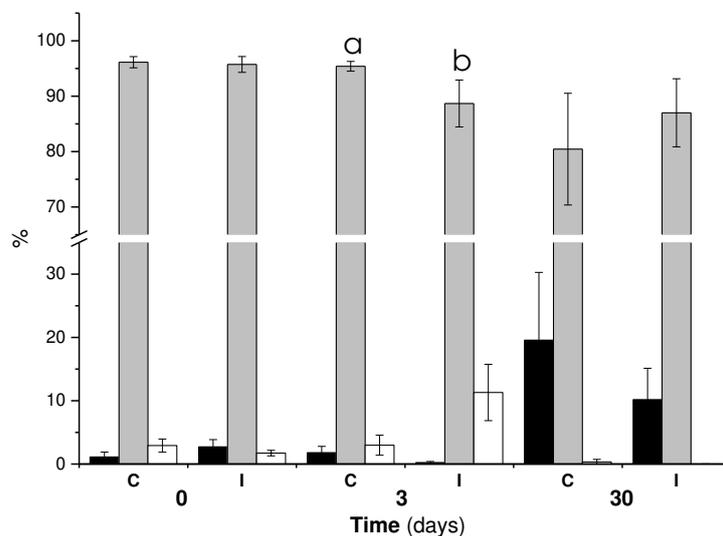


Figura 22 - Porcentaje de células bacterianas detectadas por citometría de flujo para cada una de las regiones: no viables (■), dañadas (■) o viables (□). Diferentes letras sobre cada barra, en cada tiempo de muestreo, indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre muestras control e inoculada.

4.4 Ensayo de sobrevida a la infección por *Salmonella*

Se monitoreó la sobrevida, tras de la infección oral por *Salmonella*, de ratones que habían recibido agua de canilla, o extracto acuoso de sorgo fresco, ensilado de sorgo control (fermentación espontánea por 30 días) o ensilado de sorgo inoculado con *Lactobacillus plantarum* LpAv, *Lactobacillus paracasei* LcAv y *Pediococcus pentosaceus* PpM (fermentado por 30 días). El ensayo se continuó hasta que no se observó ninguna muerte durante tres días consecutivos en cada grupo experimental (Fig. 23). Más del 50% de los animales que recibieron ensilaje control o inoculado sobrevivieron a la infección, mientras que el 30%, o menos, de los animales control (agua de canilla o sorgo sin fermentar) sobrevivieron a la infección. Sin embargo, estas diferencias en la sobrevida de animales que recibieron ensilaje y los que no, no fueron estadísticamente significativas ($p = 0,370$).

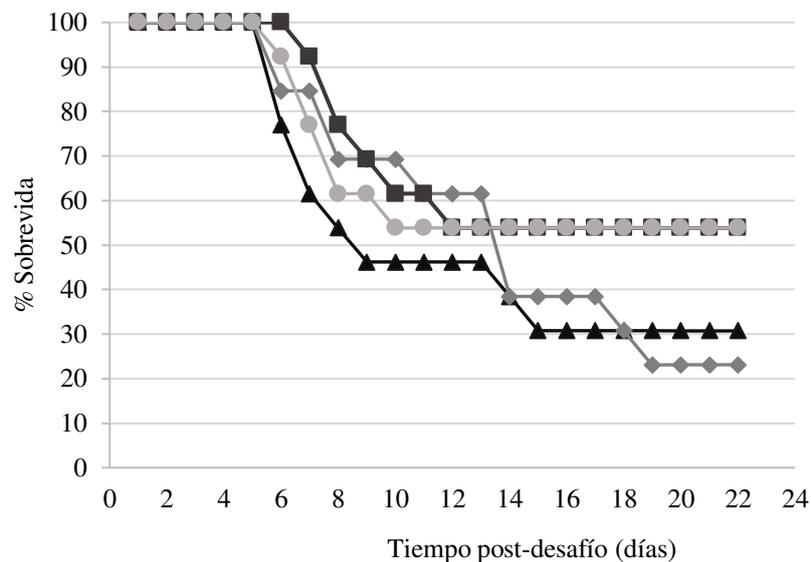


Figura 23 – Sobrevida luego de la infección con *Salmonella* Typhimurium en ratones que recibieron agua de canilla (▲), sorgo fresco sin inocular (◆), ensilaje inoculado (●) o no inoculado (control) (■), durante 10 días previos al desafío.

5. DISCUSIÓN

El ensilado es un método eficiente para la conservación de forrajes, el cual ha sido utilizado a lo largo de los años en muchas regiones geográficas. Existen disponibles numerosos aditivos que favorecen un ensilado de calidad, los cuales pueden agruparse en categorías como: inoculantes de BAL homofermentantes, BAL heterofermentantes obligadas, combinaciones de BAL heterofermentantes y homofermentantes obligadas, productos químicos como ácidos orgánicos, enzimas, y combinaciones de todos los anteriores [62]. La utilización de BAL como inoculantes, implica la capacidad de estas para dominar el proceso de fermentación. Para esto, las BAL añadidas deben superar rápidamente las actividades metabólicas de la microbiota epífita, llevando a cabo la fermentación láctica, con el fin de evitar o minimizar otras actividades microbianas no deseadas o deteriorantes. Entre los factores que influyen en el éxito del ensilaje, la composición química y microbiológica del material a ensilar puede ser muy variable, siendo algunos forrajes más adecuados para el proceso. Por ejemplo, el uso de BAL como iniciador puede ser opcional para el maíz [141], pero es muy recomendable para otros cultivos como la alfalfa [142]. El ensilaje de sorgo es una alternativa viable al ensilaje de maíz, en áreas donde la producción de maíz puede ser limitada, debido a la tolerancia del sorgo a la sequía, su eficiencia en el uso del agua y su bajo costo de producción [143]. Las BAL homofermentantes más ampliamente utilizadas como inoculantes son *P. acidilactici* o *P. pentosaceus* y *L. plantarum*, que dominan las primeras etapas del ensilaje disminuyendo rápidamente el pH [141]. En esta parte del estudio se utilizaron tres cepas de BAL aisladas y caracterizadas en la primera parte de este trabajo (capítulo 1), *P. pentosaceus* PpM y *L. plantarum* LpAv, juntos a *L. paracasei* LcAv.

El sorgo ensilado sin la adición de las cepas de BAL (control) se fermentó espontáneamente, lo cual puede ocurrir comúnmente en forrajes con alto contenido de carbohidratos solubles y baja capacidad *buffer*, como lo son el maíz y el sorgo [95]. Según los recuentos, el material de partida tuvo un contenido relativamente alto de BAL epífitas, las que serían responsables del proceso de fermentación. Sin embargo, la adición de LpAv, PpM y LcAv aceleró el proceso, lo cual se vio reflejado en una caída más rápida del pH, conduciendo a un menor riesgo de crecimiento de microorganismos deteriorantes o patógenos [91]. Asimismo, el pH del ensilaje inoculado fue significativamente inferior al del control en cada punto de muestreo posterior. Por otro lado, teniendo en cuenta los parámetros químicos de los ensilados, las BAL añadidas conservaron mejor el contenido de materia seca del forraje.

A lo largo de muchos años, la composición microbiológica de los ensilados ha sido estudiado mediante técnicas clásicas de cultivo. Sin embargo, estas técnicas se limitan a los microorganismos capaces de crecer en los medios de cultivo selectivos/diferenciales. Otras herramientas útiles para estudiar la dinámica bacteriana no han sido extensamente aplicadas aún

en el estudio de ensilajes, como la citometría de flujo, la cual encuentra cada vez más aplicaciones en el campo de la microbiología. En este trabajo, se utilizó esta técnica para analizar la población bacteriana presente en cada ensilaje, discriminando entre subpoblaciones de bacterias viables, dañadas o no viables. La viabilidad celular implica la capacidad de las células de crecer y reproducirse en condiciones determinadas, dependiendo de propiedades y funciones estructurales, metabólicas, fisiológicas y genéticas. Los métodos tradicionales de recuento dependientes de cultivo implican que una célula “viable” de origen a una colonia visible, la cual pueda medirse ópticamente en un medio sólido o líquido. Sin embargo, una célula bacteriana puede carecer de esta capacidad de reproducirse en determinadas condiciones, siendo así una célula que se encuentra en un estado viable pero no cultivable (CVNC) [144]. Dicho estado podría ser adoptado por las células bacterianas como un mecanismo de supervivencia a condiciones adversas, incluso hasta podrían luego recuperar su capacidad de duplicarse bajo condiciones favorables. Esto ha sido en un principio descrito para bacterias GRAM negativas y luego se observó en GRAM positivas [145], [146]. Que las BAL y otros microorganismos puedan entrar en este estado no cultivable, hace que los métodos de cultivo en placa den lugar a una posible subestimación del contenido microbiano en el material ensilado [44]. Aquí radica la importancia de implementar este método para el estudio de los ensilajes que, al menos dentro de nuestros conocimientos, no ha sido utilizado en este tipo de muestras. Este trabajo constituye una primera aproximación a la aplicación de este método en el estudio de este tipo de matrices vegetales complejas, técnicas que poseen un gran potencial para complementar el análisis de poblaciones bacterianas en ensilajes. En las muestras analizadas, las bacterias dañadas representaron la proporción más alta de las tres subpoblaciones, incluso en el material de partida, previo a la fermentación. Este porcentaje tan alto de bacterias dañadas (> 80-90%) podría deberse a las condiciones de estrés que ejerce el ambiente en todas las etapas del proceso de ensilado (temperaturas, disponibilidad de nutrientes antes de la cosecha, manipulación durante la cosecha, disponibilidad de oxígeno, pH, otras).

El método tradicional de recuento en placa ofrece una visión limitada de la diversidad microbiana implicada en el proceso de ensilaje, y de la dinámica de la fermentación a lo largo del tiempo. En los últimos años ha aumentado notablemente el desarrollo de distintas estrategias de secuenciación, conocidas como técnicas de secuenciación de la próxima generación (NGS). Estas técnicas presentan alto rendimiento y producen grandes cantidades de secuencias en un corto tiempo, que permiten la identificación precisa de los taxones microbianos, incluidos los organismos no cultivables y los que se encuentran presentes en pequeñas cantidades. Las técnicas de NGS están revolucionando el campo de la ecología microbiana y se han utilizado para examinar ecosistemas en alimentos [147]. En la última década, las tecnologías de NGS se han aplicado para obtener conocimientos microbianos en varios tipos de ensilajes como maíz [45], [47], [49], [53], [125], [148], alfalfa [46], [50], [54], maíz-sorgo, trigo [55], trébol rojo [57], cebada [56], [149], avena, triticale [48], [51], ryegrass [58], entre otros. De acuerdo a la búsqueda

bibliográfica realizada, el maíz y la alfalfa son los forrajes más estudiados hasta el momento mediante técnicas de NGS, no existiendo informes de dinámica bacteriana en ensilajes de sorgo para alimentación animal. Gallagher et al. [150] realizaron un análisis metagenómico en sorgo dulce ensilado, inoculado con una levadura, para comprender los procesos microbianos subyacentes durante la producción de bioetanol. Este trabajo de Tesis sería uno de los primeros en los que se aplicó NGS en ensilajes de sorgo inoculados con tres cepas de BAL.

La inoculación de *L. plantarum* LpAv, *L. paracasei* LcAv y *P. pentosaceus* PpM1 condujo a un aumento significativo del índice de riqueza del material forrajero, lo que podría explicarse en base a que los taxones asignados a *L. plantarum* y *L. paracasei* y *P. pentosaceus* no se detectaron en el sorgo fresco, aumentando los valores del índice de abundancia relativa con la inoculación ($t = 0$). Asimismo, los OTUs designados como *Lactobacillus* fueron los que más contribuyeron a las diferencias entre las muestras control y las inoculadas, según la prueba SIMPER. Uno de los índices más utilizados para cuantificarla diversidad alfa es la riqueza, la cual se define como el número de especies diferentes presentes en un medio [151]. En el control, el índice de riqueza Chao1 se mantuvo sin cambios significativos a lo largo del proceso de ensilado, mientras que el mismo disminuyó en las muestras tratadas, en el día 3 y 30 de fermentación, lo que sugiere que las pocas especies inoculadas fueron capaces de dominar la fermentación, superando a la microbiota epífita. Esto concuerda con lo informado por Bao et al. [46] para ensilajes de alfalfa, donde las especies más predominantes en los ensilajes fueron las que componían el aditivo utilizado para el ensilaje.

El dominio de la fermentación por las BAL utilizadas se confirmó además por el índice de diversidad (Shannon), el cual tiene en cuenta tanto el número de especies presentes como sus abundancias relativas, es decir, contempla la riqueza y la abundancia. Aunque al principio la inoculación no generó cambios significativos en la muestra, este índice se redujo en los tiempos de muestreo siguientes, disminuyendo en mayor medida en ensilados tratados. Esto coincide con lo informado por Ogunade et al. [47], donde el análisis de la diversidad reveló una comunidad bacteriana menos diversa en el ensilado de maíz inoculado con *L. plantarum*, y con el estudio de Liu et al. [56] donde el ensilaje tratado con BAL (*L. plantarum*, *L. casei* y *L. buchneri*) disminuyó la diversidad bacteriana durante el ensilaje de cebada. En general, un ensilaje bien conservado se caracteriza por poseer una menor diversidad bacteriana con una abundancia de BAL > 90%, mientras un ensilaje de mala calidad posee un microbioma altamente diverso y con baja abundancia de BAL (< 5%) [55]. Cabe destacar que el género *Lactobacillus* comprendió el $68,4 \pm 2,3 \%$ y el $73,5 \pm 1,8 \%$ de la abundancia relativa en el día 30, en los ensilados control e inoculado, respectivamente, mostrando su capacidad para dominar la fermentación y convertirse en el género prevalente. Los resultados obtenidos en este trabajo concuerdan además con los de Eikmeyer et al. [52], quienes observaron que la proporción de bacterias pertenecientes al filo

Proteobacteria en el ensilaje de pasturas inoculado disminuyó, con una mayor abundancia de lactobacilos.

Es conocido que un ensilaje mal conservado o contaminado puede constituir una fuente de microorganismos patógenos, los cuales pueden reducir el rendimiento de la producción animal, afectar la seguridad y calidad de los alimentos de origen animal derivados y comprometer la salud tanto animal como humana. Un correcto manejo del material a ensilar, el control del proceso de fermentación y del silaje luego de la apertura, son fundamentales para evitar el desarrollo de patógenos como *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Clostridium spp*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus spp*. De aquí una de las razones más importantes del uso de inoculantes para reducir o inhibir el desarrollo de los mismos por una rápida acidificación del pH o por la producción de compuestos de inhibición como bacteriocinas [152]. *Klebsiella pneumoniae* es un patógeno oportunista perteneciente al filo Proteobacteria. Se trata de un agente causante de mastitis bovina, que puede encontrarse en muestras ambientales de las explotaciones lecheras, como heces, material de las camas y piensos. En un trabajo reciente, Cheng et al. [153] informaron que el 50% del total de *K. pneumoniae* fue detectado en el alimento (alfalfa, heno de avena, ensilado de maíz y concentrados) durante un brote de mastitis en una granja lechera china. Por su parte, Podder et al. [154] informaron que *Klebsiella variicola*, que suele encontrarse en el suelo y en el alimento, puede ser otra bacteria causante de mastitis. En este trabajo, los ensilados inoculados con BAL presentaron una abundancia relativa menor tanto de *K. pneumoniae* como de *K. variicola* a los 30 días de ensilado. La disminución de la prevalencia de este patógeno podría tener un efecto positivo en el control de la infección al reducir la exposición de los animales a estas bacterias [155]. Por otro lado, silos deteriorados presentan mayor abundancia de Enterobacteriaceae [55]. En este trabajo, el contenido relativo de OTUs asignados a esta familia, fueron aproximadamente la mitad en el material inoculado que en el control ya a los 3 días de fermentación, relación que se mantuvo hasta el tiempo final.

Además de su papel como iniciadores para llevar a cabo una fermentación adecuada, pueden usarse cepas específicas de BAL como probióticos y/o postbióticos. Un probiótico es un microorganismo vivo que cuando se administra en cantidades adecuadas confiere un beneficio para la salud del huésped [156], mientras que un postbiótico es una preparación de microorganismos inanimados y/o sus componentes que confiere un beneficio para la salud del huésped [124]. Asimismo, los alimentos fermentados fueron definidos como alimentos elaborados mediante el desarrollo microbiano deseado y conversiones enzimáticas de los componentes de un alimento [157]. Así, el ensilaje puede ser considerado como un alimento fermentado para el ganado. Por esto, considerando tanto el contenido de microorganismos viables, como también el de bacterias no viables (como se detectó por citometría de flujo) y los metabolitos producidos durante la fermentación, un ensilado puede ser considerado como una fuente de microorganismos y metabolitos con potenciales efectos tipo probióticos y postbióticos. Es por

esto que los ensilados merecen una mayor exploración como un potencial alimento funcional para el ganado. Existen varios informes sobre la capacidad probiótica de las BAL aisladas de diferentes ensilajes [66], [158], [159]. Sin embargo, los potenciales beneficios del propio ensilado para la salud fueron menos estudiados. El modelo de infección por *Salmonella* es un modelo animal adecuado para una primera aproximación para determinar el potencial inmunoestimulador de las BAL o sus productos fermentados [160]. En este estudio, la administración de un extracto acuoso de sorgo fermentado, ya sea fermentado espontáneamente (control) o inoculado con BAL, mostró una tendencia a conferir una mayor protección contra la infección por *Salmonella*, sin embargo, la diferencia en comparación con los grupos de control no fue significativa (50% vs 30% de supervivencia). En trabajos previos se observó que, una vez con esta tendencia, estudios posteriores donde se aumentó el número de animales por grupo, permitieron que esas tendencias se convirtieran en diferencias significativas, lo cual sugiere un potencial funcional del sorgo fermentado que merecería estudios futuros [6].

6. CONCLUSIONES

El uso de las cepas de BAL *L. plantarum* LpAv, *L. paracasei* LcAv y *P. pentosaceus* PpM1 como inoculantes o cultivos iniciadores en ensilajes de sorgo garantizó la fermentación adecuada del forraje, disminuyendo más rápidamente los valores de pH y conservando mejor la materia seca, con respecto al ensilaje fermentado espontáneamente. El uso de la citometría de flujo en el estudio de subpoblaciones bacterianas en silos de sorgo, permitió observar un gran porcentaje de células dañadas en el material, lo cual podría llevar a una subestimación por recuento convencional en placa de la población microbiana, resaltando la importancia de una posible complementación con este método. Por otro lado, el uso de la secuenciación masiva del gen 16S ARNr por NGS o *metaprofiling* permitió observar que el género *Lactobacillus* fue capaz de dominar el proceso en los primeros días de fermentación, principalmente en el material inoculado. Además, la adición de las BAL disminuyó la carga de potenciales patógenos del género *Klebsiella* en el ensilado, reduciendo así la posibilidad de que estos se multipliquen en los ambientes donde se alimenta al ganado y sus posibles efectos negativos sobre la salud animal. Por último, no se observó un efecto significativo en el aumento de la sobrevivencia a la infección de los ratones que recibieron el ensilaje fermentado, aunque sí se pudo observar una tendencia favorable, dejando abierta la posibilidad de un nuevo ensayo aumentando el tamaño de la muestra.

CAPÍTULO 3

SELECCIÓN DE BACTERIAS LÁCTICAS CON POTENCIAL PROBIÓTICO MEDIANTE ENSAYOS *IN VITRO*, TECNOLÓGICOS E *IN VIVO* SUCESIVOS

1. INTRODUCCIÓN

Las BAL constituyen un grupo filogenético altamente heterogéneo que está presente en múltiples ecosistemas, incluyendo plantas, alimentos y el tracto gastrointestinal de vertebrados e invertebrados [161]. A partir de estos ecosistemas, las BAL pueden ser aisladas y caracterizadas para el desarrollo de cultivos con importancia funcional y/o tecnológica, tal como inoculantes de ensilajes para alimentación animal, cultivos iniciadores para la elaboración de alimentos fermentados o como probióticos en alimentos o suplementos. Para el desarrollo de estos cultivos, el uso de cepas de origen local suscita un interés especial. Por un lado, las diferencias en la composición de la microbiota intestinal de personas de distintas regiones geográficas con necesidades nutricionales y sanitarias específicas podrían establecer criterios de selección particulares. Por otro lado, la sobrevida en matrices alimentarias de relevancia y aceptación local, la disponibilidad de cepas de origen local y de herramientas tecnológicas para su producción son otros factores de relevancia. Todo esto genera un entorno favorable para la explotación de cepas autóctonas [162]. Los alimentos fermentados han sido recientemente redefinidos como “*alimentos elaborados mediante el desarrollo microbiano deseado y las conversiones enzimáticas de los componentes de los alimentos*” [14]. Estos alimentos aún constituyen una parte importante de la dieta en los países en desarrollo, en Medio Oriente y Asia. En las poblaciones occidentales, a excepción de los más comunes como yogures y quesos, el consumo de alimentos fermentados ha disminuido gradualmente con el tiempo. Sin embargo, existe un interés renovado, impulsado principalmente por los posibles beneficios percibidos sobre la salud, siendo vehículos tanto de microorganismos como de metabolitos que promueven la salud [22]. En particular, los alimentos fermentados *plant-based* pueden ser fuentes para el aislamiento y caracterización de nuevas cepas, con potencial para su aplicación como probióticos adjuntos, como cultivos iniciadores, o ambos [68], [163]. Estos alimentos ofrecen una alternativa para las personas que no consumen lácteos. Los productos lácteos fermentados, especialmente las leches fermentadas, han sido el estándar de oro para el suministro de probióticos en productos en los que los cultivos probióticos se adicionan principalmente como cultivos adjuntos, siendo la fermentación de la leche llevada a cabo por los cultivos iniciadores tradicionales del yogur [164]. En la primera parte de este trabajo de tesis se obtuvieron 129 aislados de BAL a partir de alfalfa, maíz, sorgo, ryegrass, arroz, cebada, *Gatton panic*, *Melilotus albus*, soja, trébol blanco, trigo, girasol, avena y moha fermentados espontáneamente (capítulo 1). En esta parte del trabajo, nos propusimos seleccionar cepas de BAL con probables efectos antiinflamatorios, capaces de inducir la producción de IL-10, para el desarrollo de alimentos fermentados *plant-based* con potencial probiótico.

2. OBJETIVOS

- ✓ Seleccionar cepas con potencial antiinflamatorio a partir de la colección de cepas obtenidas en la primera parte del trabajo de Tesis Doctoral.
- ✓ Estudiar la *performance* de BAL en el desarrollo de alimentos vegetales fermentados a base de avena o zanahoria.
- ✓ Estudiar la capacidad promotora de la salud intestinal de BAL aisladas a partir de sustratos vegetales.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Bacterias lácticas

Un total de 50 aislamientos de BAL fueron utilizados, de los cuales 48 fueron obtenidos a partir de distintos vegetales en la primera parte de este trabajo de Tesis (Tabla 4 – cap. 1): *Lactobacillus plantarum* LpAv, LpA1, LpA3, LpSF1, LpML1, LpM0, LpM5, LpM7, LpM12, LpM15, LpM18, LpM21, LpM23, LpM24, LpRY1, LpS3, LpS4, LpS7, LpM11, LpS12, LpS13, LpWC1, LpW1, *Lactobacillus paracasei* LcAv, LpaM1, *Levilactobacillus brevis* LbAv, LbB2, LbM1, LbM6, LbM17, LbRy1, LbSY1, LbS1, *Lactobacillus fermentum* LfRi, LfM2, LfM4, LfSY1, LfSY2, *Lactobacillus rhamnosus* LrM1, *Leuconostoc pseudomesenteroides* LeuW1, *Pediococcus acidilactici* PaA1, PaA2, PaSy1, *Pediococcus pentosaceus* PpA1, PpML1, PpM1, PpM2, PpM3. Además, se estudiaron *Lactobacillus buchneri* Ls141 [76], y 463 (cedida por el Dr. Juan Martín Oteiza). Estos 50 aislamientos son parte de la colección de cultivos del INLAIN, mantenido a -70 °C. Para su uso, las BAL fueron cultivadas dos veces sucesivas en caldo MRS e incubadas a 35 °C en aerobiosis.

3.2 Co-cultivo de BAL con macrófagos murinos

3.2.1 Línea celular y condiciones de co-cultivo

Esta parte del trabajo fue realizada en el *Functional Foods Forum* de la Facultad de Medicina de la Universidad de Turku (Turku, Finlandia), gracias a una beca de movilidad Erasmus y la colaboración del Prof. Seppo Salminen. El ensayo fue realizado según Jorjão et al. [165]. La línea celular de macrófagos murinos RAW 264.7 (ATCC® Number: TIB-71™, LGC Standards [ATCC], Middlesex, Reino Unido) se cultivó en medio completo de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) compuesto por 4,5 g/l de Glucosa, L-glutamina y sin piruvato de sodio (Gibco, Life Technologies, Estados Unidos), suplementado al 10 % (v/v) con suero fetal bovino inactivado por calor (FBS, Gibco, Life Technologies, Estados Unidos) y 10 % (v/v) de una solución de antibióticos (Penicilina, 10.000 U/ml y Estreptomina, 10.000 µg/ml, Gibco, Life Technologies, Estados Unidos). Las células (pase 7) fueron crecidas hasta alcanzar un 80 % de confluencia (7 días) en frascos para cultivo celular de 75 cm² (T75), en atmósfera húmeda con 5 % de CO₂, renovando el medio de cultivo cada 2 días. Luego, se cosecharon por adición de Tripsina (0,25 % Tripsina-EDTA, Gibco, Life Technologies, Estados Unidos), raspado suave con espátula de goma y 2 pulsos cortos de centrifugación. El recuento de células viables se realizó en cámara de Neubauer utilizando azul tripán (0,5 % (v/v), Sigma-Aldrich, St. Louis, Estados Unidos).

Para los co-cultivos, se distribuyeron 10^5 células de macrófagos/pocillo en microplacas de 24 pocillos. Las placas se incubaron durante 18 horas ($37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5% de CO_2) para permitir la adhesión de los macrófagos al pocillo. Se eliminó el sobrenadante y las células adheridas se lavaron dos veces con PBS estéril. Luego, se añadieron $500\text{ }\mu\text{l}$ de DMEM fresco suplementado con 10% de suero fetal bovino (sin antibióticos). En paralelo, se centrifugaron ($6000\text{ }xg$, 10 min , $4\text{ }^{\circ}\text{C}$) los cultivos *overnight* de las BAL (18 h , $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, MRS), se lavaron dos veces con PBS ($\text{pH } 7,4$) y se resuspendieron en DMEM suplementado con suero bovino fetal al 10% (v/v), sin antibióticos). Las BAL se añadieron a los pocillos en una proporción de macrófagos:bacterias de $1:100$, y el volumen se llevó a 1 ml final con DMEM (suero bovino fetal al 10% , sin antibióticos). Se utilizó un control de activación tratado con LPS (lipopolisacárido de *Escherichia coli* O55:B5, $0,1\text{ }\mu\text{g/ml}$; eBioscience) y un control no tratado que no fue puesto en contacto con las BAL. El co-cultivo se incubó durante 8 h a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ con un 5% de CO_2 . Finalmente, se recogieron los sobrenadantes, se centrifugaron ($6000\text{ }xg$, 10 min y $4\text{ }^{\circ}\text{C}$) para eliminar las células y se almacenaron congelados ($-70\text{ }^{\circ}\text{C}$) para la cuantificación de citoquinas.

3.2.2 Cuantificación de IL-10

La concentración de IL-10 en los sobrenadantes de los co-cultivos celulares fue determinada mediante ELISA usando el kit comercial “BD OptEIA Set Mouse IL-10” (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, Estados Unidos), según las instrucciones del fabricante.

3.2.3 Determinación de citoquinas mediante análisis multiplex

En base a la capacidad de inducir la producción de IL-10, los sobrenadantes con mayores concentraciones de la misma fueron seleccionados para la determinación de IL- 1β , IL-12p70, IL-2, IL-6, IL-10, interferón (INF)- γ y factor de necrosis tumoral (TNF)- α , mediante análisis multiplex. La cuantificación se llevó a cabo utilizando el kit “Bio-PlexTMPro Mouse Cytokine Th1 7-Plex Panel” (Bio-Plex[®] Assays, Bio-Rad, CA, Estados Unidos), siguiendo las instrucciones del fabricante. Las mediciones se realizaron en un sistema LuminexTM 200TM, usando el *software* xPonent 4.3 (Lumine x, s-Hertogenbosch, Países Bajos, <https://www.luminexcorp.com>).

3.3 Producto fermentado en base a avena

3.3.1 Fermentación de avena con *L. plantarum* LpAv

Se preparó una suspensión al 10% (p/v) de avena instantánea comercial (Quaker Oats Company), adicionada con sacarosa $0,5\%$ (p/v) (Cicarelli) y pectina $0,5\%$ (p/v), homogeneizada con homogeneizador Ultraturrax (modelo T25, IKA, Alemania). La suspensión se trató

térmicamente a 90 °C por 10 min en baño de agua termostatzado. Posteriormente, cuando la suspensión alcanzó la temperatura de 37 °C, se inoculó al 0,1 y 1 % (v/v) con un cultivo *overnight* (18 h, 37 °C, MRS) de *L. plantarum* LpAv (concentración del cultivo utilizado para inocular: $\log_{10} \text{ufc/ml} = 9,33 \pm 0,06$). Una vez inoculada, la suspensión de avena se transfirió a tubos Falcon de 50 ml y se incubó a 37 °C durante 18 h. Luego, la avena fermentada se conservó a 4 °C durante 21 días. Los análisis microbiológicos y determinaciones de pH se realizaron al inicio ($t = 0$), luego de las 18 h de fermentación, y a los 8, 16 y 21 días de almacenamiento refrigerado. Los recuentos de BAL totales se realizaron en MRS agar (Biokar) (37 °C, 48 h, aerobiosis) y hongos y levaduras fueron contados en Glucosa Cloranfenicol agar (Biokar, Francia) (25 °C, 7 d, aerobiosis).

Se realizó además un segundo ensayo, en el cual se utilizó la tasa de inoculación al 1 % (v/v) de LpAv, para estudiar la influencia del tiempo de incubación sobre la fermentación: 20, 24 y 28 h. Las condiciones de incubación, análisis microbiológicos y determinación de pH fueron las mismas que las descritas anteriormente en esta sección.

3.3.2 Caracterización reológica del producto de avena fermentado con *L. plantarum* LpAv

Se determinó la viscosidad de las muestras de avena fermentada I1, I2 (inoculadas al 0,1 y 1,0 % (v/v), respectivamente) y C (control no inoculado) en función de la velocidad de corte mediante una prueba tixotrópica, utilizando un viscosímetro de cilindros concéntricos Rheolab QC (Anton Paar, Alemania), equipado con módulo C-LTD80/QC y un sistema sensor CC27. Los ensayos se realizaron por duplicado a temperatura controlada ($10,0 \pm 0,5$ °C). La velocidad de corte fue variable desde 0 a 200 s^{-1} . Se registraron los esfuerzos de corte a velocidades de corte crecientes (curvas de flujo ascendente), seguido por velocidades de corte decrecientes (curvas de flujo descendente). El comportamiento tixotrópico de las muestras se calculó mediante el área de histéresis (Pa s^{-1}), determinada como la diferencia entre el área bajo las curvas de flujo ascendente y descendente (Origin 8.0; OriginLab Corp., Northampton, Estados Unidos). Se utilizaron los modelos Casson y Herschel-Bulckey para ajustar los datos. La viscosidad aparente (η_{app}) se calculó a 50, 100, 150 y 200 s^{-1} .

Se realizó un análisis de perfil de textura por compresión (TPA) de acuerdo a lo descrito por Seleet et al. [166], utilizando un equipo de ensayo universal (INSTRON Corp., modelo 3344, Norwood, MA, Estados Unidos). Las muestras I1, I2 y C, se colocaron en cilindros de 6 cm de alto y 4,5 cm de ancho, y se realizaron dos ciclos de compresión (con 5 s de intervalo) a un nivel de deformación del 30 %, utilizando una sonda cilíndrica de aluminio de 2 cm de diámetro. Se obtuvieron curvas de fuerza-deformación con una célula de carga de 10 N aplicada a una velocidad de cruceta de 1 mm/s, a partir de la cual se cuantificaron los siguientes parámetros: i) Dureza (fuerza máxima en la primera compresión); ii) Adhesividad (área negativa en la curva tras

la primera compresión); iii) Cohesividad (área positiva tras la segunda compresión en relación con el área positiva tras la primera compresión). Cada muestra se ensayó por triplicado.

3.4 Fermentación de zanahoria con *L. plantarum* LpAv

Las zanahorias (*Daucus carota*), obtenidas de un supermercado local, se lavaron y cortaron en rodajas de 3-4 mm de espesor, aproximadamente. Porciones de 50 g de rodajas fueron colocadas dentro de frascos vidrio de 100 ml, cuyo volumen fue completado con una solución de NaCl estéril (1 % (p/v), pH 6,5). Los frascos con las muestras recibieron un tratamiento térmico de 70 °C durante 10 min en baño termostatzado, previo a la inoculación. Cuando los frascos alcanzaron la temperatura ambiente, fueron inoculados con 1 ml de cultivo *overnight* de *L. plantarum* LpAv en caldo MRS (18 h, 37 °C, aerobiosis). Los frascos se cerraron herméticamente y se incubaron a 27 °C durante 24 h. Para el análisis de las muestras, el contenido total de cada frasco se procesó con una licuadora de mano y se filtró con gasa. Los valores de pH, recuentos de BAL totales (MRS agar, 37 °C, 48 h, aerobiosis) y hongos y levaduras (Glucosa Cloranfenicol agar, 25 °C, 7 d, aerobiosis) se determinaron al inicio (t = 0), luego de 24 h de fermentación y luego de 7, 20 y 30 días de almacenamiento a 4 y 25 °C. Se realizaron controles no inoculados.

3.5 Ensayo de sobrevida contra la infección por *Salmonella* Typhimurium

3.5.1 Animales

Se emplearon ratones machos BALB/c, de seis semanas de edad ($20,1 \pm 1,0$ g), provenientes del Centro de Medicina Comparada del Instituto de Ciencias Veterinarias del Litoral (CMC-ICiVet-Litoral, CONICET-UNL), Facultad de Ciencias Veterinarias, UNL (Esperanza, Santa Fe, Argentina). Los animales fueron distribuidos aleatoriamente en cajas plásticas (4-5 ratones/caja) y mantenidos una semana en el bioterio del INLAIN previo al comienzo de las experiencias. Se mantuvo un ambiente controlado a 21 ± 2 °C con 55 ± 2 % de humedad y un ciclo de luz/oscuridad de 12 h, con 20 renovaciones del volumen de aire del ambiente/hora. Los animales fueron mantenidos y tratados de acuerdo con los lineamientos establecidos por el *National Institute of Health* (NIH, Estados Unidos) y los experimentos fueron aprobados por el Comité de ética animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias, UNL. Todos los animales recibieron, en simultáneo y *ad libitum*, agua potable y alimento balanceado estéril (Cooperación, Buenos Aires, Argentina) con 230 g/Kg de proteína, 60 g/kg de fibra cruda, 100 g/kg de minerales totales, 13 g/kg de Ca, 8 g/kg de P, 120 g/kg de agua y vitaminas. Los ingredientes utilizados por el proveedor en la formulación fueron: harina de maíz, trigo y soja, aceite de soja, gluten de maíz,

aceite de girasol, harina de pescado, vitamina A, B1, B2, B6, B12, C, D3, K, biotina, ácido fólico, ácido pantoténico, ácido nicotínico, cloruro de colina, carbonato de calcio, cloruro de sodio, selenito de sodio yodato de calcio, óxido de cobre, sulfato ferroso, óxido manganeso, óxido de magnesio, óxido de zinc, lisina, metionina, treonina y extracto de romero.

3.5.2 *Salmonella Typhimurium*

Salmonella enterica serovar Thyphimurium 1724/12, obtenida del Instituto Malbrán (Buenos Aires, Argentina) y conservada a -70 °C en medio Triptona de Soja (TS, Biokar) adicionada con 20 % (v/v) de glicerol (Cicarelli), en la colección del INLAIN. La cepa de *Salmonella* fue reactivada *overnight* (18 h) en caldo TS a 37 °C en aerobiosis para la infección de los animales en el ensayo de sobrevida.

3.5.3 Ensayo de sobrevida

Para la realización de este ensayo, el tamaño de las muestras (cantidad de animales) fue calculado de acuerdo a Charan y Kantharia [137], considerando un nivel de significancia del 5 %, con una potencia del 80 % y una tasa de sobrevida del 40 % en el grupo control y 90 % en el grupo que recibe el tratamiento en estudio, dando como resultado un mínimo de 10 animales por grupo. Todos los animales recibieron, vía intragástrica, 0,3 ml de las muestras correspondientes, durante 10 días consecutivos. Al día 11, se desafiaron (intubación intragástrica o *gavage*) los ratones con una única dosis infectiva (10^6 ufc/ratón) de *S. Thyphimurium* 1724/12.

Se realizaron dos ensayos independientes. En el primero se conformaron tres grupos experimentales de 12 animales cada uno: grupo control (C), grupo avena fermentada (AF) y grupo zanahoria fermentada (ZF), los cuales recibieron vía intragástrica, 0,3 ml de agua corriente estéril y avena y zanahoria fermentadas por *L. plantarum* LpAv, respectivamente. Las muestras de avena fermentada fueron obtenidas como se describe en la sección 3.3.1, utilizando una tasa de inoculación del 1,0 % (v/v). Las muestras de zanahoria fermentada se prepararon según lo descrito en la sección 3.4. En ambos casos, las muestras fermentadas fueron conservadas a 4 °C durante los 10 días de inoculación de los animales, usando una muestra por día.

En el segundo ensayo se establecieron cuatro grupos experimentales, compuestos por 14 animales cada uno: grupo control (GC), el cual recibió una solución estéril de glucosa al 10 % (p/v) en agua corriente; grupo zanahoria fermentada (ZF), el cual recibió zanahoria fermentada obtenida como se indicó en la sección 3.4; grupo LpAv (LpAv), el cual recibió la cepa *L. plantarum* LpAv (en una concentración similar que en la zanahoria fermentada, en un orden de magnitud de 10^9 ufc/ml); y un grupo control de zanahoria (CZ), el cual recibió zanahoria no fermentada. La muestra de LpAv se obtuvo a partir de un cultivo *overnight* en caldo MRS (18 h,

37 °C, aerobiosis), el cual se lavó dos veces con *buffer* PBS y resuspendió en NaCl 1 % (v/v) pH 6,5. La zanahoria no fermentada se obtuvo de la siguiente manera: a 50 g de rodajas de zanahorias lavadas y peladas se le adicionaron 40 ml de NaCl (1 % (p/v), pH 6,5), se trataron a 70 °C por 10 min y se filtraron con gasa. Todas las muestras utilizadas en este ensayo fueron adicionadas con glucosa 10 % (p/v) como crioprotector, fraccionadas y almacenadas a -70 °C durante los 10 días de inoculación, utilizando un frasco por día.

La sobrevida post-infección fue monitoreada diariamente y se consideró el ensayo finalizado cuando no se registró ninguna muerte en ninguno de los grupos estudiados después de tres días consecutivos. Se graficó la mortalidad acumulada en el período post-infección en función del tiempo, y se expresaron los resultados como % de sobrevida frente la infección.

La figura 24 muestra un diagrama de flujo de los experimentos llevados a cabo en este capítulo de Tesis.

3.6 Análisis estadístico

Todas las medidas fueron realizadas por triplicado y los resultados presentados como promedio \pm desviación estándar (SD). Los datos obtenidos fueron analizados mediante el método ANOVA de un factor, verificando la homogeneidad de varianzas, utilizando el *software* SPSS 15.0 (SPSS Inc., Chicago, Estados Unidos). Las diferencias entre medidas fueron analizadas por las pruebas *post hoc* de Tuckey, si la comparación fue entre todos los grupos, o prueba de Dunnet, si la comparación fue con respecto al control. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando el valor p obtenido fue menor a 0,05.

Para el tratamiento estadístico de los datos de caracterización reológica de las muestras, se llevó a cabo un test LSD, utilizando el *software* StatGraphics Centurion XV (Statgraphics Technologies Inc., The Plains, VA, Estados Unidos), considerando diferencias significativas cuando $\alpha < 0,05$.

El tratamiento estadístico del ensayo *in vivo* de sobrevida en animales se realizó con el programa SigmaPlot 12.0 (Systat Software Inc., San Jose, CA, Estados Unidos) usando el log Rank test.

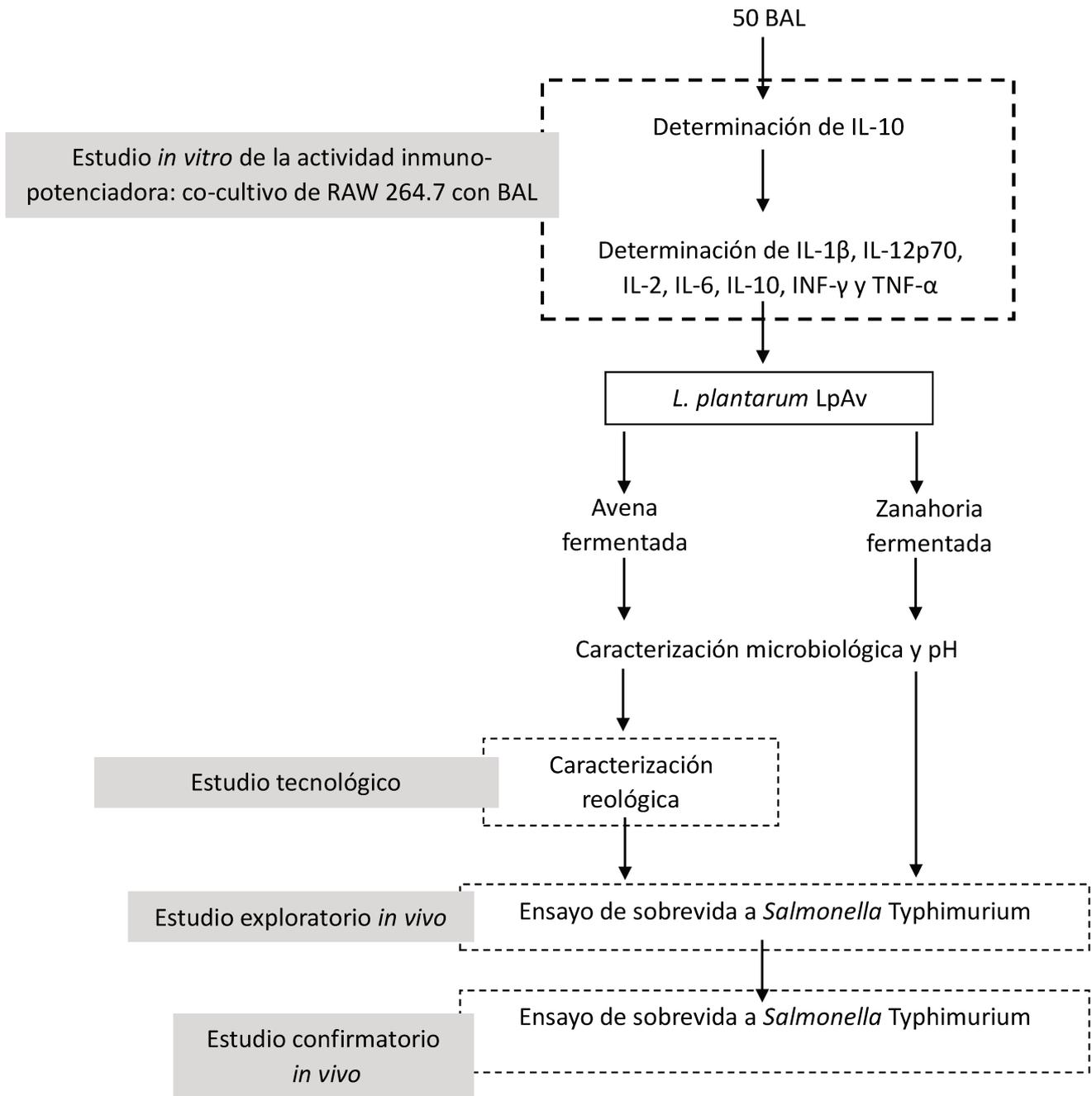


Figura 24 – Diagrama de flujo de los experimentos realizados en este capítulo de Tesis.

4. RESULTADOS

4.1 Potencial inmunomodulador de las BAL

Para determinar la capacidad inmunomoduladora *in vitro* de 50 cepas de BAL aisladas a partir de diversos forrajes (capítulo 1), la línea celular RAW 264.7 fue co-cultivada con las bacterias en estudio, y se cuantificó la producción de IL-10 en los sobrenadantes mediante ELISA. De los 50 aislamientos de BAL, un total de 21 mostraron capacidad de inducir aumentos significativos ($p < 0,05$) en la producción de esta citoquina por parte de los macrófagos, con respecto al control (Fig. 25). El control de activación, tratado con LPS, indujo una producción de IL-10 siete veces mayor al control sin tratar ($p = 0,000$). *L. plantarum* LpAv y LpS3, *P. pentosaceus* PpM1 y *L. paracasei* LcAv fueron las BAL que indujeron la producción de las mayores cantidades de IL-10. En particular, el co-cultivo con LcAv fue el que mayor concentración de IL-10 presentó, siendo 8 veces mayor que el control sin tratar, existiendo diferencia significativa incluso con el control LPS ($p = 0,000$).

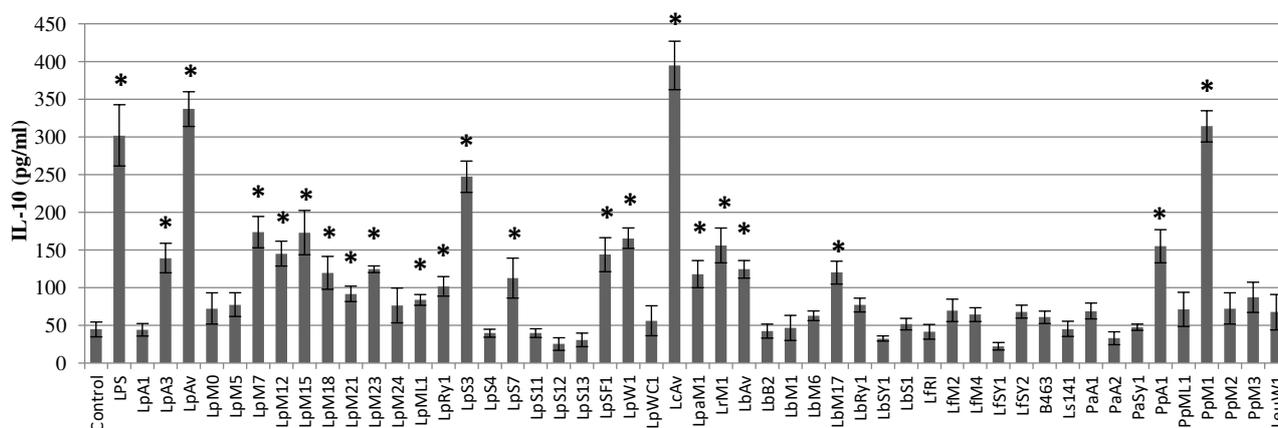


Figura 25 – IL-10 (pg/ml) producida por macrófagos murinos co-cultivados con *Lactiplantibacillus plantarum* subsp. *plantarum* LpAv, LpA1, LpA3, LpSF1, LpML1, LpM0, LpM5, LpM7, LpM12, LpM15, LpM18, LpM21, LpM23, LpM24, LpRY1, LpS3, LpS4, LpS7, LpM11, LpS12, LpS13, LpWC1, LpW1, *Lacticaseibacillus paracasei* subsp. *paracasei* LcAv, LpA1, *Levilactobacillus brevis* LbAv, LbB2, LbM1, LbM6, LbM17, LbRY1, LbSY1, LbS1, *Limosilactobacillus fermentum* LfRi, LfM2, LfM4, LfSY1, LfSY2, *Lacticaseibacillus rhamnosus* LrM1, *Leuconostoc pseudomesenteroides* LeuW1, *Pediococcus acidilactici* PaA1, PaA2, PaSy1, *Pediococcus pentosaceus* PpA1, PpML1, PpM1, PpM2, PpM3. LPS: lipopolisacárido de *Escherichia coli* O55:B5 como control de activación. Los valores son promedios (\pm SD) de tres repeticiones. Los valores indicados con * difieren significativamente ($p < 0,05$) del control sin tratar.

En base a la capacidad de inducir la producción de IL-10 por parte de los macrófagos murinos, las cepas *L. plantarum* LpA3, LpAv, LpML1, LpM7, LpM15, LpM18, LpM23, LpS3, LpS7, LpSF1, LpW1, *L. paracasei* LcAv, LpA1, *L. rhamnosus* LrM1 y *P. pentosaceus* PpM1 fueron seleccionadas para una caracterización más amplia por análisis multiplex, en el cual se determinó la concentración de IL-1 β , IL-12p70, IL-2, IL-6, IL-10, INF- γ y TNF- α (Fig. 26). Las cantidades de IL-10 observadas en la determinación anterior fueron confirmadas en este ensayo (resultados no mostrados). Los sobrenadantes de los co-cultivos de macrófagos con LpA3 y LpW1 mostraron contenidos de IL-1 β significativamente elevados con respecto al control sin tratamiento ($p = 0,000$), sin diferencias entre las dos cepas, siendo ambos valores 5-6 veces menores que el control de activación con LPS (Fig. 26A). Aunque los macrófagos co-cultivados con LpA3, LpM23, LpAv y PpM1, produjeron concentraciones de IL-6 de 15-20 veces menores que LPS, estas cuatro cepas indujeron una producción mayor que el control sin tratar ($p = 0,000$; $0,000$; $0,015$ y $0,000$, respectivamente), sin diferencias entre estas (Fig. 26E). Como puede observarse en la figura 26C, el contenido de IL-12p70 en los sobrenadantes fue 7-8 veces más alto en los co-cultivos de las células murinas con LpA3 y LpM23, con respecto al control ($p = 0,010$ y $0,002$, respectivamente). Al igual que en los casos anteriormente expuestos, LPS fue el que mayormente indujo la producción de la citoquina. En el análisis de los resultados mostrados en la figura 26D, se observó que solo la cepa PpM1 activó la producción de IL-2 con respecto al control ($p = 0,000$) y a las demás cepas. El INF- γ (Fig. 26B) fue encontrado en mayores concentraciones en los co-cultivos de los macrófagos con LpML1 y LpM18, con respecto al co-cultivo sin tratamiento ($p = 0,000$ en ambos casos). Por último, todas las cepas de BAL analizadas, excepto LrM1 ($P = 0,840$), fueron capaces de activar significativamente la inducción de TNF- α , comparadas con el control sin tratar ($p = 0,000$). Además, como se observa en la figura 26F, la producción de esta citoquina por parte de los macrófagos que fueron tratados con las cepas LpA3, LpAv, LpM23, LpW1 y LpS13, fueron incluso mayor (1,5-2 veces) que el control de activación LPS.

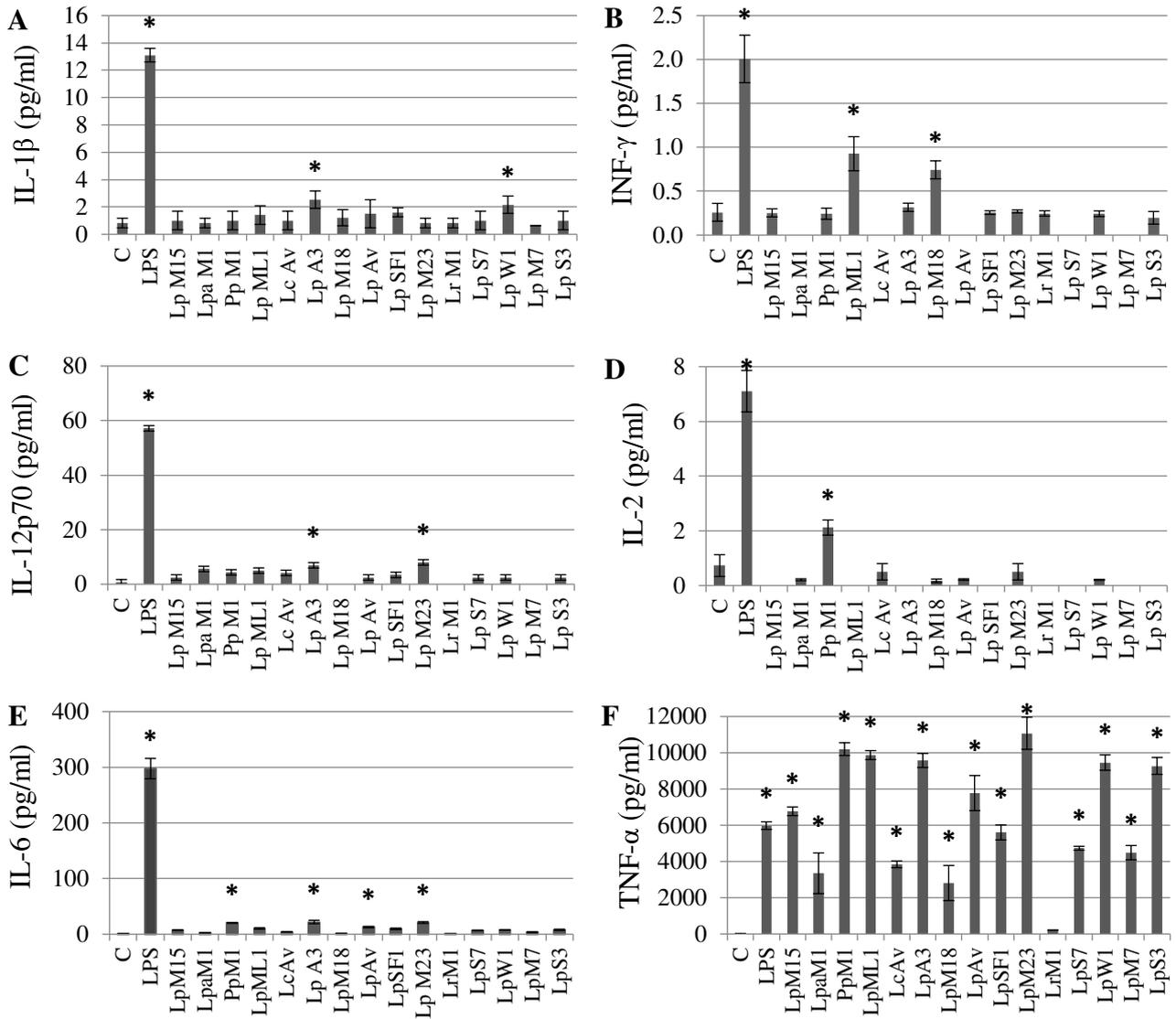


Figura 26 – Concentración (pg/ml) de IL-1β (A), INF-γ (B), IL-12p70 (C), IL-2 (D), IL-6 (E) y TNF-α (F) en sobrenadantes de co-cultivos de macrófagos murinos con *L. plantarum* LpA3, LpAv, LpML1, LpM7, LpM15, LpM18, LpM23, LpS3, LpS7, LpSF1, LpW1, *L. paracasei* LcAv, LpaM1, *L. rhamnosus* LrM1 y *P. pentosaceus* PpM1. Los valores son promedios (±SD) de tres repeticiones. Los valores indicados con * difieren significativamente (p < 0,05) del control sin tratar.

4.2 Producto fermentado en base a avena

4.2.1 Análisis microbiológico y valores de pH de la avena fermentada por *L. plantarum* LpAv

Los ensayos anteriores de co-cultivo *in vitro* con macrófagos murinos permitió la selección de *L. plantarum* LpAv en base a su capacidad de inducir la secreción de la citoquina antiinflamatoria IL-10, además de promover la producción de TNF-α, (implicada en la restauración del daño epitelial) y de IL-6. Se analizó la capacidad de *L. plantarum* LpAv para

fermentar avena. El recuento de BAL en MRS (\log_{10} ufc/ml) de la suspensión inicial de avena, fue $<10^2$ ufc/ml, y el pH $5,71 \pm 0,02$. Dicha suspensión fue inoculada con la cepa en estudio en dos concentraciones iniciales (\log_{10} ufc/ml) de 6,45 (0,1%, I1) y 7,45 (1,0%, I2), dejando que la fermentación se lleve a cabo durante 18 h a 37 °C. Como se muestra en la figura 27, el desarrollo de las BAL ($\Delta\log_{10}$ ufc/ml) a las 18 h de fermentación fue mayor en las muestras I1 ($1,97 \pm 0,06$) con respecto a las I2 ($1,23 \pm 0,01$). Sin embargo, esta última resultó en recuentos de BAL mayores comparada con las muestras I1. Por otro lado, luego de 8 días de almacenamiento se observó una disminución en los recuentos de BAL en ambas muestras, siendo el $\Delta\log_{10}$ ufc/ml de la pérdida de viabilidad celular mayor I1 ($0,81 \pm 0,03$) versus I2 ($0,5 \pm 0,04$). A partir de los 8 días de refrigeración, los niveles de BAL se mantuvieron sin cambios significativos en los siguientes tiempos de muestreos, siendo el \log_{10} ufc/ml de $8,13 \pm 0,06$ para I2 y $7,54 \pm 0,08$ para I1. Asimismo, los controles no inoculados (no incluidos en la figura 27) mantuvieron un nivel de recuentos totales en agar MRS $< 1 \times 10^2$ ufc/ml hasta el final del ensayo. Con respecto a los valores de pH, hubo un mayor descenso del mismo a las 18 h en las muestras I2 ($4,05 \pm 0,01$) con respecto a las I1 ($4,27 \pm 0,04$), manteniéndose sin cambios significativos a lo largo del tiempo de almacenamiento.

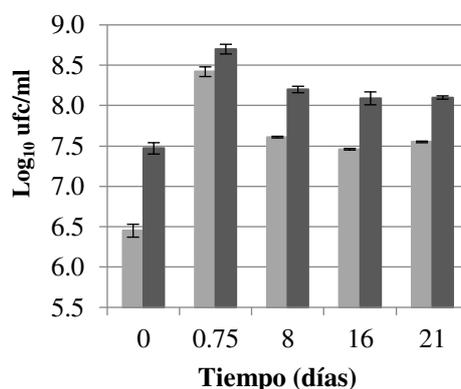


Figura 27 – Recuento de BAL totales (\log_{10} ufc/ml) en avena inoculada con *Lactobacillus plantarum* LpAv al 0,1 (■) y 1,0 % (v/v) (■) antes ($t = 0$) y a las 18 h de fermentación ($t = 0,75$ días), y luego de 8, 16 y 21 días de almacenamiento a 4 °C. Los valores son promedios (\pm SD) de tres repeticiones.

Para analizar el efecto del tiempo en la fermentación, se llevó a cabo un segundo ensayo utilizando la tasa de inoculación del 1,0 % (v/v) de LpAv e incubación a 37 °C. Las condiciones iniciales de las muestras fueron las mismas que las del ensayo anterior: pH de la suspensión de $5,64 \pm 0,04$ y un recuento de BAL totales de $7,48 \pm 0,06$ (\log_{10} ufc/ml). No hubo diferencias significativas en los recuentos de BAL a las 20, 24 y 28 h de fermentación (\log_{10} ufc/ml = $8,66 \pm 0,05$) o al compararlos con los recuentos a las 18 h en el ensayo anterior (\log_{10} ufc/ml = $8,70 \pm 0,06$). Además, aunque no hubo diferencias significativas en los valores de pH en los tres tiempos

de muestreo ($3,52 \pm 0,01$), el pH a las 20 h de fermentación fue inferior al de las 18 h ($4,05 \pm 0,01$). Por otro lado, los recuentos de hongos y levaduras fueron menores a 2 órdenes de logaritmo (ufc/ml) en todas las muestras.

4.2.2 Caracterización reológica de la avena fermentada

Se estudió el comportamiento reológico la avena fermentada I1 e I2, utilizando como control muestras no inoculadas. Todas las muestras exhibieron un comportamiento no Newtoniano, mostrando dependencia no solo con el esfuerzo de corte, sino también una leve dependencia con el tiempo de cizallamiento (tixotropía), su viscosidad disminuye continuamente con el gradiente de deformación y el tiempo de cizallamiento. La tixotropía se observa por el área de histéresis entre las curvas ascendente y la descendente en la figura 28. El área de tixotropía es mayor para las muestras inoculadas con respecto al control sin tratar (Tabla 13). Este parámetro es una medida de la extensión de la ruptura estructural en la muestra (principalmente enlaces no covalentes). Aunque este parámetro es muy bajo, debido a que son muestras muy fluidas, se encontraron diferencias entre la muestra control (no fermentada) y las fermentadas, por lo que habría una menor ruptura estructural en la muestra sin tratar.

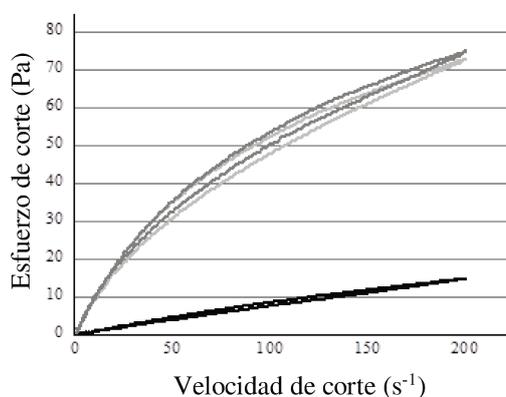


Figura 28 – Esfuerzo de corte en función de la velocidad de corte de la avena fermentada I1 (▴), I2 (▾) y control no inoculado (■).

Tabla 13 – Viscosidad aparente (η_{app}) a 50, 100, 150 y 200 s^{-1} y valores del índice de tixotropía para avena fermentada inoculada con 0,1 y 1,0 % (v/v) de *Lactiplantibacillus plantarum* LpAv y control no inoculado.

	Viscosidad (η_{app})				Índice de tixotropía (Pa/s)
	50 s^{-1}	100 s^{-1}	150 s^{-1}	200 s^{-1}	
Control	$0,09 \pm 0,02^a$	$0,08 \pm 0,02^a$	$0,07 \pm 0,02^a$	$0,07 \pm 0,02^a$	$127,7 \pm 29,3^a$
I1	$0,70 \pm 0,01^b$	$0,52 \pm 0,01^b$	$0,42 \pm 0,01^b$	$0,36 \pm 0,00^b$	$599,6 \pm 187,7^b$
I2	$0,70 \pm 0,06^b$	$0,53 \pm 0,02^b$	$0,44 \pm 0,01^b$	$0,37 \pm 0,00^b$	$526,0 \pm 151,4^b$

^{a,b} Valores con distintos superíndices difieren significativamente al aplicar el test LSD ($\alpha = 0,05$)

Teniendo en cuenta que los productos semisólidos pueden ser percibidos en la boca entre 50-200 s⁻¹, esos valores de viscosidad aparente fueron tomados de la curva y se muestran en la tabla 13. La viscosidad decrece con el aumento del esfuerzo de corte en todas las muestras. Las muestras inoculadas resultaron en viscosidades aparentes significativamente más altas que el control, en todas las velocidades de corte analizadas, sin diferencias entre I1 e I2.

Se utilizó el modelo ley de la potencia (modelo de Ostwald-de Waele) para ajustar los datos de la curva de viscosidad y los parámetros obtenidos se muestran en la tabla 14. Como se mencionó, todas las muestras exhibieron un comportamiento pseudoplástico ($n < 1$), aunque el control se encontró más cercano a un comportamiento Newtoniano ($n = 1$). La inoculación con 0,1 y 1,0 % (v/v) de LpAv produjo un aumento significativo en el índice de consistencia (k), siendo entonces muestras con mayor consistencia que el control, y una disminución significativa del índice de comportamiento de flujo (n).

Tabla 14 – Parámetros obtenidos a partir de las curvas de viscosidad, aplicando el modelo de ley de potencia, para la avena fermentada I1 e I2 y el control no inoculado. Índice de consistencia (k), índice de comportamiento de flujo (n).

	k	n	r²
Control	0,10 ± 0,03 ^a	0,95 ± 0,02 ^a	0,988
I1	2,99 ± 0,23 ^b	0,62 ± 0,02 ^b	0,986
I2	3,35 ± 0,38 ^b	0,59 ± 0,02 ^b	0,990

^{a,b} Valores con distintos superíndices difieren significativamente al aplicar el test LSD ($\alpha = 0,05$)

Los parámetros obtenidos a partir del análisis del perfil de textura se muestran en la tabla 15. La dureza, y cohesividad aumentaron en ambas muestras inoculadas en comparación con el control, siendo I2 la que dio como resultado parámetros de dureza y cohesividad significativamente mayores que las otras muestras. Esto condice con los resultados observados en el análisis reología, en el cual el índice de tixotropía, relacionado a la estructura reticulada de las muestras, indicaba una red más cohesiva en las muestras fermentadas. Por el contrario, la adhesividad disminuyó significativamente con la fermentación, siendo menor en I2.

Tabla 15 – Parámetros obtenidos a partir del análisis del perfil de textura de avena fermentada inoculada con 0,1 y 1,0 % (v/v) de *Lactiplantibacillus plantarum* LpAv y el control no inoculado.

	Dureza (N)	Adhesividad (N/s)	Cohesividad
Control	0,015 ± 0,001 ^a	0,028 ± 0,004 ^a	0,730 ± 0,079 ^a
I1	0,019 ± 0,001 ^b	0,018 ± 0,002 ^b	0,919 ± 0,023 ^b
I2	0,022 ± 0,001 ^c	0,004 ± 0,001 ^c	1,069 ± 0,036 ^b

^{a,b,c} Valores con distintos superíndices difieren significativamente al aplicar el test LSD ($\alpha = 0,05$).

4.3 Análisis microbiológico y determinación de pH de las zanahorias fermentadas

Se evaluó la fermentación de zanahorias crudas con *L. plantarum* LpAv. El recuento total en MRS en las muestras iniciales, previo a la inoculación, fue $<1 \times 10^2$ ufc/ml y el pH fue $5,70 \pm 0,01$. *L. plantarum* LpAv se inoculó en una concentración de $1,64 \times 10^7$ ufc/ml, utilizando además muestras no inoculadas como control. Luego de 24 h de fermentación, las muestras control presentaron olor y aspecto desagradables. Asimismo, al inspeccionar los sobrenadantes de dichas muestras mediante microscopía óptica (100x), se observó una población bacteriana muy heterogénea, incluyendo bacterias móviles. El pH de las muestras no inoculadas fue de $5,42 \pm 0,02$, lo que sugiere que no se produjo una fermentación láctica espontánea. Por otro lado, el pH de las zanahorias inoculadas luego de 24 horas de fermentación fue de $3,82 \pm 0,02$ y el recuento de BAL totales en MRS fue de $9,36 \pm 0,05$ (\log_{10} ufc/ml) (Fig. 29A), lo que sugiere una fermentación láctica exitosa. Además, mediante microscopía óptica se observó una población mucho más homogénea que la del control, compuesta principalmente por bacilos en forma de bastón. Por último, el producto fermentado se mantuvo almacenado bajo refrigeración (4°C) y a temperatura ambiente (25°C) y se determinaron los recuentos de BAL totales y pH a los 7, 20 y 30 días de almacenamiento (Fig. 29B). Los recuentos de BAL (\log_{10} ufc/ml) disminuyeron progresivamente a lo largo del tiempo de almacenamiento, siendo más lenta la pérdida de viabilidad celular en las muestras refrigeradas. Por otro lado, el pH se mantuvo sin cambios en las muestras mantenidas a la temperatura más baja, mientras que se observó una mayor acidificación en las almacenadas a 25°C . Los recuentos de levaduras y mohos fueron inferiores a 2 órdenes log de ufc/ml en todas las muestras.

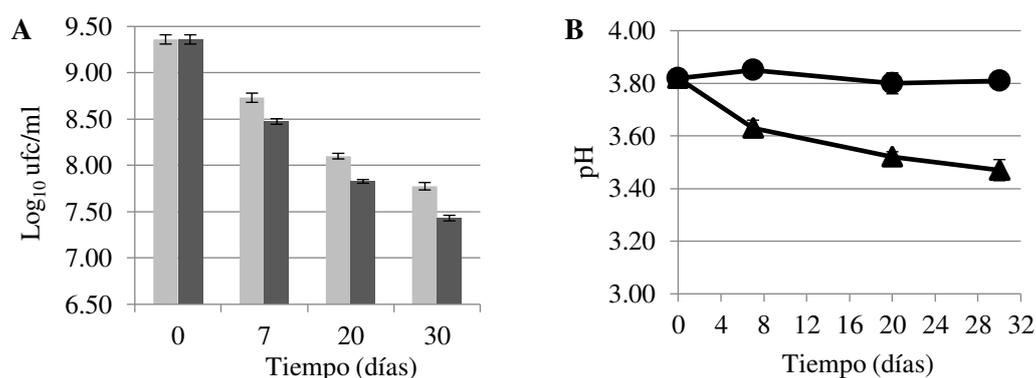


Figura 29 – Recuento de BAL totales (\log_{10} ufc/ml) (A) y valores de pH (B) de zanahoria fermentada al inicio ($t = 0$) y luego de 7, 20 y 30 días de almacenamiento a 4°C (■, ●) y 25°C (▲, ▲).

4.4 Ensayo de sobrevida a la infección por *Salmonella Typhimurium*

Se estudió la capacidad de la avena y zanahorias fermentadas por *Lactiplantibacillus plantarum* LpAv para proteger a ratones contra la infección por *Salmonella*. Para esto, ratones BALB/c recibieron homogeneizados de las muestras correspondientes vía intragástrica por 10 días consecutivos, desafiándolos luego con una única dosis de *Salmonella*.

En el primer ensayo de sobrevida, las muestras de avena fermentada contenían $5,08 \times 10^8$ ufc/ml de LpAv al día 1 del ensayo, disminuyendo los recuentos celulares a $1,52 \times 10^7$ ufc/ml al día 10 de la alimentación ($\Delta \log_{10}$ ufc/ml = 1,52). Además, los valores de pH de las muestras de avena fermentada fueron de $3,57 \pm 0,05$ a lo largo de toda la experiencia. En las zanahorias fermentadas, los recuentos de LpAv decrecieron desde $2,24 \times 10^9$ a $8,80 \times 10^7$ ufc/ml desde el principio hasta el final del periodo de alimentación de 10 días ($\Delta \log_{10}$ ufc/ml = 1,41) y los valores de pH de $3,68 \pm 0,04$, sin cambios a lo largo de la experiencia. En la figura 30A se puede observar que no hubo diferencias significativas de sobrevida entre los animales que recibieron agua de canilla o avena fermentada ($p = 0,922$). Por otro lado, la sobrevida acumulada de los ratones que recibieron zanahorias fermentadas fue significativamente mayor en comparación con los grupos control ($p = 0,035$) y de avena fermentada ($p = 0,025$). Pasados los 8 días a partir de la infección, la sobrevida del grupo de control era inferior al 40 %, y no se observaron más cambios en la sobrevida de ningún grupo después del día 9. Para ese entonces, más del 80 % de los ratones que recibieron zanahorias fermentadas sobrevivieron hasta el final del ensayo.

En el segundo ensayo, se administró zanahoria fermentada, sumando un grupo control que recibió zanahoria sin fermentar y un grupo que recibió la cepa LpAv. Además, los recuentos de BAL totales en las muestras se mantuvieron sin cambios durante el periodo de alimentación, a través de su almacenamiento a -70 °C con glucosa como crioprotector. Los recuentos (\log_{10} ufc/ml) fueron de $9,23 \pm 0,05$ (día 1) y $9,27 \pm 0,01$ (día 10) en zanahorias fermentadas y de $9,13 \pm 0,05$ (día 1) y $9,24 \pm 0,06$ (día 10) en las muestras de LpAv. En la figura 30B se observa que los ratones que recibieron zanahorias fermentadas mostraron una supervivencia acumulada significativamente mayor que el grupo control ($p = 0,042$) y que el grupo de zanahorias no fermentadas ($p = 0,043$), pero no hubo diferencias significativas en comparación con el grupo de LpAv ($p = 0,321$). Asimismo, no hubo diferencias significativas entre los grupos de zanahorias no fermentadas y LpAv, en comparación con los ratones control ($p = 0,996$ y $0,431$, respectivamente), ni tampoco entre los grupos de zanahorias no fermentadas y LpAv ($p = 0,518$). A los 12 días del desafío, la sobrevida de los ratones del grupo de zanahorias fermentadas fue de casi el 80 %, mientras que en el grupo control y de zanahorias no fermentadas fue inferior al 25 %.

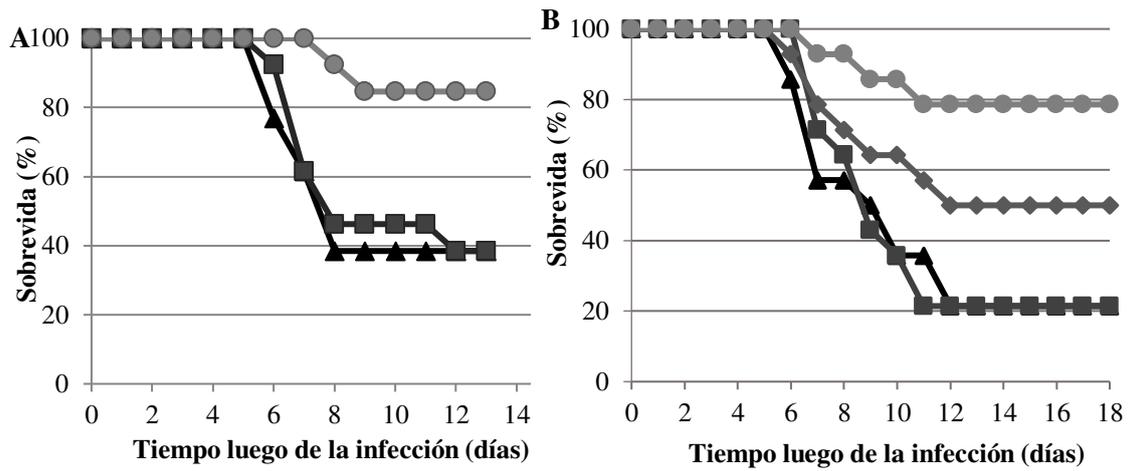


Figura 30 –A) Ensayo 1: supervivencia luego de la infección por *Salmonella Typhimurium* de ratones que recibieron agua de canilla estéril (▲), avena fermentada (■) o zanahorias fermentadas (●), durante 10 días previos al desafío. B) Ensayo 2: supervivencia luego de la infección por *Salmonella Typhimurium* de ratones que recibieron solución de glucosa al 10 % (p/v) en agua de canilla estéril (▲), zanahoria sin fermentar (■), *Lactiplantibacillus plantarum* LpAv (◆) y zanahorias fermentadas (●), durante 10 días previos al desafío.

5. DISCUSIÓN

En algunos alimentos fermentados, una cepa puede cumplir una doble función, la de cultivo iniciador y la de probiótico, como por ejemplo en el caso de *L. paracasei* IMPC 2.1 para la producción de aceitunas de mesa fermentadas probióticas [167] o como en el caso de *L. casei* Shirota, empleada para la producción de la leche fermentada Yakult [168]. El uso de inoculantes definidos para alimentos fermentados es de especial importancia para la producción a gran escala, siendo el uso de cultivos iniciadores seleccionados cada vez más común ya que, aunque la seguridad y la calidad del producto son de primordial importancia, la previsibilidad y la consistencia también son propiedades tecnológicas de interés [169].

Reducir el número de cepas microbianas candidatas, a partir de una colección de cepas aisladas, para llegar a la instancia de los ensayos preclínicos con animales, es todo un reto, sobre todo considerando que no siempre hay una correlación directa entre los resultados de las pruebas *in vitro* e *in vivo* [170]. En el primer capítulo de este trabajo, se obtuvieron 129 aislamientos de BAL a partir de alfalfa, maíz, sorgo, *ryegrass*, arroz, cebada, *Gatton panic*, *Melilotus albus*, soja, trébol blanco, trigo, girasol, avena, canola y moha. En esta parte del trabajo, se partió de 50 aislados de la colección conformada, seleccionados en función de la especie y la fuente de aislamiento, asegurándose de que al menos una especie de cada forraje estuviera representada.

Como los mecanismos de acción de los probióticos son diversos y cepa-dependiente, cada cepa probiótica puede tener funciones específicas. Uno de los mecanismos más comunes es la modulación del sistema inmune intestinal a través de la regulación de la expresión de citoquinas, y esta capacidad ha sido documentada para varias cepas de BAL [171]. Los efectos de los probióticos sobre el sistema inmunológico pueden involucrar la activación de células del SI innato, como fagocitos y células *natural killer*, ejerciendo efectos inhibitorios sobre infecciones, o la inhibición de una respuesta inmune excesiva, lo cual tendría un efecto inhibitorio sobre enfermedades inflamatorias, autoinmunes o alergias [172]. La capacidad de inducir un aumento o disminución de la expresión de citoquinas pro y antiinflamatorias, por parte de macrófagos y otras células inmunitarias, es uno de los mecanismos de acción más comunes de los probióticos. El efecto sobre la producción de citoquinas antiinflamatorias es uno de los principales criterios de selección de probióticos, lo que conduce a una reducción del riesgo de desarrollo inflamatorio en la respuesta inmunitaria intestinal [173]. En un trabajo realizado por Foligne et al. [174], se evaluó la capacidad de inmunomodulación *in vitro* de un grupo de 13 BAL, midiendo la citoquina antiinflamatoria IL-10 liberada por las células mononucleares de sangre periférica humana, la cual mostró una correlación positiva con la capacidad de protección de las cepas en un modelo murino de colitis aguda por TNBS.

Existe un interés particular por las cepas que muestran la capacidad de inducir el aumento de la expresión de IL-10, debido a su potencial antiinflamatorio, que tiene beneficios potenciales en la prevención o tratamiento de enfermedades inflamatorias o autoinmunes [175], [176]. En esta parte del trabajo se estudió la capacidad de 50 cepas de BAL de inducir la producción de IL-10 en co-cultivos con macrófagos murinos. Como resultado se observó que un total de 21 cepas aumentaron la secreción de IL-10 por las células murinas. Estas cepas pertenecen a las especies *L. plantarum* (LpA3, LpAv, LpML1, LpM7, LpM12, LpM15, LpM18, LpM21, LpM23, LpRY1, LpS3, LpS7, LpSF1, LpW1), *L. paracasei* (LcAv, LpaM1), *L. rhamnosus* (LrM1), *L. brevis* (LbAv, LbM17) y *P. pentosaceus* (PpA1, PpM1).

Con el objetivo de avanzar en la selección y reducir aún más el número de cepas para futuros estudios, se amplió el análisis de las propiedades inmunomoduladoras por medio de la determinación de otras citoquinas: IL-1 β , IL-6, IL-12p70, INF- γ y TNF- α , siendo todas estas consideradas de naturaleza proinflamatoria. De las 21 cepas que indujeron la secreción de IL-10, 14 de ellas también promovieron la producción de TNF- α . Esta citoquina es de particular importancia debido a que además puede participar en la regeneración de la barrera epitelial cuando se expresa en cantidades moderadas [177]. Cuatro de estas cepas indujeron, además, la secreción de IL-6. Aunque esta molécula es considerada como una citoquina ambivalente, ya que la producción excesiva de la misma está implicada en varias enfermedades, el papel de la IL-6 en la defensa del huésped debe tenerse siempre presente en la práctica clínica [178]. En base a estos resultados y considerando la inducción de IL-10 de importancia fundamental en la selección, junto con la capacidad leve de promoción de TNF- α e IL-6 y la falta de inducción de otras citoquinas proinflamatorias, se seleccionó *L. plantarum* LpAv para posteriores estudios tecnológicos y en animales. Como se mencionó en el capítulo 1 (sección 4.2), la secuenciación parcial del gen 16S ARNr de LpAv está disponible públicamente en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/MT798595>.

El consumo regular de frutas, verduras y cereales es ampliamente recomendado tanto por organizaciones internacionales como WHO, FAO, USDA, y EFSA (www.who.int, www.efsa.europa.eu, www.fao.org, www.nal.usda.gov), como por las Guías Alimentarias para la Población Argentina, (<https://bancos.salud.gob.ar/recurso/guias-alimentarias-para-la-poblacion-argentina>) por sus efectos beneficiosos sobre la salud. Estos alimentos son fuente natural de nutrientes esenciales como vitaminas, minerales y fibras, y de fitoquímicos no nutritivos como flavonoides, péptidos bioactivos y compuestos fenólicos. Por otro lado, hace algunos años la fermentación ha dejado de considerarse solo un método de biopreservación y se ha convertido en un medio para mejorar el valor nutricional y funcional de los alimentos. Particularmente, la fermentación controlada por el uso de cepas de BAL seleccionadas garantiza una fermentación exitosa, evitando variaciones indeseables e impredecibles en las propiedades de

los alimentos, y confiriendo efectos sobre la salud, con mayor o menor grado de evidencia según el alimento fermentado que se considere [11], [179]. Teniendo en cuenta lo mencionado anteriormente, y la importancia del uso de BAL autóctonas, se estudió el uso de *L. plantarum* LpAv, con potencial inmunomodulador, como cultivo iniciador para la fermentación de cereales y vegetales. La aplicación de esta cepa para la fermentación de alimentos se evaluó tanto en zanahorias como en avena, y los productos fermentados obtenidos se administraron a ratones para evaluar su capacidad de protección contra la infección por *Salmonella*.

Más allá de los efectos positivos de la ingesta de avena sobre la salud, como ser la disminución del nivel de colesterol sérico en individuos hipercolesterolémicos, se ha demostrado que los productos fermentados a base de avena pueden ser vehículos de BAL con potencial probiótico, debido a su capacidad para promover el crecimiento y la supervivencia de estos microorganismos [180], [181]. *L. plantarum* LpAv fue capaz de fermentar la avena con éxito, utilizando concentraciones iniciales tanto del orden de 10^6 como 10^7 ufc/ml, siendo esta última la tasa de inoculación que mostró la mayor tasa de supervivencia de las BAL tras 8 días de almacenamiento. Por otra parte, se realizó el análisis reológico, ya que el comportamiento reológico de los productos semisólidos está intrínsecamente relacionado con los atributos sensoriales, como ser la textura y la sensación en la boca [182]. La avena es rica en β -glucanos, fibra dietética no digerible, que proporciona consistencia a los productos a base de avena. En este estudio, el comportamiento reológico exhibido por las muestras podría deberse, en parte a estos polisacáridos, además de los exopolisacáridos (EPSs) potencialmente producidos por *L. plantarum* [183]. Muchas BAL tienen la capacidad de producir estos biopolímeros de alto peso molecular, compuestos principalmente por carbohidratos, los cuales pueden ser secretados al medio (*slime* EPS) o permanecer anclados a la pared celular (capsulares) [184]. Muy variables en su composición química y estructura, los EPSs presentan propiedades tecnológicas interesantes para la industria de alimentos, ya que pueden influir en el comportamiento reológico, aumentar la viscosidad, disminuir la sinéresis, entre otras. El uso de BAL productoras de EPSs es una estrategia que presenta cada vez más interés en la industria de alimentos, ya sea en la búsqueda de una alternativa natural al agregado de aditivos o en la elaboración de nuevos alimentos funcionales [185]. Se han informado numerosas cepas de *L. plantarum* productoras de EPSs, aisladas de diversas fuentes, como intestino humano o vegetales fermentados. Estos EPSs muestran características dependientes de la cepa, las condiciones de cultivo y la composición del medio. El peso molecular promedio de los EPSs producidos por *L. plantarum* oscila entre 10^4 y 10^6 Da, y se encontró previamente que estos biopolímeros exhiben un comportamiento no newtoniano y pseudoplástico [183]. Relacionando estas características de los EPSs con los resultados reológicos encontrados en las muestras fermentadas de avena en estudio, es probable que los EPSs dominaran el comportamiento reológico de los sistemas. Nambiar et al. [186] también han publicado que la suspensión de EPS producido por una cepa de *L. plantarum*, aislada

de la leche materna humana, exhibía un comportamiento pseudoplástico, es decir, una viscosidad decreciente a altas velocidades de deformación. De manera similar a nuestros resultados, varios estudios han informado que EPSs de *L. plantarum* afectarían favorablemente las características reológicas de productos fermentados. Russo et al. [31] encontraron que luego de la fermentación, la viscosidad era mayor en la avena fermentada inoculada con *L. plantarum* Lp90 productora de EPS, comparados con un control no inoculado. Wang et al. [187] observaron que los EPS de *L. plantarum* SKT109 desempeñaban un papel importante en la mejora de la reología de la leche fermentada. Das y Goyal [188] caracterizaron un α -D-glucano producido por *L. plantarum* DM5, el cual también mostró el típico comportamiento no newtoniano pseudoplástico, concluyendo que es apropiado para su uso como aditivo alimentario. Estas propiedades proporcionadas por los EPSs de *L. plantarum*, que contribuyen a la mejora en la textura y reología, hacen de esta BAL un microorganismo adecuado para la obtención de productos fermentados. Además, cada vez más evidencias científicas apoyan el papel positivo del β -glucano de avena y de algunos EPSs microbianos en la salud humana mediante numerosos efectos: prebiótico, modulación del sistema inmunitario, actividades antioxidantes, antitumorales, anti-ulcerosas o reductoras del colesterol, etc. [189].

En el caso de las zanahorias, *L. plantarum* LpAv fue capaz de dominar este proceso con éxito. Se conoce que los microorganismos presentes de forma natural en los vegetales pueden fermentar espontáneamente el material bajo ciertas condiciones controladas (temperatura, adición de sal), sin embargo el producto obtenido depende tanto de la cantidad como de la calidad de la microbiota presente en el lote específico de material [190]. Además, teniendo en cuenta que los alimentos fermentados no definidos desde el punto de vista microbiológico no deben denominarse probióticos, la fermentación controlada por cultivos definidos puede allanar el camino para el desarrollo de alimentos fermentados probióticos [191]. Aunque hubo diferencias en el contenido total de BAL en las zanahorias fermentadas almacenadas durante 30 días a 4 y 25 °C, puede ser bastante razonable asumir que, a ambas temperaturas, estos productos entregarían cantidades satisfactorias de BAL viables ($> 10^7$ ufc/ml), en cantidades que están en línea con los niveles informados como necesarios para otorgar un beneficio para la salud, como se informó en varios ensayos clínicos en humanos [192].

Por último, se evaluó la capacidad de ambos productos fermentados (avena y zanahoria) para proteger ratones BALB/c contra la infección por *Salmonella*. Según observaciones previas, los vegetales no fermentados no previenen la infección por *Salmonella* en ratones, destacando la importancia de la fermentación en los efectos beneficiosos sobre la salud [193]. Además, teniendo en cuenta el criterio de reducción del principio de las 3R's en la experimentación animal (Reemplazo, Reducción y Refinamiento), no se incluyeron controles no fermentados en el diseño experimental del primer ensayo de sobrevivencia, para reducir el número de grupos experimentales y, por tanto, el número de animales necesarios, preservando la potencia estadística de la prueba.

Además, la capacidad del bioterio del cual se obtienen los animales es limitada en cuanto a la capacidad de proporcionar más de 40 animales del mismo lote (sexo, edad, pesos), y no es aconsejable utilizar animales de diferentes lotes dentro del mismo experimento, ya que las diferencias en la microbiota intestinal de animales de un lote a otro pueden interferir en los resultados de los experimentos [194].

Las respuestas inflamatorias provocadas por la infección por *Salmonella* en el intestino delgado, seguidas por el daño tisular a nivel de la barrera epitelial, son las causas más comunes de las enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs) en los seres humanos y son también un importante sistema modelo para el estudio de la patogénesis bacteriana en ratones [195]. Además, el modelo de salmonelosis murina es un modelo animal costo-efectivo para una primera evaluación *in vivo* del potencial probiótico de cepas [160]. En este trabajo, se compararon dos productos *plant-based* fermentados por *L. plantarum* LpAv en relación a su capacidad de protección contra la infección por *Salmonella*. Como resultado se observaron diferencias significativas en la supervivencia de los ratones que recibieron zanahorias fermentadas, en comparación con los animales control o los que recibieron avena fermentada. La capacidad protectora de las zanahorias fermentadas por *L. plantarum* LpAv puede ser hipotetizada por su capacidad de regular un incremento de la citoquina antiinflamatoria IL-10, como se observó en un trabajo anterior [160]. Se informó también que esta citoquina es capaz de mejorar la barrera epitelial intestinal [196]. Además, hay que tener en cuenta la contribución de la IL-6 a la prevención de la salmonelosis, ya que esta citoquina puede contribuir a la eliminación de microorganismos infecciosos y a la recuperación de los tejidos dañados [197]. Por último, el TNF- α , junto con la IL-6, puede promover la proliferación de las células epiteliales [198], lo que podría haber contribuido a disminuir el daño epitelial inducido por la infección con *Salmonella*. La contribución de la matriz alimentaria al beneficio para la salud se describió en estudios anteriores [199], observándose en este trabajo también, ya que la avena fermentada no fue capaz de conferir el efecto protector de las zanahorias fermentadas. Sin embargo, la dosis también puede haber desempeñado un papel en la capacidad de protección, ya que las zanahorias fermentadas proporcionaron aproximadamente 1 orden logarítmico más de células viables, en comparación con la avena fermentada, a lo largo del período de alimentación. Una limitación hasta aquí, según los controles utilizados, es que no podemos determinar si la capacidad de protección puede atribuirse a la cepa en sí, a la fermentación de la matriz alimentaria o a una combinación de estos factores. Para avanzar en este sentido, se realizó un segundo ensayo, utilizando 14 animales/grupo en lugar de 12, ya que un mayor tamaño de muestra se correlaciona con una mayor potencia para detectar diferencias estadísticas [200]. El segundo ensayo realizado permitió determinar que ni las zanahorias sin fermentar ni la cepa de *L. plantarum* LpAv por sí sola, fueron capaces de conferir protección contra la infección por *Salmonella*, como si lo hizo la zanahoria fermentada por *L. plantarum* LpAv. Estos resultados coinciden con los de Han et al. [193], donde los efectos

positivos del consumo de kimchi se observaron para el kimchi fermentado, pero no para el material crudo sin fermentar.

Si se tienen en cuenta los resultados de la investigación sobre el microbioma humano, junto con los estudios de eficacia de los probióticos, y los estudios asociativos sobre el consumo de alimentos fermentados y la salud, se va conformando un cuerpo de evidencia consistente sobre los efectos beneficiosos del consumo regular de microbios vivos y seguros. La inclusión de microbios vivos y seguros en la dieta puede favorecer y mejorar la salud [24]. En este contexto, las zanahorias fermentadas pueden ser una opción para suministrar microbios vivos con beneficios potenciales para el huésped.

6. CONCLUSIONES

En este capítulo se aplicó una sucesión de pruebas *in vitro* e *in vivo* para seleccionar cepas con potencial probiótico, siendo *L. plantarum* LpAv la cepa seleccionada en base principalmente a la inducción de la producción de IL-10. *L. plantarum* LpAv fue capaz de fermentar avena y zanahorias. Cuando estos alimentos fermentados fueron administrados por vía oral a ratones y desafiados con *Salmonella*, las zanahorias fermentadas fueron capaces de conferir una mayor protección contra la infección. En conjunto, la aplicación de las metodologías permitió identificar a *L. plantarum* LpAv como un candidato probiótico para estudios posteriores, sugiriendo al mismo tiempo la utilidad de estos pasos sucesivos en la selección de nuevos moduladores intestinales.

CONCLUSIONES GENERALES

En esta Tesis Doctoral se logró conformar una colección de cepas de BAL aisladas a partir de sustratos vegetales y se estudió su potencial para ser utilizadas como inoculantes para silos y en el desarrollo de prototipos de alimentos *plant-based* en base a avena y zanahoria. Además, se utilizaron técnicas de NGS en el estudio de la dinámica bacteriana de silos de sorgo.

- ✓ Se lograron obtener 129 aislamientos de bacteria lácticas a partir de 14 tipos de sustratos vegetales, principalmente forrajes de la zona de Santa Fe, siendo *L. plantarum* la especie aislada con mayor frecuencia.
- ✓ Se utilizaron medios de extracto vegetal y silos a escala de laboratorio para el *screening* y se seleccionaron 4 cepas de *L. plantarum* (LpAv, LpA3, LpS13 y LpM15) con potencial para ser utilizadas como inoculantes para ensilajes de avena, alfalfa, sorgo y maíz, independientemente del material del cual fueron aisladas.
- ✓ La cepa heterofermentante *L. fermentum* LfM1 mostró capacidad para aumentar la estabilidad aeróbica de ensilajes de maíz, produciendo un silaje con mayor contenido de ácido acético que la cepa comercial *L. buchneri* Ls141.
- ✓ Se seleccionaron 3 cepas con potencial inmunomodulador en base a la capacidad de inducción de la producción de IL-10 *in vitro*, en un modelo de co-cultivo con macrófagos murinos: *L. plantarum* LpAv, *L. paracasei* LcAv y *P. pentosaceus* PpM1. Además, aumentaron la producción de TNF- α y LpAv y PpM1 la de IL-6.
- ✓ Se utilizaron técnicas de *Next Generation Sequencing (metaprofiling)* para el estudio de la dinámica microbiana en silos de sorgo inoculados con *L. plantarum* LpAv, *L. paracasei* LcAv y *P. pentosaceus* PpM1. Aunque esta técnica está comenzando a utilizarse para profundizar los conocimientos del proceso de ensilaje, no se ha encontrado en la bibliografía el estudio en silos de sorgo destinados a la alimentación animal. La inoculación generó una disminución de los índices de riqueza y diversidad a lo largo del tiempo, en contraste con el control. Además, los cambios en la estructura de la población bacteriana ya pueden observarse a los 3 días de fermentación. A pesar del pequeño porcentaje *Lactobacillus* al inicio del ensilaje, fue el género dominante a los 3 y 30 días de fermentación, principalmente en los silajes inoculados. El género *Pediococcus* también fue mayor en el material inoculado en ambos tiempos de muestreo, con valores máximos a los 3 días. Además, la inoculación redujo significativamente la abundancia relativa del género *Klebsiella* en los silajes, patógenos relacionados a mastitis
- ✓ Se utilizó por primera vez la citometría de flujo en el estudio de poblaciones bacteriana en este tipo de sustrato, y se observó que la mayor proporción de se encuentra dentro de

la subpoblación de dañadas, pudiendo por lo tanto ser subestimado la cantidad en los recuentos por técnicas convencionales de cultivo en placa.

- ✓ LpAv fue capaz de llevar a cabo la fermentación de zanahoria, en el desarrollo de un prototipo de alimento *plant-based*, el cual mostró protección contra la infección por *Salmonella*, aumentando la sobrevivencia de ratones en un modelo experimental *in vivo*.
- ✓ LpAv llevó a cabo la fermentación de una bebida *plant-based* en base a avena, mejorando las propiedades reológicas con respecto a la avena sin inocular.
- ✓ 50 de las cepas aisladas en este trabajo de Tesis fueron cedidas en préstamos, vía un MTA, por el término de 5 años a la empresa austríaca Lactosan para su estudio y potencial transferencia tecnológica de aquellas que resulten de interés para su aplicación agrícola y explotación comercial.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] L. Dicks and A. Endo, "The Family Lactobacillaceae: Genera Other than *Lactobacillus*," in *The Prokaryotes*, vol. 9783642301, T. F. Rosenberg E., DeLong E.F., Lory S., Stackebrandt E., Ed. Berlin: Springer, 2014, pp. 1–567.
- [2] A. von Wright and L. Axelsson, "Lactic Acid Bacteria: An Introduction," in *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects*, Fifth Edit., G. Vinderola, A. C. Ouwehand, S. J. Salminen, and A. von Wright, Eds. CRC Press - Taylor & Francis Group, 2019, pp. 1–16.
- [3] J. Björkroth and J. Koort, "Lactic Acid Bacteria: Taxonomy and Biodiversity," *Ref. Modul. Food Sci.*, pp. 1–4, 2016, doi: 10.1016/b978-0-08-100596-5.00864-7.
- [4] J. Zheng *et al.*, "A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of Lactobacillaceae and Leuconostocaceae," *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, vol. 70, no. 4, pp. 2782–2858, 2020, doi: 10.1099/ijsem.0.004107.
- [5] M. Rajilic-Stojanovic, S. Dimitrijevic, and N. Golic, "Lactic acid bacteria in the gut," in *Lactic Acid Bacteria. Microbiological and Functional Aspects*, Fifth Edit., G. Vinderola, A. C. Ouwehand, S. J. Salminen, and A. von Wright, Eds. CRC Press - Taylor & Francis Group, 2019, pp. 383–408.
- [6] S. Oddi *et al.*, "Occurrence of bacteria with technological and probiotic potential in Argentinian breast-milk," *Benef. Microbes*, vol. 11, no. 7, pp. 685–702, 2020, doi: 10.3920/BM2020.0054.
- [7] G. Reid, "Human studies on probiotics and endogenous lactic acid bacteria in the female urogenital tract," in *Lactic Acid Bacteria. Microbiological and Functional Aspects*, Fifth Edit., G. Vinderola, A. C. Ouwehand, S. J. Salminen, and A. von Wright, Eds. CRC Press - Taylor & Francis Group, 2019, pp. 495–500.
- [8] M. C. Audisio, "Gram-Positive Bacteria with Probiotic Potential for the *Apis mellifera* L. Honey Bee: The Experience in the Northwest of Argentina," *Probiotics Antimicrob. Proteins*, vol. 9, pp. 22–31, 2017, doi: 10.1007/s12602-016-9231-0.
- [9] F. George *et al.*, "Occurrence and dynamism of lactic acid bacteria in distinct ecological niches: A multifaceted functional health perspective," *Front. Microbiol.*, vol. 9, no. NOV, pp. 1–15, 2018, doi: 10.3389/fmicb.2018.02899.
- [10] D. Bulgarelli, K. Schlaeppi, S. Spaepen, E. V. L. Van Themaat, and P. Schulze-Lefert, "Structure and functions of the bacterial microbiota of plants," *Annu. Rev. Plant Biol.*, vol. 64, pp. 807–838, 2013, doi: 10.1146/annurev-arplant-050312-120106.
- [11] R. Di Cagno, R. Coda, M. De Angelis, and M. Gobbetti, "Exploitation of vegetables and fruits through lactic acid fermentation," *Food Microbiol.*, vol. 33, pp. 1–10, 2013, doi: 10.1016/j.fm.2012.09.003.
- [12] L. Hanemaaijer *et al.*, "Biodiversity of Phages Infecting the Dairy Bacterium *Streptococcus thermophilus*," *Microorganisms*, vol. 9, 2021, doi: 10.3390/microorganisms9091822.
- [13] P. Schneier, "La Fermentación: una mirada antropológica," in *Alimentos fermentados: microbiología, nutrición, salud y cultura.*, First Edit., A. Ferrari, G. Vinderola, and R. Weill, Eds. Buenos Aires, 2020, pp. 19–40.
- [14] M. L. Marco *et al.*, "The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics

- (ISAPP) consensus statement on fermented foods,” *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*. 2021, doi: 10.1038/s41575-020-00390-5.
- [15] M. G. Gänzle, “Lactic metabolism revisited: Metabolism of lactic acid bacteria in food fermentations and food spoilage,” *Curr. Opin. Food Sci.*, vol. 2, no. Figure 2, pp. 106–117, 2015, doi: 10.1016/j.cofs.2015.03.001.
- [16] G. Vinderola and R. Weill, “Leches fermentadas, yogures y probióticos,” in *Alimentos fermentados: microbiología, nutrición, salud y cultura.*, 1ra ed., A. Ferrari, G. Vinderola, and R. Weill, Eds. Buenos Aires, 2020, pp. 117–131.
- [17] S. Fadda, C. López, and G. Vignolo, “Embutidos fermentados cárnicos: contribución de las bacterias lácticas en la calidad global,” in *Alimentos fermentados: microbiología, nutrición, salud y cultura.*, 1ra ed., A. Ferrari, G. Vinderola, and R. Weill, Eds. Buenos Aires, 2020, pp. 165–188.
- [18] G. Font De Valdez, C. L. Gerez, M. I. Torino, and G. Rollán, “New trends in cereal-based products using lactic acid bacteria,” in *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria: Novel Applications*, Wiley Blackwell Publishing, Inc, 2010, pp. 273–287.
- [19] J. Bousquet *et al.*, “Cabbage and fermented vegetables: From death rate heterogeneity in countries to candidates for mitigation strategies of severe COVID-19,” *Allergy Eur. J. Allergy Clin. Immunol.*, vol. 76, no. 3, pp. 735–750, 2021, doi: 10.1111/all.14549.
- [20] J. Blajman and G. Zárate, “Hortalizas y legumbres fermentadas,” in *Alimentos fermentados: microbiología, nutrición, salud y cultura.*, 1ra ed., A. Ferrari, G. Vinderola, and R. Weill, Eds. Buenos Aires, 2020, pp. 231–259.
- [21] J. Viesser *et al.*, “Global cocoa fermentation microbiome: revealing new taxa and microbial functions by next generation sequencing technologies,” *World J. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 37, no. 7, 2021, doi: 10.1007/s11274-021-03079-2.
- [22] M. L. Marco *et al.*, “Health benefits of fermented foods: microbiota and beyond,” *Curr. Opin. Biotechnol.*, vol. 44, pp. 94–102, 2017, doi: 10.1016/j.copbio.2016.11.010.
- [23] C. Gómez-Gallego, M. Gueimonde, A. Karlund, and S. Salminen, “El papel de los alimentos fermentados en la alimentación,” in *Alimentos fermentados: microbiología, nutrición, salud y cultura.*, 1ra ed., A. Ferrari, G. Vinderola, and R. Weill, Eds. Buenos Aires, 2020, pp. 323–335.
- [24] M. L. Marco *et al.*, “Should There Be a Recommended Daily Intake of Microbes?,” *J. Nutr.*, 2020, doi: 10.1093/jn/nxaa323.
- [25] C. Hill *et al.*, “Expert consensus document: The international scientific association for probiotics and prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic,” *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.*, vol. 11, no. 8, pp. 506–514, 2014, doi: 10.1038/nrgastro.2014.66.
- [26] P. Filannino, R. Di Cagno, and M. Gobbetti, “Metabolic and functional paths of lactic acid bacteria in plant foods: get out of the labyrinth,” *Curr. Opin. Biotechnol.*, vol. 49, pp. 64–72, 2018, doi: 10.1016/j.copbio.2017.07.016.
- [27] S. J. Lee, H. S. Jeon, J. Y. Yoo, and J. H. Kim, “Some important metabolites produced by lactic acid bacteria originated from kimchi,” *Foods*, vol. 10, no. 9, Sep. 2021, doi: 10.3390/FOODS10092148.
- [28] M. Russo, “La fermentación y la gastronomía. Un cocinero entre los científicos, un científico entre los cocineros,” in *Alimentos fermentados: microbiología, nutrición, salud y cultura.*, 1ra ed., A. Ferrari, G. Vinderola, and R. Weill, Eds. Buenos Aires, 2020, pp. 395–408.

- [29] G. Molin, “Probiotics in foods not containing milk or milk constituents, with special reference to *Lactobacillus plantarum* 299v,” 2001, doi: 10.1093/ajcn/73.2.380s.
- [30] A. Angelov, T. Yaneva-Marinova, and V. Gotcheva, “Oats as a matrix of choice for developing fermented functional beverages,” *J. Food Sci. Technol.*, vol. 55, no. 7, pp. 2351–2360, 2018, doi: 10.1007/s13197-018-3186-y.
- [31] P. Russo *et al.*, “*Lactobacillus plantarum* strains for multifunctional oat-based foods,” *LWT - Food Sci. Technol.*, vol. 68, pp. 288–294, 2016, doi: 10.1016/j.lwt.2015.12.040.
- [32] M. Tangyu, J. Muller, C. J. Bolten, and C. Wittmann, “Fermentation of plant-based milk alternatives for improved flavour and nutritional value,” no. Hughes 1995, 2023.
- [33] M. Bragachini, P. Cattani, J. Giordano, J. Peiretti, F. Sánchez, and G. Urrets Zavalía, “Mercado de maquinaria de forrajes conservados,” in *Manual técnico de forrajes conservados. Tecnologías para producir alimentos de alta calidad y aspectos relacionados a la eficiencia del uso de la maquinaria y el manejo nutricional*, 1ra ed., M. Bianco Gaido and F. Mendez, Eds. Manfredi, 2018, pp. 33–40.
- [34] L. Dunière, J. Sindou, F. Chaucheyras-Durand, I. Chevallier, and D. Thévenot-Sergentet, “Silage processing and strategies to prevent persistence of undesirable microorganisms,” *Animal Feed Science and Technology*, vol. 182, no. 1–4, pp. 1–15, 2013, doi: 10.1016/j.anifeedsci.2013.04.006.
- [35] G. Pahlow, R. E. Muck, F. Driehuis, S. J. W. H. Oude Elferink, and S. F. Spoelstra, “Microbiology of Ensiling,” in *Silage Science and Technology*, D. R. Buxton, R. E. Muck, and J. H. Jarrison, Eds. Madison: American Society of Agronomy, 2003, pp. 31–93.
- [36] P. Burns *et al.*, “Isolation, characterization and performance of autochthonous spray dried lactic acid bacteria in maize micro and bucket-silos,” *Front. Microbiol.*, vol. 9, pp. 1–11, 2018, doi: 10.3389/fmicb.2018.02861.
- [37] M. Bragachini, P. Cattani, J. Giordano, J. Peiretti, F. Sánchez, and G. Urrets Zavalía, *Manual Técnico de Forrajes Conservados. Tecnologías para producir alimentos de alta calidad y aspectos relacionados a la eficiencia del uso de la maquinaria y el manejo nutricional*, 1ra ed. Córdoba: INTA Estación Experimental Manfredi. Ministerio de Agroindustria. Presidencia de la Nación., 2018.
- [38] C. Fulgueira, S. Amigot, M. Gaggiotti, L. Romero, and J. Basílico, “Forage quality: Techniques for testing,” *Fresh Prod*, vol. 1, no. 2, pp. 121–131, 2007.
- [39] M. Gallardo, “Dietas balanceadas con forrajes conservados: la importancia de diagnosticar la calidad nutricional,” *Rafaela*, 2007. [Online]. Available: www.produccion-animal.com.ar.
- [40] I. M. Ogunade, O. C. M. Queiroz, and K. G. Arriola, “Lactic Acid Bacteria and Silage Fermentation,” in *Lactic Acid Bacteria. Microbiological and Functional Aspects*, Fifth Edit., G. Vinderola, A. C. Ouwehand, S. Salminen, and A. von Wright, Eds. CRC Press - Taylor & Francis Group, 2019, pp. 275–285.
- [41] A. S. Oliveira *et al.*, “Meta-analysis of effects of inoculation with homofermentative and facultative heterofermentative lactic acid bacteria on silage fermentation, aerobic stability, and the performance of dairy cows,” *J. Dairy Sci.*, vol. 100, no. 6, pp. 4587–4603, 2017, doi: 10.3168/jds.2016-11815.
- [42] S. J. W. H. O. Elferink, J. Krooneman, C. Jan, S. F. Spoelstra, and F. Faber, “Anaerobic Conversion of Lactic Acid to Acetic Acid and 1, 2-Propanediol by *Lactobacillus buchneri* Anaerobic Conversion of Lactic Acid to Acetic Acid and,” *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 67, no. 1, pp. 125–132, 2001, doi: 10.1128/AEM.67.1.125.

- [43] H. Danner, M. Holzer, E. Mayrhuber, and R. Braun, "Acetic acid increases stability of silage under aerobic conditions," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 69, no. 1, pp. 562–567, 2003, doi: 10.1128/AEM.69.1.562-567.2003.
- [44] T. A. McAllister *et al.*, "Silage review: Using molecular approaches to define the microbial ecology of silage," *J. Dairy Sci.*, vol. 101, no. 5, pp. 4060–4074, 2018, doi: 10.3168/jds.2017-13704.
- [45] C. Bai *et al.*, "Dynamics of Bacterial and Fungal Communities and Metabolites During Aerobic Exposure in Whole-Plant Corn Silages With Two Different Moisture Levels," *Front. Microbiol.*, vol. 12, no. June, pp. 1–12, 2021, doi: 10.3389/fmicb.2021.663895.
- [46] W. Bao *et al.*, "Assessing quality of *Medicago sativa* silage by monitoring bacterial composition with single molecule, real-time sequencing technology and various physiological parameters," *Sci. Rep.*, vol. 6, no. June, pp. 1–8, 2016, doi: 10.1038/srep28358.
- [47] I. M. Ogunade *et al.*, "Fate of *Escherichia coli* O157:H7 and bacterial diversity in corn silage contaminated with the pathogen and treated with chemical or microbial additives," *J. Dairy Sci.*, vol. 100, no. 3, pp. 1780–1794, 2017, doi: 10.3168/jds.2016-11745.
- [48] J. J. Romero, Y. Zhao, M. A. Balseca-Paredes, F. Tiezzi, E. Gutierrez-Rodriguez, and M. S. Castillo, "Laboratory silo type and inoculation effects on nutritional composition, fermentation, and bacterial and fungal communities of oat silage," *J. Dairy Sci.*, vol. 100, no. 3, pp. 1812–1828, 2017, doi: 10.3168/jds.2016-11642.
- [49] L. Sun *et al.*, "Succession of Bacterial Community During the Initial Aerobic, Intense Fermentation, and Stable Phases of Whole-Plant Corn Silages Treated With Lactic Acid Bacteria Suspensions Prepared From Other Silages," *Front. Microbiol.*, vol. 12, no. March, pp. 1–15, 2021, doi: 10.3389/fmicb.2021.655095.
- [50] L. Yang, X. Yuan, J. Li, Z. Dong, and T. Shao, "Dynamics of microbial community and fermentation quality during ensiling of sterile and nonsterile alfalfa with or without *Lactobacillus plantarum* inoculant," *Bioresour. Technol.*, vol. 275, no. December 2018, pp. 280–287, 2019, doi: 10.1016/j.biortech.2018.12.067.
- [51] L. Duniere *et al.*, "Bacterial and fungal core microbiomes associated with small grain silages during ensiling and aerobic spoilage," *BMC Microbiol.*, vol. 17, no. 1, pp. 1–16, 2017, doi: 10.1186/s12866-017-0947-0.
- [52] F. G. Eikmeyer *et al.*, "Metagenome analyses reveal the influence of the inoculant *Lactobacillus buchneri* CD034 on the microbial community involved in grass ensiling," *J. Biotechnol.*, vol. 167, no. 3, pp. 334–343, 2013, doi: 10.1016/j.jbiotec.2013.07.021.
- [53] H. Guan *et al.*, "Microbial communities and natural fermentation of corn silages prepared with farm bunker-silo in Southwest China," *Bioresour. Technol.*, vol. 265, no. April, pp. 282–290, 2018, doi: 10.1016/j.biortech.2018.06.018.
- [54] X. S. Guo *et al.*, "Profiling of metabolome and bacterial community dynamics in ensiled *Medicago sativa* inoculated without or with *Lactobacillus plantarum* or *Lactobacillus buchneri*," *Sci. Rep.*, vol. 8, no. 1, pp. 1–10, 2018, doi: 10.1038/s41598-017-18348-0.
- [55] J. Kraut-Cohen *et al.*, "Temporal and spatial assessment of microbial communities in commercial silages from bunker silos," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 100, no. 15, pp. 6827–6835, 2016, doi: 10.1007/s00253-016-7512-x.
- [56] B. Liu, H. Huan, H. Gu, N. Xu, Q. Shen, and C. Ding, "Dynamics of a microbial community during ensiling and upon aerobic exposure in lactic acid bacteria inoculation-treated and untreated barley silages," *Bioresour. Technol.*, vol. 273, no. 50, pp. 212–219, 2019, doi: 10.1016/j.biortech.2018.10.041.

- [57] K. Mogodiniyai Kasmaei, J. Dicksved, R. Spörndly, and P. Udén, “Separating the effects of forage source and field microbiota on silage fermentation quality and aerobic stability,” *Grass Forage Sci.*, vol. 72, no. 2, pp. 281–289, 2017, doi: 10.1111/gfs.12238.
- [58] K. Ni, T. T. Minh, T. T. M. Tu, T. Tsuruta, H. Pang, and N. Nishino, “Comparative microbiota assessment of wilted Italian ryegrass, whole crop corn, and wilted alfalfa silage using denaturing gradient gel electrophoresis and next-generation sequencing,” *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 101, no. 4, pp. 1385–1394, 2017, doi: 10.1007/s00253-016-7900-2.
- [59] N. C. Maldonado *et al.*, “Identification, characterization and selection of autochthonous lactic acid bacteria as probiotic for feedlot cattle,” *Livest. Sci.*, vol. 212, pp. 99–110, 2018, doi: 10.1016/j.livsci.2018.04.003.
- [60] Y. Ban and L. L. Guan, “Implication and challenges of direct-fed microbial supplementation to improve ruminant production and health,” *J. Anim. Sci. Biotechnol.*, vol. 12, no. 1, pp. 1–22, 2021, doi: 10.1186/s40104-021-00630-x.
- [61] B. de la Roza-Delgado, “El ensilado en zonas húmedas y sus indicadores de calidad,” in *IV Jornadas de Alimentación Animal*, 2005, pp. 1–20.
- [62] R. E. Muck, E. M. G. Nadeau, T. A. McAllister, F. E. Contreras-Govea, M. C. Santos, and L. Kung, “Silage review: Recent advances and future uses of silage additives,” *J. Dairy Sci.*, vol. 101, no. 5, pp. 3980–4000, 2018, doi: 10.3168/jds.2017-13839.
- [63] I. Filya, “The effect of *Lactobacillus buchneri* and *Lactobacillus plantarum* on the fermentation, aerobic stability, and ruminal degradability of low dry matter corn and sorghum silages,” *J. Dairy Sci.*, vol. 86, no. 11, pp. 3575–3581, 2003, doi: 10.3168/jds.S0022-0302(03)73963-0.
- [64] R. J. Schmidt, W. Hu, J. A. Mills, and L. Kung, “The development of lactic acid bacteria and *Lactobacillus buchneri* and their effects on the fermentation of alfalfa silage,” *J. Dairy Sci.*, vol. 92, no. 10, pp. 5005–5010, 2009, doi: 10.3168/jds.2008-1701.
- [65] D. H. V. Paradhita *et al.*, “Dual-purpose inoculants and their effects on corn silage,” *Microorganisms*, vol. 8, no. 5, 2020, doi: 10.3390/microorganisms8050765.
- [66] E. dos Santos Leandro *et al.*, “Isolation, Identification, and Screening of Lactic Acid Bacteria with Probiotic Potential in Silage of Different Species of Forage Plants, Cocoa Beans, and Artisanal Salami,” *Probiotics Antimicrob. Proteins*, 2020, doi: 10.1007/s12602-020-09679-y.
- [67] Y. Tanizawa *et al.*, “*Lactobacillus buchneri* subsp. *silagei* subsp. nov., isolated from rice grain silage,” *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, vol. 70, no. 5, 2020, doi: <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004138>.
- [68] S. Wuyts, W. Van Beeck, C. N. Allonsius, M. F. van den Broek, and S. Lebeer, “Applications of plant-based fermented foods and their microbes,” *Curr. Opin. Biotechnol.*, vol. 61, pp. 45–52, 2020, doi: 10.1016/j.copbio.2019.09.023.
- [69] A. U. Fabiszewska, K. J. Zielińska, and B. Wróbel, “Trends in designing microbial silage quality by biotechnological methods using lactic acid bacteria inoculants: a minireview,” *World J. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 35, no. 5, pp. 1–8, 2019, doi: 10.1007/s11274-019-2649-2.
- [70] R. C. Amaral, B. F. Carvalho, D. M. Costa, M. J. F. Morenz, R. F. Schwan, and C. L. da S. Ávila, “Novel lactic acid bacteria strains enhance the conservation of elephant grass silage cv. BRS Capiacu,” *Anim. Feed Sci. Technol.*, vol. 264, 2020, doi: 10.1016/j.anifeedsci.2020.114472.

- [71] M. H. Zwietering, F. M. Jongenburger, F. M. Rombouts, and K. Van't Riet, "Modeling of the bacterial growth curve," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 56, no. 6, pp. 1875–1881, 1990, doi: 0099-2240/90/061875-07\$02.00/0.
- [72] U. Edwards, T. Rogall, H. Blöcker, M. Emde, and E. C. Böttger, "Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA," *Nucleic Acids Res.*, vol. 17, no. 19, pp. 7843–7853, 1989, doi: 10.1093/nar/17.19.7843.
- [73] A. Binetti, V. Suárez, P. Tailliez, and J. Reinheimer, "Characterization of spontaneous phage-resistant variants of *Streptococcus thermophilus* by RAPD analysis and identification of phage-resistance mechanisms," *Int. Dairy J.*, vol. 17, no. 9, pp. 1155–1122, 2007, doi: 10.1016/j.idairyj.2007.01.007.
- [74] G. Giraffa *et al.*, "Genotypic and phenotypic diversity of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* strains of dairy origin," *International J. Food Microbiol.*, vol. 91, pp. 129–139, 2004, doi: 10.1016/S0168-1605(03)00368-4.
- [75] H. Romesburg, "Cluster Analysis for Researchers," *Lifetime Learn. Publicaciones*, vol. Belmont, p. Estados Unidos, 1984.
- [76] P. Burns *et al.*, "Isolation, characterization and performance of autochthonous spray dried lactic acid bacteria in maize micro and bucket-silos," *Front. Microbiol.*, vol. 9, no. NOV, 2018, doi: 10.3389/fmicb.2018.02861.
- [77] R. E. Muck, G. Pahlow, F. Driehuis, S. J. W. H. Oude Elferink, and S. F. Spoelstra, "Microbiology of Ensiling," no. May 2015, 2003, doi: 10.2134/agronmonogr42.c2.
- [78] C. Lin, K. K. Bolsen, B. E. Brent, and D. Y. C. Fung, "Epiphytic lactic acid bacteria succession during the pre-ensiling and ensiling periods of alfalfa and maize," *J. Appl. Bacteriol.*, vol. 73, no. 5, pp. 375–387, 1992, doi: 10.1111/j.1365-2672.1992.tb04992.x.
- [79] H. Pang, G. Qin, Z. Tan, Z. Li, Y. Wang, and Y. Cai, "Natural populations of lactic acid bacteria associated with silage fermentation as determined by phenotype, 16S ribosomal RNA and *recA* gene analysis," *Syst. Appl. Microbiol.*, vol. 34, no. 3, pp. 235–241, 2011, doi: 10.1016/j.syapm.2010.10.003.
- [80] M. Valan Arasu *et al.*, "Identification and phylogenetic characterization of novel *Lactobacillus plantarum* species and their metabolite profiles in grass silage," *Ann. Microbiol.*, vol. 65, no. 1, pp. 15–25, 2015, doi: 10.1007/s13213-014-0830-2.
- [81] K. Ni, Y. Wang, D. Li, Y. Cai, and H. Pang, "Characterization, identification and application of lactic acid bacteria isolated from forage paddy rice silage," *PLoS One*, vol. 10, no. 3, pp. 1–14, 2015, doi: 10.1371/journal.pone.0121967.
- [82] K. Ni, Y. Wang, Y. Cai, and H. Pang, "Natural lactic acid bacteria population and silage fermentation of whole-crop wheat," *Asian-Australasian J. Anim. Sci.*, vol. 28, no. 8, pp. 1123–1132, 2015, doi: 10.5713/ajas.14.0955.
- [83] I. Filya, R. E. Muck, and F. E. Contreras-Govea, "Inoculant Effects on Alfalfa Silage: Fermentation Products and Nutritive Value," *J. Dairy Sci.*, vol. 90, no. 11, pp. 5108–5114, 2007, doi: 10.3168/jds.2006-877.
- [84] S. S. Zhao, Y. P. Wang, F. Y. Yang, Y. Wang, and H. Zhang, "Screening a *Lactobacillus plantarum* strain for good adaptation in alfalfa ensiling and demonstrating its improvement of alfalfa silage quality," *J. Appl. Microbiol.*, vol. 129, no. 2, pp. 233–242, 2020, doi: 10.1111/jam.14604.
- [85] M. E. Thomas, J. L. Foster, K. C. McCuiston, L. A. Redmon, and R. W. Jessup, "Nutritive value, fermentation characteristics, and in situ disappearance kinetics of sorghum silage

- treated with inoculants,” *J. Dairy Sci.*, vol. 96, no. 11, pp. 7120–7131, 2013, doi: 10.3168/jds.2013-6635.
- [86] C. A. Dogi *et al.*, “Selection of lactic acid bacteria to promote an efficient silage fermentation capable of inhibiting the activity of *aspergillus parasiticus* and *fusarium graminearum* and mycotoxin production,” *J. Appl. Microbiol.*, vol. 114, no. 6, pp. 1650–1660, 2013, doi: 10.1111/jam.12173.
- [87] K. Muthusamy *et al.*, “Probiotic characteristics and antifungal activity of *Lactobacillus plantarum* and its impact on fermentation of Italian ryegrass at low moisture,” *Appl. Sci.*, vol. 10, no. 1, 2020, doi: 10.3390/app10010417.
- [88] S. Srigopalram *et al.*, “Isolation, in vitro probiotic characterization of *Lactobacillus plantarum* and its role on Italian ryegrass silage quality enhancement,” *Int. J. Agric. Biol.*, vol. 19, no. 1, pp. 164–170, 2017, doi: 10.17957/IJAB/15.0260.
- [89] C. Ávila, A. Valeriano, J. Pinto, H. Figueiredo, A. Rezende, and R. Schwan, “Chemical and microbiological characteristics of sugar cane silages treated with microbial inoculants,” *Rev. Bras. Zootec.*, no. 1, p. 25, 2010, doi: 10.1590/S1516-35982010000100004.
- [90] A. T. Adesogan, “Recent Advances in Bacterial Silage Inoculant Technology,” 2008.
- [91] H. Alhaag, X. Yuan, A. Mala, J. Bai, and T. Shao, “Fermentation characteristics of *Lactobacillus plantarum* and *Pediococcus* species isolated from sweet sorghum silage and their application as silage inoculants,” *Appl. Sci.*, vol. 9, no. 6, 2019, doi: 10.3390/app9061247.
- [92] W. Chahrour, Y. Merzouk, J. E. Henni, M. Haddaji, and M. Kihal, “Screening and identification of lactic acid bacteria isolated from sorghum silage processes in west Algeria,” *African J. Biotechnol.*, vol. 12, no. 14, pp. 1703–1709, 2013, doi: 10.5897/AJB2012.9911.
- [93] S. Heinl and R. Grabherr, “Systems biology of robustness and flexibility: *Lactobacillus buchneri*—A show case,” *J. Biotechnol.*, vol. 257, pp. 61–69, 2017, doi: 10.1016/j.jbiotec.2017.01.007.
- [94] A. O. Yu *et al.*, “Strain diversity of plant-associated *Lactiplantibacillus plantarum*,” *Microb. Biotechnol.*, vol. 14, no. 5, pp. 1990–2008, 2021, doi: 10.1111/1751-7915.13871.
- [95] S. J. W. H. Oude Elferink, F. Driehuis, J. C. Gottschal, and S. F. Spoelstra, “Silage fermentation processes and their manipulation,” *FAO Plant Prod. Prot. Pap.*, no. January, pp. 17–30, 2000.
- [96] Z. Weinberg, “New trends and opportunities in the development and use of inoculants for silage,” *FEMS Microbiol. Rev.*, vol. 19, no. 1, pp. 53–68, Oct. 1996, doi: 10.1016/0168-6445(96)00025-3.
- [97] N. A. Khan, P. Yu, M. Ali, J. W. Cone, and W. H. Hendriks, “Nutritive value of maize silage in relation to dairy cow performance and milk quality,” *J. Sci. Food Agric.*, vol. 95, no. 2, pp. 238–252, 2015, doi: 10.1002/jsfa.6703.
- [98] Z. G. Weinberg and G. Ashbell, “Engineering aspects of ensiling,” *Biochem. Eng. J.*, vol. 13, no. 2–3, pp. 181–188, 2003, doi: 10.1016/S1369-703X(02)00130-4.
- [99] O. C. M. Queiroz, I. M. Ogunade, Z. Weinberg, and A. T. Adesogan, “Silage review : Foodborne pathogens in silage and their mitigation by silage additives 1,” pp. 4132–4142, 2018, doi: 10.3168/jds.2017-13901.
- [100] A. S. Oliveira *et al.*, “Meta-analysis of effects of inoculation with homofermentative and

- facultative heterofermentative lactic acid bacteria on silage fermentation , aerobic stability , and the performance of dairy cows,” *J. Dairy Sci.*, vol. 100, no. 6, pp. 4587–4603, 2017, doi: 10.3168/jds.2016-11815.
- [101] S. Lindow and M. Brandl, “Minireview Microbiology of the Phyllosphere,” *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 69, no. 4, pp. 1875–1883, 2003, doi: 10.1128/AEM.69.4.1875.
- [102] K. Papadimitriou *et al.*, “Stress Physiology of Lactic Acid Bacteria,” *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, vol. 80, no. 3, pp. 837–890, 2016, doi: 10.1128/mmbr.00076-15.
- [103] C. L. Fulgueira, S. L. Amigot, M. Gaggiotti, L. A. Romero, and J. C. Basílico, “Forage Quality : Techniques for Testing,” in *Fresh Produce*, vol. 1, no. 2, Global Science Books, 2007, pp. 121–131.
- [104] R. Meeske, G. D. Van Der Merwe, J. F. Greyling, and C. W. Cruywagen, “The effect of adding an enzyme containing lactic acid bacterial inoculant to big round bale oat silage on intake, milk production and milk composition of Jersey cows,” *Anim. Feed Sci. Technol.*, vol. 97, no. 3–4, pp. 159–167, 2002, doi: 10.1016/S0377-8401(01)00352-2.
- [105] I. M. Ogunade, D. H. Kim, Y. Jiang, Z. G. Weinberg, K. C. Jeong, and A. T. Adesogan, “Control of Escherichia coli O157:H7 in contaminated alfalfa silage: Effects of silage additives,” *J. Dairy Sci.*, vol. 99, no. 6, pp. 4427–4436, 2016, doi: 10.3168/jds.2015-10766.
- [106] A. G. Whiter and L. Kung, “The effect of a dry or liquid application of *Lactobacillus plantarum* MTD1 on the fermentation of Alfalfa Silage,” *J. Dairy Sci.*, vol. 84, no. 10, pp. 2195–2202, 2001, doi: 10.3168/jds.S0022-0302(01)74666-8.
- [107] C. LIU, Y. jiao LAI, X. nan LU, P. ting GUO, and H. ling LUO, “Effect of lactic acid bacteria inoculants on alfalfa (*Medicago sativa* L.) silage quality: assessment of degradation (in situ) and gas production (in vitro),” *J. Integr. Agric.*, vol. 15, no. 12, p. 2834, 2016, doi: 10.1016/S2095-3119(16)61424-7.
- [108] C. Rizk, A. F. Mustafa, and L. E. Phillip, “Effects of inoculation of high dry matter alfalfa silage on ensiling characteristics, ruminal nutrient degradability and dairy cow performance,” *J. Sci. Food Agric.*, vol. 85, no. 5, pp. 743–750, 2005, doi: 10.1002/jsfa.2034.
- [109] J. Acosta Aragon, “The Use of Probiotic Strains as Silage Inoculants,” in *Probiotics in Animals*, R. Everlon, Ed. IntechOpen, 2012, pp. 1–32.
- [110] J. L. Ellis *et al.*, “The effect of lactic acid bacteria included as a probiotic or silage inoculant on in vitro rumen digestibility, total gas and methane production,” *Anim. Feed Sci. Technol.*, vol. 211, pp. 61–74, 2016, doi: 10.1016/j.anifeedsci.2015.10.016.
- [111] B. D. Nkosi, R. Meeske, T. Langa, and R. S. Thomas, “Effects of bacterial silage inoculants on whole-crop maize silage fermentation and silage digestibility in rams,” vol. 41, no. 4, 2011.
- [112] E. Saarisalo, E. Skyttä, A. Haikara, T. Jalava, and S. Jaakkola, “Screening and selection of lactic acid bacteria strains suitable for ensiling grass,” *J. Appl. Microbiol.*, vol. 102, no. 2, pp. 327–336, 2007, doi: 10.1111/j.1365-2672.2006.03103.x.
- [113] B. F. Ávila, C.L.S., Schwan, R. F., Pinto, J. C., Carvalho, “Potential use of native microorganisms strains of forage for silage production,” in *Proceedings of the II International Symposium on forage quality and conservation*, 2011, pp. 25–43.
- [114] N. C. Da Silva, J. P. Dos Santos, C. L. S. Ávila, A. R. Evangelista, D. R. Casagrande, and T. F. Bernardes, “Evaluation of the effects of two *Lactobacillus buchneri* strains and sodium benzoate on the characteristics of corn silage in a hot-climate environment,”

- Grassl. Sci.*, vol. 60, no. 3, pp. 169–177, 2014, doi: 10.1111/grs.12053.
- [115] H. Guan *et al.*, “Screening of natural lactic acid bacteria with potential effect on silage fermentation, aerobic stability and aflatoxin B1 in hot and humid area,” *J. Appl. Microbiol.*, vol. 128, no. 5, pp. 1301–1311, 2020, doi: <https://doi.org/10.1111/jam.14570>.
- [116] A. O. Santos, C. L. da S. Ávila, and R. F. Schwan, “Selection of tropical lactic acid bacteria for enhancing the quality of maize silage,” *J. Dairy Sci.*, vol. 96, no. 12, pp. 7777–7789, 2013, doi: 10.3168/jds.2013-6782.
- [117] K. G. Arriola *et al.*, “Meta-analysis of effects of inoculation with *Lactobacillus buchneri*, with or without other bacteria, on silage fermentation, aerobic stability, and performance of dairy cows,” *J. Dairy Sci.*, vol. 104, no. 7, pp. 7653–7670, 2021, doi: 10.3168/jds.2020-19647.
- [118] Y. Acosta Aragón, J. Jatkauskas, and V. Vrotniakienė, “The Effect of a Silage Inoculant on Silage Quality, Aerobic Stability, and Meat Production on Farm Scale,” *ISRN Vet. Sci.*, vol. 2012, pp. 1–6, 2012, doi: 10.5402/2012/345927.
- [119] A. T. Adesogan, M. B. Salawu, A. B. Ross, D. R. Davies, and A. E. Brooks, “Effect of *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus fermentum*, *Leuconostoc mesenteroides* inoculants, or a chemical additive on the fermentation, aerobic stability, and nutritive value of crimped wheat grains,” *J. Dairy Sci.*, vol. 86, no. 5, pp. 1789–1796, 2003, doi: 10.3168/jds.S0022-0302(03)73764-3.
- [120] J. M. Wilkinson and R. E. Muck, “Ensiling in 2050: Some challenges and opportunities,” *Grass and Forage Science*, vol. 74, no. 2. Blackwell Publishing Ltd, pp. 178–187, Jun. 01, 2019, doi: 10.1111/gfs.12418.
- [121] Z. G. Weinberg, R. E. Muck, and P. J. Weimer, “The survival of silage inoculant lactic acid bacteria in rumen fluid,” *J. Appl. Microbiol.*, vol. 94, no. 6, pp. 1066–1071, 2003, doi: 10.1046/j.1365-2672.2003.01942.x.
- [122] A. Rodríguez-Palacios, H. R. Staempfli, T. Duffield, and J. S. Weese, “Isolation of bovine intestinal *Lactobacillus plantarum* and *Pediococcus acidilactici* with inhibitory activity against *Escherichia coli* O157 and F5,” *J. Appl. Microbiol.*, vol. 106, no. 2, pp. 393–401, 2009, doi: 10.1111/j.1365-2672.2008.03959.x.
- [123] H. Han, Y. Ogata, Y. Yamamoto, S. Nagao, and N. Nishino, “Identification of lactic acid bacteria in the rumen and feces of dairy cows fed total mixed ration silage to assess the survival of silage bacteria in the gut,” *J. Dairy Sci.*, vol. 97, no. 9, pp. 5754–5762, 2014, doi: 10.3168/jds.2014-7968.
- [124] S. Salminen *et al.*, “The International Scientific Association of Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of postbiotics,” *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.*, vol. 18, no. 9, pp. 649–667, 2021, doi: 10.1038/s41575-021-00440-6.
- [125] J. Gharechahi, Z. A. Kharazian, S. Sarikhan, G. S. Jouzani, M. Aghdasi, and G. Hosseini Salekdeh, “The dynamics of the bacterial communities developed in maize silage,” *Microb. Biotechnol.*, vol. 10, no. 6, pp. 1663–1676, 2017, doi: 10.1111/1751-7915.12751.
- [126] D. B. Pavanelo *et al.*, “Comparative analysis of the midgut microbiota of two natural tick vectors of *Rickettsia rickettsii*,” *Dev. Comp. Immunol.*, vol. 106, no. December 2019, p. 103606, 2020, doi: 10.1016/j.dci.2019.103606.
- [127] R. Logares, “No Title,” *ramalok/amplicon_processing: Workflow for Analysing MiSeq Amplicons based on Uparse. Zenodo.*, 2017. <https://doi.org/10.5281/zenodo.259579>.
- [128] S. Nurk *et al.*, “Assembling single-cell genomes and mini-metagenomes from chimeric

- MDA products,” *J. Comput. Biol.*, vol. 20, no. 10, pp. 714–737, 2013, doi: 10.1089/cmb.2013.0084.
- [129] S. I. Nikolenko, A. I. Korobeynikov, and M. A. Alekseyev, “BAYESHAMMER: Bayesian subclustering for error correction in single cell sequencing,” *BMC Genomics*, vol. 14, no. Suppl 1, pp. 1–11, 2013, [Online]. Available: <http://www.biomedcentral.com/1471-2164/14/S1/S7>.
- [130] R. C. Edgar and H. Flyvbjerg, “Error filtering, pair assembly and error correction for next-generation sequencing reads,” *Bioinformatics*, vol. 31, no. 21, pp. 3476–3482, 2015, doi: 10.1093/bioinformatics/btv401.
- [131] R. Edgar, “UNOISE2: improved error-correction for Illumina 16S and ITS amplicon sequencing,” *bioRxiv*, 2016, doi: 10.1101/081257.
- [132] B. J. Callahan, K. Sankaran, J. A. Fukuyama, P. J. McMurdie, and S. P. Holmes, “Bioconductor workflow for microbiome data analysis: From raw reads to community analyses [version 1; referees: 3 approved],” *F1000Research*, vol. 5, no. 3, pp. 1–48, 2016, doi: 10.12688/F1000RESEARCH.8986.1.
- [133] R. C. Edgar, “Updating the 97% identity threshold for 16S ribosomal RNA OTUs,” *Bioinformatics*, vol. 34, no. 14, pp. 2371–2375, 2018, doi: 10.1093/bioinformatics/bty113.
- [134] S. F. Altschul, W. Gish, W. Miller, E. W. Myers, and D. J. Lipman, “Basic local alignment search tool,” *J. Mol. Biol.*, vol. 215, no. 3, pp. 403–410, 1990, doi: 10.1016/S0022-2836(05)80360-2.
- [135] J. Oksanen *et al.*, “Vegan: community ecology package. R package version 2.0-9,” 2013. <http://cran.r-project.org/package=vegan>.
- [136] M. Correa Deza, M. Grillo-Puertas, S. Salva, V. Rapisarda, C. Gerez, and G. Font de Valdez, “Inorganic salts and intracellular polyphosphate inclusions play a role in the thermotolerance of the immunobiotic *Lactobacillus rhamnosus* CRL 1505,” *PLoS One*, vol. 12, no. 6, 2017, [Online]. Available: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179242>.
- [137] J. Charan and N. Kantharia, “How to calculate sample size in animal studies?,” *J. Pharmacol. Pharmacother.*, vol. 4, no. 4, pp. 303–306, 2013, doi: 10.4103/0976-500X.119726.
- [138] Ø. Hammer, D. A. T. Harper, and P. D. Ryan, “Past: Paleontological statistics software package for education and data analysis,” *Palaeontol. Electron.*, vol. 4, no. 1, pp. 1–9, 2001.
- [139] J. B. Hughes *et al.*, “Counting the Uncountable : Statistical Approaches to Estimating Microbial Diversity MINIREVIEW Counting the Uncountable : Statistical Approaches to Estimating Microbial Diversity,” *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 10, no. 1, pp. 4399–4406, 2016, doi: 10.1128/AEM.67.10.4399.
- [140] C. E. Shannon, “A Mathematical Theory of Communication,” *Bell Syst. Tech. J.*, vol. 27, no. 3, pp. 379–423, 1948.
- [141] J. E. Blajman, C. G. Vinderola, M. S. Lingua, and M. L. Signorini, “A meta-analysis on the effectiveness of homofermentative and heterofermentative lactic acid bacteria for corn silage,” no. Muck 2010, pp. 1655–1669, 2018, doi: 10.1111/jam.14084.
- [142] J. E. Blajman, G. Vinderola, R. Páez, and M. L. Signorini, “The role of homofermentative and heterofermentative lactic acid bacteria for alfalfa silage: a meta-analysis,” *J. Agric. Sci.*, vol. 158, no. 1–2, pp. 107–118, 2020, doi: 10.1017/S0021859620000386.
- [143] C. L. McCary, D. Vyas, A. P. Faciola, and L. F. Ferraretto, “Graduate Student Literature

- Review: Current perspectives on whole-plant sorghum silage production and utilization by lactating dairy cows,” *J. Dairy Sci.*, vol. 103, no. 6, pp. 5783–5790, 2020, doi: 10.3168/jds.2019-18122.
- [144] M. G. Wilkinson, “Flow cytometry as a potential method of measuring bacterial viability in probiotic products: A review,” *Trends Food Sci. Technol.*, vol. 78, no. December 2017, pp. 1–10, 2018, doi: 10.1016/j.tifs.2018.05.006.
- [145] C. Signoretto, M. D. M. Lleò, M. C. Tafi, and P. Canepari, “Cell wall chemical composition of *Enterococcus faecalis* in the viable but nonculturable state,” *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 66, no. 5, pp. 1953–1959, 2000, doi: 10.1128/AEM.66.5.1953-1959.2000.
- [146] X. Zhao, J. Zhong, C. Wei, C. W. Lin, and T. Ding, “Current perspectives on viable but non-culturable state in foodborne pathogens,” *Front. Microbiol.*, vol. 8, no. APR, 2017, doi: 10.3389/fmicb.2017.00580.
- [147] B. Mayo, C. Rachid, A. Alegria, A. Leite, R. Peixoto, and S. Delgado, “Impact of Next Generation Sequencing Techniques in Food Microbiology,” *Curr. Genomics*, vol. 15, no. 4, pp. 293–309, 2014, doi: 10.2174/1389202915666140616233211.
- [148] Y. Li and N. Nishino, “Monitoring the bacterial community of maize silage stored in a bunker silo inoculated with *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus buchneri*,” *J. Appl. Microbiol.*, vol. 110, no. 6, pp. 1561–1570, 2011, doi: 10.1111/j.1365-2672.2011.05010.x.
- [149] B. Liu, Z. Yang, H. Huan, H. Gu, N. Xu, and C. Ding, “Impact of molasses and microbial inoculants on fermentation quality, aerobic stability, and bacterial and fungal microbiomes of barley silage,” *Sci. Rep.*, vol. 10, no. 1, pp. 1–10, 2020, doi: 10.1038/s41598-020-62290-7.
- [150] D. Gallagher, D. Parker, D. J. Allen, and N. Tsesmetzis, “Dynamic bacterial and fungal microbiomes during sweet sorghum ensiling impact bioethanol production,” *Bioresour. Technol.*, vol. 264, no. March, pp. 163–173, 2018, doi: 10.1016/j.biortech.2018.05.053.
- [151] M. L. Calle, “Statistical analysis of metagenomics data,” *Genomics and Informatics*, vol. 17, no. 1, 2019, doi: 10.5808/GI.2019.17.1.e6.
- [152] O. C. M. Queiroz, I. M. Ogunade, Z. Weinberg, and A. T. Adesogan, “Silage review : Foodborne pathogens in silage and their mitigation by silage additives 1,” *J. Dairy Sci.*, pp. 4132–4142, 2018, doi: 10.3168/jds.2017-13901.
- [153] J. Cheng *et al.*, “Genetic diversity and molecular epidemiology of outbreaks of *Klebsiella pneumoniae* mastitis on two large Chinese dairy farms,” *J. Dairy Sci.*, vol. 104, no. 1, pp. 762–775, 2021, doi: 10.3168/jds.2020-19325.
- [154] M. P. Podder, L. Rogers, P. K. Daley, G. P. Keefe, H. G. Whitney, and K. Tahlan, “*Klebsiella* species associated with bovine mastitis in Newfoundland,” *PLoS One*, vol. 9, no. 9, pp. 1–5, 2014, doi: 10.1371/journal.pone.0106518.
- [155] M. A. Munoz, F. L. Welcome, Y. H. Schukken, and R. N. Zadoks, “Molecular epidemiology of two *Klebsiella pneumoniae* mastitis outbreaks on a dairy farm in New York State,” *J. Clin. Microbiol.*, vol. 45, no. 12, pp. 3964–3971, 2007, doi: 10.1128/JCM.00795-07.
- [156] C. Hill *et al.*, “Expert consensus document: The international scientific association for probiotics and prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic,” *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.*, 2014, doi: 10.1038/nrgastro.2014.66.
- [157] M. L. Marco *et al.*, “The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISSAP) consensus statement on fermented foods,” *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.*,

- 2021, [Online]. Available: <https://doi.org/10.1038/s41575-020-00390-5>.
- [158] I. Soundharrajan, D. Kim, P. Kuppusamy, K. Muthusamy, H. J. Lee, and K. C. Choi, "Probiotic and triticale silage fermentation potential of *pediococcus pentosaceus* and *lactobacillus brevis* and their impacts on pathogenic bacteria," *Microorganisms*, vol. 7, no. 9, pp. 1–19, 2019, doi: 10.3390/microorganisms7090318.
- [159] J. W. F. W. Wu, M. Redondo-Solano, L. Uribe, R. W. Ching-Jones, J. Usaga, and N. Barboza, "First characterization of the probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from Costa Rican pineapple silages," *PeerJ*, vol. 9, pp. 1–26, 2021, doi: 10.7717/peerj.12437.
- [160] M. F. Zacarías, J. Reinheimer, L. Forzani, C. Grangette, and G. Vinderola, "Mortality and translocation assay Zacarías, M. F., Reinheimer, J., Forzani, L., Grangette, C., & Vinderola, G. (2014). Mortality and translocation assay to study the protective capacity of *Bifidobacterium lactis* INL1 against *Salmonella Typhimurium* infecti," *Benef. Microbes*, vol. 5, no. 4, pp. 427–436, 2014, doi: 10.3920/BM2013.0086.
- [161] A. von Wright and L. Axelsson, "Lactic Acid Bacteria," in *Lactic Acid Bacteria. Microbiological and Functional Aspects*, Fifth Edit., G. Vinderola, A. C. Ouwehand, S. Salminen, and A. von Wright, Eds. 2019, pp. 1–17.
- [162] W. Sybesma, R. Kort, and Y.-K. Lee, "Locally sourced probiotics, the next opportunity for developing countries?," *Trends Biotechnol.*, vol. 33, no. 4, pp. 197–200, Jul. 2015, doi: 10.1016/j.tibtech.2015.01.002.
- [163] D. Rasika *et al.*, "Plant-based milk substitutes as emerging probiotic carriers," *Curr. Opin. Food Sci.*, vol. 38, pp. 8–20, 2021, doi: 10.1016/j.cofs.2020.10.025.
- [164] G. Vinderola, C. de los Reyes-Gavilán, and J. Reinheimer, "Probiotics and prebiotics in fermented dairy products," in *Contemporary Food Engineering*, C. P. Ribeiro and M. L. Passos, Eds. CRC Press - Taylor & Francis Group, 2009, pp. 601–634.
- [165] A. L. Jorjão, F. E. De Oliveira, M. V. P. Leão, C. A. T. Carvalho, A. O. C. Jorge, and L. D. De Oliveira, "Live and Heat-Killed *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 May Induce Modulatory Cytokines Profiles on Macrophages RAW 264.7," *Sci. World J.*, vol. 2015, 2015, doi: 10.1155/2015/716749.
- [166] F. L. Seleet, F. M. Assem, M. A. M. Abd El-Gawad, N. M. Dabiza, and M. H. Abd El-Salam, "Development of a novel milk-based fermented product fortified with wheat germ," *Int. J. Dairy Technol.*, vol. 69, no. 2, pp. 217–224, 2016, doi: 10.1111/1471-0307.12241.
- [167] A. Sisto and P. Lavermicocca, "Suitability of a probiotic *Lactobacillus paracasei* strain as a starter culture in olive fermentation and development of the innovative patented product 'probiotic table olives,'" *Front. Microbiol.*, vol. 3, p. 174, 2012, doi: 10.3389/fmicb.2012.00174.
- [168] Y.-T. J. Lin, ChouChein-Chin, and C.-Y. S. Hsu, "Effects of *Lactobacillus casei* Shirota intake on caries risk in children," *J. Dent. Sci.*, vol. 12, no. 2, pp. 179–184, 2017, doi: 10.1016/j.jds.2016.09.005.
- [169] J. P. Tamang *et al.*, "Fermented foods in a global age: East meets West," *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, vol. 19, no. 1, pp. 184–217, 2020, doi: 10.1111/1541-4337.12520.
- [170] G. Vinderola, M. Gueimonde, C. Gomez-Gallego, L. Delfederico, and S. Salminen, "Correlation between in vitro and in vivo assays in selection of probiotics from traditional species of bacteria," *Trends Food Sci. Technol.*, vol. 68, pp. 83–90, 2017, [Online]. Available: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.08.005>.

- [171] J. Plaza-diaz, F. J. Ruiz-ojeda, M. Gil-campos, and A. Gil, "Mechanisms of Action of Probiotics," *Adv. Nutr.*, vol. 10, pp. 49–66, 2019, doi: 10.1093/advances/nmy063.
- [172] R. Ashraf, T. Vasiljevic, S. L. Day, S. C. Smith, and O. N. Donkor, "Lactic acid bacteria and probiotic organisms induce different cytokine profile and regulatory T cells mechanisms," *J. Funct. Foods*, pp. 1–15, 2013, doi: 10.1016/j.jff.2013.11.006.
- [173] M. Gueimonde and S. Salminen, "New methods for selecting and evaluating probiotics," *Dig. Liver Disease*, vol. 38, pp. 242–247, 2006.
- [174] B. Foligne *et al.*, "Correlation between in vitro and in vivo immunomodulatory properties of lactic acid bacteria," *World J. Gastroenterol.*, vol. 13, no. 2, pp. 236–243, 2007, [Online]. Available: <https://doi.org/10.3748/wjg.v13.i2.236>.
- [175] A. K. Azad, M. Sarker, and D. Wan, "Immunomodulatory Effects of Probiotics on Cytokine Profiles," *Biomed Res. Int.*, vol. 2018, pp. 1–10, 2018, [Online]. Available: <http://doi.org/10.1155/2018/8063647>.
- [176] L. C. Yu, "Microbiota dysbiosis and barrier dysfunction in inflammatory bowel disease and colorectal cancers: exploring a common ground hypothesis," *J. Biomed. Sci.*, pp. 1–14, 2018, [Online]. Available: <https://doi.org/10.1186/s12929-018-0483-8>.
- [177] G. Giorgetti *et al.*, "Interactions between Innate Immunity, Microbiota, and Probiotics," *J. Immunol. Res.*, vol. 2015, pp. 1–7, 2015, doi: 10.1155/2015/501361.
- [178] M. Narazaki and T. Kishimoto, "The two-faced cytokine IL-6 in host defense and diseases," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 19, no. 11, 2018, doi: 10.3390/ijms19113528.
- [179] K.-Y. Park and B. K. Kim, "Lactic Acid Bacteria in Vegetable Fermentations," in *Lactic Acid Bacteria*, Fifth Edit., G. Vinderola, A. Ouwehand, S. Salminen, and A. von Wright, Eds. 2019, pp. 255–273.
- [180] M. Gupta and B. K. Bajaj, "Development of fermented oat flour beverage as a potential probiotic vehicle," *Food Biosci.*, vol. 20, no. September 2016, pp. 104–109, 2017, doi: 10.1016/j.fbio.2017.08.007.
- [181] O. Mårtensson *et al.*, "Fermented, ropy, oat-based products reduce cholesterol levels and stimulate the bifidobacteria flora in humans," *Nutr. Res.*, vol. 25, no. 5, pp. 429–442, 2005, doi: 10.1016/j.nutres.2005.03.004.
- [182] O. Mårtensson, C. Andersson, K. Andersson, R. Öste, and O. Holst, "Formulation of an oat-based fermented product and its comparison with yoghurt," *J. Sci. Food Agric.*, vol. 81, no. 14, pp. 1314–1321, 2001, doi: 10.1002/jfsa.947.
- [183] Y. Jiang and Z. Yang, "A functional and genetic overview of exopolysaccharides produced by *Lactobacillus plantarum*," *J. Funct. Foods*, vol. 47, pp. 229–240, 2018, doi: 10.1016/j.jff.2018.05.060.
- [184] A. Vitlic *et al.*, "Isolation and characterization of a high molecular mass β -glucan from *Lactobacillus fermentum* Lf2 and evaluation of its immunomodulatory activity," *Carbohydr. Res.*, vol. 476, pp. 44–52, Apr. 2019, doi: 10.1016/j.carres.2019.03.003.
- [185] D. I. Tiwari ON, Sasmal S, Kataria AK, "Application of microbial extracellular carbohydrate polymeric substances in food and allied industries," *3 Biotech*, vol. 10, no. 5, p. 221, 2020, doi: 10.1007/s13205-020-02200-w.
- [186] R. B. Nambiar, P. S. Sellamuthu, A. B. Perumal, E. R. Sadiku, G. Phiri, and J. Jayaramudu, "Characterization of an exopolysaccharide produced by *Lactobacillus plantarum* HM47 isolated from human breast milk," *Process Biochem.*, vol. 73, pp. 15–22, 2018, doi: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.07.018>.

- [187] J. Wang, X. Zhao, Y. Yang, A. Zhao, and Z. Yang, "Characterization and bioactivities of an exopolysaccharide produced by *Lactobacillus plantarum* YW32," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 74, pp. 119–126, 2015, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2014.12.006.
- [188] D. Das, R. Baruah, and A. Goyal, "A food additive with prebiotic properties of an α -D-glucan from *Lactobacillus plantarum* DM5," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 69, pp. 20–26, 2014, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2014.05.029.
- [189] E. C. Ale *et al.*, "Functional properties of exopolysaccharide (EPS) extract from *Lactobacillus fermentum* Lf2 and its impact when combined with *Bifidobacterium animalis* INL1 in yoghurt," *Int. Dairy J.*, vol. 96, pp. 114–125, Sep. 2019, doi: 10.1016/j.idairyj.2019.04.014.
- [190] A. Septembre-Malaterre, F. Remize, and P. Poucheret, "Fruits and vegetables, as a source of nutritional compounds and phytochemicals: Changes in bioactive compounds during lactic fermentation," *Food Res. Int.*, vol. 104, no. 2018, pp. 86–99, 2018, doi: 10.1016/j.foodres.2017.09.031.
- [191] G. Reid, A. A. Gadir, and R. Dhir, "Probiotics: Reiterating what they are and what they are not," *Front. Microbiol.*, vol. 10, no. 424, 2019, doi: 10.3389/fmicb.2019.00424.
- [192] D. Montrose and M. Floch, "Probiotic used in human studies," *J. Clin. Gastroenterol.*, vol. 39, no. 6, pp. 469–484, 2005, doi: 10.1097/01.mcg.0000165649.32371.71.
- [193] K. Han *et al.*, "Contrasting effects of fresh and fermented kimchi consumption on gut microbiota composition and gene expression related to metabolic syndrome in obese Korean women.," *Mol. Nutr. Food Res.*, vol. 59, no. 5, pp. 1004–1008, 2015, doi: 10.1002/mnfr.201400780.
- [194] C. L. Franklin and A. C. Ericsson, "Microbiota and reproducibility of rodent models," *Lab Anim.*, vol. 46, no. 4, pp. 114–122, 2017, doi: 10.1038/labana.1222.
- [195] O. R. Nilsson, L. Kari, and O. Steele-Mortimer, "Foodborne infection of mice with *Salmonella* Typhimurium," *PLoS One*, vol. 14, no. 8, pp. 4–15, 2019, doi: 10.1371/journal.pone.0215190.
- [196] J. M. Wells *et al.*, "Homeostasis of the gut barrier and potential biomarkers," *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.*, vol. 312, no. 3, pp. 171–193, 2017, doi: 10.1152/ajpgi.00048.2015.
- [197] T. Tanaka, M. Narazaki, and T. Kishimoto, "Regulation of IL-6 in Immunity and Diseases," *Adv. Exp. Med. Biol.*, vol. 941, pp. 79–88, 2016, doi: 10.1007/978-94-024-0921-5_4.
- [198] C. Andrews, M. H. McLean, and S. K. Durum, "Cytokine tuning of intestinal epithelial function," *Front. Immunol.*, vol. 9, no. 1270, 2018, doi: 10.3389/fimmu.2018.01270.
- [199] V. C. D. C. Rodrigues *et al.*, "Modulation of the intestinal microbiota and the metabolites produced by the administration of ice cream and a dietary supplement containing the same probiotics," *Br. J. Nutr.*, pp. 1–12, 2020, doi: 10.1017/S0007114520000896.
- [200] S. A. J. Schmidt, S. Lo, and L. M. Hollestein, "Research Techniques Made Simple: Sample Size Estimation and Power Calculation," *J. Invest. Dermatol.*, vol. 138, no. 8, pp. 1678–1682, 2018, doi: 10.1016/j.jid.2018.06.165.

MATERIAL SUPLEMENTARIO

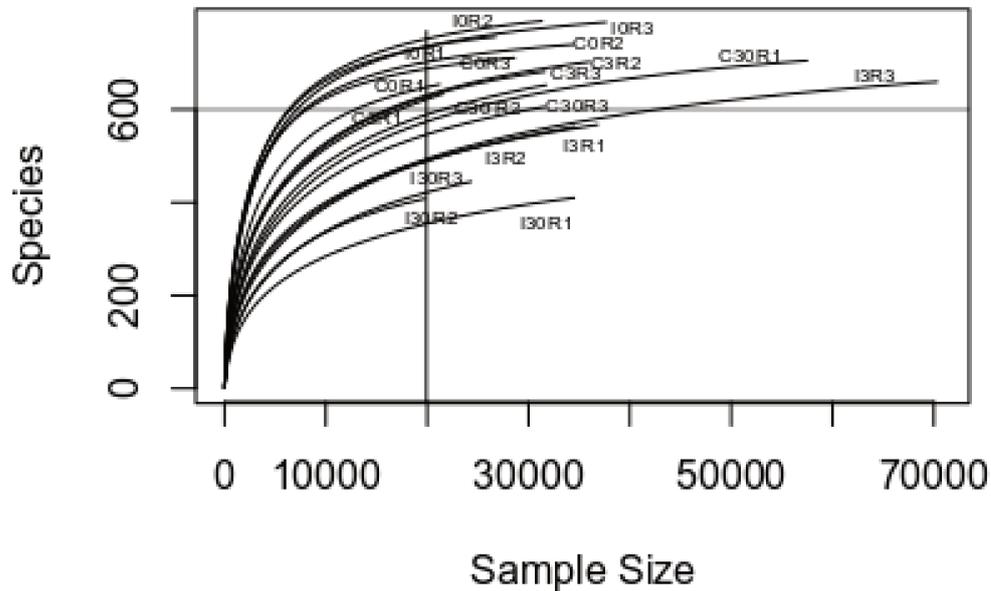


Figura S1 - Curva de rarefacción de la secuenciación 16S ARNr de las muestras. La longitud de las curvas refleja la cobertura de la variable secuenciación por muestra. Muestras de silos de sorgo control (sin inocular) e inoculados con *L. plantarum* LpAv, *L. paracasei* LcAv y *P. pentosaceus* PpM1 antes de la fermentación ($t = 0$) y luego de 30 días. Ensilado control al tiempo 0 (C0), 3 (C3) y 30 días (C30) e inoculado al tiempo 0 (I0), 3 (I3) y 30 días (I30). R1, R2 y R3 en cada muestra indican el número de replicado. Todos los ensilajes se realizaron por triplicado.

Tabla S1 – Número de secuencias generadas por muestra antes y después del filtrado de calidad y número de OTUs obtenidos en cada muestra. Ensilado control al tiempo 0 (C0), 3 (C3) y 30 días (C30) e inoculado al tiempo 0 (I0), 3 (I3) y 30 días (I30). R1, R2 y R3 en cada muestra indican el número de replicado. Todos los ensilajes se realizaron por triplicado.

Muestra	Reads F	Reads R	Reads luego de eliminación del cebador F	Reads luego de eliminación del cebador R	Reads pareadas	Reads luego del control de calidad	zOTUS	zOTUS bacterianos
CO R1	71184	71184	68086	68086	64157	28636	617	595
CO R2	142405	142405	139263	139263	130180	65721	711	649
CO R3	135507	135507	133690	133690	125977	65229	682	651
I0 R1	137296	137296	136275	136275	128806	67709	719	693
I0 R2	127837	127837	125839	125839	119540	57222	754	711
I0 R3	157276	157276	154547	154547	142486	60933	745	684
C3 R1	65800	65800	64593	64593	59613	25025	590	573
C3 R2	90341	90341	89096	89096	84666	41342	653	591
C3 R3	81757	81757	81282	81282	77288	37813	632	586
I3 R1	87448	87448	86919	86919	82178	40309	521	439
I3 R2	82313	82313	81847	81847	77567	37809	515	437
I3 R3	157439	157439	156386	156386	147863	75375	607	429
C30 R1	122574	122574	121845	121845	115641	59033	648	534
C30 R2	69596	69596	69152	69152	65948	33472	555	488
C30 R3	71411	71411	69682	69682	65687	33125	599	541
I30 R1	73482	73482	72512	72512	69196	36178	370	317
I30 R2	48606	48606	47575	47575	44110	21131	372	369
I30 R3	57074	57074	56600	56600	53355	25628	404	384