



Control biológico de *Aspergillus flavus* en silos de sorgo

Lic. MSc. Mariana Gonda

*Tesis de Doctorado en Biotecnología
Posgrado en Biotecnología*

Facultad de Ciencias-UdelaR, Febrero 2022

Directores de tesis:

Dra. Silvana Vero | Dra. Caterina Rufo | Dr. José Luis González Andújar

Asesor externo:

Dra María Del Carmen García y Santos



Control biológico de *Aspergillus flavus* en silos de sorgo

Lic. MSc. Mariana Gonda

Trabajo presentado al Posgrado en Biotecnología de Facultad de Ciencias de la Universidad de la República, como parte de los requisitos necesarios para la obtención del título de **Doctor en Biotecnología**.

Directores de tesis

Dra. Silvana Vero

Dra. Caterina Rufo

Dr. José Luis González Andújar

Tribunal evaluador

Dra. Sandra Alaniz

Dra. Paula Rodríguez

Dra. Susana Tiscornia

Posgrado en Biotecnología
Área Microbiología – Facultad de Química
Universidad de la República

Montevideo – Uruguay
Febrero 2022

AGRADECIMIENTOS

A Silvana, gracias por la dedicación incondicional no sólo a este trabajo sino a mi formación académica. Gracias por el tiempo de discusión, por escuchar mis ideas, por las oportunidades dadas, por siempre impulsarme a más y sacar lo mejor de mí. Gracias por tu calidez humana, por el apoyo y la energía en todo momento.

A Caterina, gracias por hacerme sentir parte del Laboratorio de Alimentos, por el tiempo dedicado, por la disponibilidad y la disposición en todo momento a lo largo de este trabajo.

A José Luis, por abrirme las puertas de su laboratorio en Córdoba y aceptar ser co-tutor de la tesis. A Eva, Verónica y Valle mis compañeras de laboratorio durante la pasantía.

A Carmen, quien me enseñó sobre el sorgo de grano húmedo y a Anita que colaboró en los inicios de este trabajo.

A las Dras. Sandra Alaniz, Paula Rodríguez y Susana Tiscornia, por su disposición para integrar el Tribunal de esta tesis.

A la Dra. Angela León quien introdujo a nuestro grupo de investigación en el mundo del kefir. Gracias por abrirme las puertas de tu laboratorio en La Plata, por donarnos los gránulos y enseñarnos sobre ellos.

Al Dr. Michael Wisniewski quien colaboró con los estudios de secuenciación masiva, los cuales se realizaron en su laboratorio en EE.UU.

A las agencias financiadoras, CAP por las Becas de Doctorado y de Finalización que me permitieron realizar este trabajo, ANII por financiar la pasantía en Córdoba, España, AUGM por la financiación de la pasantía en La Plata, Argentina y al Posgrado en Biotecnología por la alícuota a estudiantes.

A la Ing. Agr. Verónica Goñi que me facilitó la toma de muestras de los silos de grano húmedo de sorgo.

Al grupo de Alimentos del Polo Tecnológico de Pando, gracias por hacerme sentir parte del laboratorio, en especial a Giannina y Sole por el servicio de correo, de liofilización y sobre todo por ser buenas compañeras.

A mis compañeros del Área Microbiología, quienes de una forma u otra han colaborado con mi formación a lo largo de este tiempo, por todas las instancias compartidas, por el buen ambiente de trabajo y por aguantar mis momentos de falta de paciencia.

Un agradecimiento especial a mis compañeras del Laboratorio de Biotecnología, un excelente grupo humano. Gracias por permitirme tener uno de los lugares de prioridad para acceder al laboratorio en épocas de pandemia, por entender mi “esta semana largo silos”, por mis despliegues en la mesada, por las risas, los momentos de poca paciencia y el ánimo. Gracias por ser familia.

Quiero agradecer en especial a Angie y a Eri por su buena disposición siempre para dar una mano y ayudarme a salir del paso, gracias por ser tan buenas compañeras.

También quiero agradecer a aquellas personas que me acompañaron de una forma especial en la realización de este trabajo. A mis amigos Vir, Isa, Noe, Pao, Tefa, Mery y Mauri gracias por siempre impulsarme y acompañarme.

A mis padres y a mis hermanos, por su apoyo incondicional, por acompañarme, compartir mis alegrías, por estar presentes y animarme en los momentos difíciles, por creer en mí. A mamá por sus viandas en este tiempo de escritura, a papá por el impulso que me faltaba para aceptar el desafío del doctorado.

A Nacho, mi amor y mi hogar, por aprender a vivir con una estudiante de doctorado, por entender mis estados de ánimo, por cocinarme, por brindarme calma, acompañarme y apoyarme. La escritura no hubiese sido lo mismo sin vos.

Al resto de mi familia, que sin entender mucho que es bien lo que hago siempre se preocupan y me acompañan.

Espero no olvidarme de nadie. A todos los que participaron en este trabajo ¡muchas gracias!

RESUMEN

Los granos de sorgo se utilizan en la alimentación animal como suplemento energético. Para lograr su conservación sin utilizar secado, se recurre al almacenamiento en silos de grano húmedo, estrategia que permite mantener el valor nutritivo del material.

Los silos pueden presentar problemas de contaminación fúngica, que impactan negativamente en los parámetros de calidad y significan un riesgo potencial para la salud animal ya que los hongos contaminantes pueden ser productores de micotoxinas. Para evitar el desarrollo de estos y otros microorganismos no deseados se recurre al uso de inoculantes microbianos, capaces de actuar como controladores biológicos impidiendo las pérdidas de calidad e inocuidad. Trabajos realizados en silos de grano húmedo de sorgo en Uruguay mostraron que el contaminante fúngico más frecuente fue *Aspergillus flavus*. Esta especie es productora de aflatoxinas, metabolitos secundarios carcinogénicos y mutagénicos.

El objetivo de este trabajo fue conocer el comportamiento de *A. flavus* en silos de grano húmedo de sorgo, en diferentes condiciones de temperatura y humedad, y obtener un inóculo mixto de bacterias lácticas y levaduras capaz de inhibir el crecimiento de dicho hongo en los silos.

Para estudiar las variables que afectan el comportamiento de *A. flavus* y la producción de aflatoxina B1 en la matriz de trabajo se utilizó un diseño de mini-silos a escala de laboratorio. Se realizó un diseño central compuesto utilizando como variables la humedad, la temperatura, el inóculo inicial y el tiempo. A su vez se modeló el crecimiento de *A. flavus* a diferentes temperaturas en este sistema. Las condiciones óptimas de producción de aflatoxina B1 observadas fueron 25 °C, 30% de humedad y 6 días. La curva de producción de aflatoxina B1 en estas condiciones mostró que a las 48 horas la concentración de aflatoxina B1 excedía el límite permitido, mostrando la necesidad de utilizar aditivos para inhibir el crecimiento de este hongo en silos.

Como potenciales microorganismos inoculantes se aislaron bacterias lácticas y levaduras de silobolsa y de kefir de agua. Estudios de biocontrol realizados en este trabajo mostraron que al tratar con kefir de agua al sorgo contaminado con *A. flavus*, se lograba una inhibición del crecimiento de este hongo de 99%. Por esta razón se aislaron los microorganismos presentes y se estudió la comunidad microbiana del kefir por secuenciación masiva antes y después de incubar los tratamientos en mini-silos contaminados.

Los ensayos de biocontrol de *A. flavus* realizados en mini-silos con los microorganismos aislados o una combinación de estos no lograron inhibir el crecimiento, a excepción de la cepa *Saccharomyces cerevisiae* aislada del kefir de agua, la cual logró una inhibición del 82%.

Finalmente, se logró obtener un inóculo definido que inhibió el crecimiento de *A. flavus* en un 99%, combinando los microorganismos aislados del kefir de agua, *Lactobacillus ghanensis*, *Lactobacillus paracasei*, *Gluconacetobacter dulcium*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia membranifaciens*, con los compuestos solubles presentes en el kefir de agua estéril liofilizado.

Dado que los inoculantes de silos de grano húmedo que se utilizan en nuestro país son importados, es importante destacar que en la presente tesis se realizaron los primeros estudios para poder desarrollar un inoculante de silos de grano húmedo de sorgo nacional.

ÍNDICE

I.INTRODUCCIÓN GENERAL	1
I.1. Silo de grano húmedo.....	1
I.2. Proceso de ensilaje en silobolsa.....	5
I.3. Problemas en el ensilaje	8
I.4. <i>Aspergillus flavus</i>	13
I.5. Aditivos para ensilaje.....	14
I.6. Problema para abordar en este trabajo	17
II.1 OBJETIVO GENERAL	18
II.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
II.3 ESTRUCTURA DE LA TESIS	18
III.1 – CAPÍTULO I: Crecimiento de <i>A. flavus</i> y producción de AFB1 en mini-silos de sorgo	
INTRODUCCIÓN.....	20
III.1.1. Fase aerobia	20
III.1.2. Aflatoxinas	21
III.1. 3. Diferentes variables que afectan a la producción de aflatoxina B1 por <i>A. flavus</i>	23
III.1.4. Diseño de mini-silos experimentales de grano húmedo de sorgo	25
III.2 OBJETIVO GENERAL	27
III.2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
III.3 MATERIALES Y MÉTODOS	27
III.3.1. Microorganismo	27
III.3.2 Puesta a punto del método de extracción y cuantificación de aflatoxinas en sorgo mediante HPLC.....	27
III.3.3. Puesta a punto de una metodología de PCR en tiempo real para cuantificar ADN de <i>A. flavus</i> en sorgo.....	29
III.3.4. Diseño de mini-silos experimentales de grano húmedo de sorgo	30
III.3.5. Estudio de las variables que afectan y optimizan la producción de aflatoxina B1.....	30
III.3.6. Modelado de curvas de crecimiento a diferentes temperaturas.....	32
III.4 RESULTADOS	34
III.4.1. Puesta a punto de un método de HPLC para cuantificar aflatoxina B1 en sorgo	34
III.4.2. Puesta a punto de una metodología de PCR en tiempo real para cuantificar ADN de <i>A. flavus</i> en mini-silos de sorgo	36
III.4.3. Estudio de las variables que afectan y optimizan la producción de AFB1	39
III.4.4. Curva de crecimiento de <i>A. flavus</i> y cuantificación de AFB1 en las óptimas condiciones de producción.....	41
III.4.5. Modelado de curvas de crecimiento a diferentes temperaturas.....	42
III.5 DISCUSIÓN.....	46

III.5.1. Desarrollo de una metodología de PCR en tiempo real para cuantificar ADN de <i>A. flavus</i> en mini-silos de sorgo	46
III.5.2. Cuantificación de aflatoxina B1 en mini-silos de grano húmedo de sorgo.....	47
III.5.3. Variables que inciden sobre la producción de AFB1 en silos de grano húmedo de sorgo	47
III.5.4. Modelos de crecimiento de <i>A. flavus</i>	49
IV.1. – CAPÍTULO II: Control Biológico de <i>A. flavus</i> en mini-silos de sorgo	
INTRODUCCIÓN.....	51
IV.1.1. Control biológico	51
IV.1.2. Inoculantes microbianos	52
IV.1.3. Kefir de Agua.....	56
IV.2 OBJETIVO GENERAL.....	60
IV.2.1. Objetivos específicos.....	60
IV.3 MATERIALES Y MÉTODOS.....	60
IV.3.1. Aislamiento de bacterias ácido lácticas (BAL) y levaduras de silos de grano húmedo de sorgo.....	60
IV.3.2. Identificación de levaduras.....	61
IV.3.3. Identificación de bacterias.....	61
IV.3.4. Identificación de <i>Lactobacillus</i> spp.	62
IV.3.5. Análisis filogenético.....	62
IV.3.6. Pruebas fenotípicas para identificación de bacterias.....	63
IV.3.7. Ensayos de Biocontrol con Kefir de agua.....	64
IV.3.8. Ensayos de control biológico en mini-silos a partir de inóculos seleccionados.....	67
IV.3.9. Evaluación del crecimiento de diferentes inóculos en mini-silos de grano húmedo de sorgo.....	70
IV.3.10. Estudio de la capacidad de crecimiento a partir de lactato como fuente de carbono ...	71
IV.4 RESULTADOS.....	72
IV.4.1. Aislamiento y caracterización de bacterias lácticas y levaduras de silobolsas de grano húmedo de sorgo.	72
IV.4.2. Biocontrol de <i>A. flavus</i> en mini-silos de sorgo con bacterias lácticas aisladas de silobolsa	73
IV.4.3. Biocontrol de <i>A. flavus</i> en minisilos de sorgo con kefir de agua.....	73
IV.4.4. Análisis de la comunidad microbiana del KA.	74
IV.4.5. Análisis microbiológico de los mini-silos T1.....	80
IV.4.6. Identificación de bacterias ácido lácticas y levaduras provenientes de silobolsa y de kefir	81
IV.4.7. Estudio de la capacidad de crecimiento a partir de lactato como fuente de carbono	88

IV.4.8. Ensayos de control biológico en mini-silos a partir de inóculos seleccionados utilizando los aislamientos obtenidos del KA	90
IV.5. DISCUSIÓN	96
IV.5.1. Biocontrol de <i>A. flavus</i> en minisilos de sorgo con microorganismos epífitos	96
IV.5.2. Biocontrol con KA en mini-silos	100
IV.5.3. Análisis de la comunidad microbiana del kefir de agua	101
IV.5.4. Ensayos de control biológico en mini-silos a partir de inóculos seleccionados utilizando los aislamientos obtenidos del KA	104
V. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	108
VI. BIBLIOGRAFÍA	109
ANEXO 1. Matriz del Diseño Central Compuesto	122
ANEXO 2. Medios de cultivo	123
ANEXO 3. PUBLICACIÓN	124

ÍNDICE DE FIGURAS

I. Introducción general

Figura I.1.1 Producción y rendimiento de grano húmedo y grano seco de sorgo en Uruguay.....	2
Figura I.1.2. Tipos de silos de grano húmedo.....	4
Figura I.1.3. Llenado de un silobolsa para realizar un silo de grano húmedo de sorgo.....	5
Figura I.1.4. Etapas del proceso de ensilaje. Los días se consideran a partir del día 0 en donde se arma el silo.....	6

III. Capítulo I: Crecimiento de *A. flavus* y producción de AFB1 en mini-silos de sorgo

Figura III.1.1 Estructura de las aflatoxinas encontradas en la naturaleza.....	22
Figura III.1.2 Isotermas de adsorción de humedad de mezclas de granos molidos de amaranto y sorgo a 25 °C, 30 °C y 35 °C.....	24
Figura III.3.1. Mini-silos de grano húmedo de sorgo.....	30
Figura III.4.1. Curva de calibración para la cuantificación de AFB1 por el método de HPLC.....	34
Figura III.4.2. Cromatograma de la solución del estándar de aflatoxina a una concentración de 500 ng/g....	35
Figura III.4.3. Cromatograma del extracto de sorgo de alto tanino sin inocular derivatizado.....	35
Figura III.4.4. Cromatograma de la muestra derivatizada correspondiente al ensayo 26 del diseño central compuesto diluido 1/50.....	36
Figura III.4.5. Curva estándar de concentración de ADN de <i>A. flavus</i> PJA en función de los valores de Ct obtenidos.....	37
Figura III.4.6. Curva de fluorescencia adquirida en función de ciclos de amplificación de ADN de <i>A. flavus</i> PJA.	37
Figura III.4.7. Curva de melting para el producto de amplificación de <i>A. flavus</i> PJA.....	38
Figura III.4.8. Curva de fluorescencia en función de los ciclos de amplificación para diluciones al décimo de ADN de <i>A. flavus</i> en agua y en matriz.....	39
Figura III.4.9. Gráfico de superficie de respuesta en función de la humedad y la temperatura para la producción de AFB1 en los mini-silos de grano húmedo de sorgo.....	41
Figura III.4.10. Curva de crecimiento de <i>A. flavus</i> en mini-silos de grano húmedo de sorgo con 30% de humedad incubados a 25 °C.....	41
Figura III.4.11. Cuantificación de AFB1 en mini-silos de grano húmedo de sorgo con 30% de humedad incubados a 25 °C.....	42
Figura III.4.12. a. Curva de crecimiento a 15 °C ajustada con el modelo de Gompertz.....	44
Figura III.4.12. b. Curva de crecimiento a 20 °C ajustada con el modelo de Gompertz.....	44
Figura III.4.12. c. Curva de crecimiento a 25 °C ajustada con el modelo de Gompertz.....	44
Figura III.4.12. d. Curva de crecimiento a 30 °C ajustada con el modelo de Gompertz.....	45
Figura III.4.13. μ máx en función de la temperatura (°C).....	45
Figura III.5.1. Ciclo de amplificación del ADN de <i>A. flavus</i> por PCR en tiempo real.....	46

IV. Capítulo II: Control Biológico de *A. flavus* en mini-silos de sorgo

Figura IV.4.1. Recuentos a tiempo 0 y a los 7 días de incubación de los mini-silos inoculados con los aislamientos B, Da, C.....	72
Figura IV.4.2. % de crecimiento de <i>A. flavus</i> tratado con los aislamientos B, C y Da con respecto al control.....	73
Figura IV.4.3. % de crecimiento de <i>A. flavus</i> en el tratamiento T1 y T2 con respecto al control.....	74
Figura IV.4.4. Mini-silos experimentales de grano húmedo de sorgo abiertos luego de 7 días de incubación a 25 °C	74
Figura IV.4.5. Curvas de rarefacción de la secuencia parcial del gen que codifica para el ARNr 16S de bacterias antes de la incubación (A) y después de la incubación (B).....	75
Figura IV.4.6 Curvas de rarefacción para la secuencia parcial de la región fúngica ITS antes (A) y después (B) de la incubación.	76
Figura IV.4.7. Abundancia relativa de la comunidad fúngica a nivel de especie.	76
Figura IV.4.8. Abundancia filogenética a nivel de filo (a) y de género (b) para la comunidad bacteriana.....	77
Figura IV.4.10. Porcentaje de secuencias asignadas a las diferentes OTUs en el total de las secuencias del género <i>Lactobacillus</i> obtenidas de los mini-silos T1 antes y después de la incubación.	78
Figura IV.4.9. Árbol filogenético de las secuencias de OTUs del género <i>Lactobacillus</i> . El árbol se construyó utilizando el método de neighbor-joining.....	79
Figura IV.4.11. a) Recuento en placa de bacterias ácido-lácticas y acéticas por gramo de sorgo en condiciones aerobias y anaerobias. b) Recuento en placa de levaduras por gramo de sorgo en condiciones aerobias y anaerobias.	80
Figura IV.4.12. Árbol filogenético basado en la secuencia parcial del ADNr 16S de los aislamientos de silobolsas de sorgo (B, C, Da) y de KA (E1, E2, ANRB1, ANRB2) para el género <i>Lactobacillus</i> spp.....	83
Figura IV.4.13. Árbol filogenético basado en la secuencia de la región que codifica para la subunidad alfa de la fenilalanil-tRNA sintetasa (pheS) de los aislamientos de silobolsas de sorgo (B, C, Da) y del KA (E1, E2, ANRB1, ANRB2) de <i>Lactobacillus</i> spp.	84
Figura IV.4.14. Árbol filogenético basado en secuencias D1/D2 de los aislamientos de silo-bolsas de sorgo (Lev1, Lev2, Lev3) y del KA (SC1, SC2) para el género <i>Saccharomyces</i> spp.	86
Figura IV.4.15. Árbol filogenético basado en secuencias D1/D2 de los aislamientos de los de silo-bolsas de sorgo (Lev4 y Lev5) y del KA (PM1, PM2) para el género <i>Pichia</i> spp. y <i>Wickerhamomyces</i> spp.....	87
Figura IV.4.16. % de crecimiento de <i>A. flavus</i> en los mini silos tratados con respecto al control para los tratamientos 3, 4 y 5.....	91
Figura IV.4.17. % de crecimiento de <i>A. flavus</i> en los mini silos tratados con respecto al control para los tratamientos 6, 7, 8 y 9.	92
Figura IV.4.18. Recuentos a tiempo 0 y a los 7 días de incubación del tratamiento con a) inóculo 2, Bacterias anaerobias: <i>L. ghanensis</i> E, <i>L. paracasei</i> ANRB; bacterias aerobias: <i>L. paracasei</i> ANRB, <i>G. dulcium</i> AR2C. b) inóculo 4 Bacterias anaerobias: <i>L. ghanensis</i> E, <i>L. paracasei</i> ANRB; levaduras <i>S. cerevisiae</i> , <i>P. membranifaciens</i>	93
Figura IV.4.19. % de crecimiento de <i>A. flavus</i> en los mini silos tratados con respecto al control para los tratamientos 10 y 11.....	94
Figura IV.4.20. % de crecimiento de <i>A. flavus</i> en los mini silos tratados con respecto al control para los tratamientos 12 Y 13.....	95

ÍNDICE DE TABLAS

I. Introducción general

Tabla I.1.1. Parámetros y valores de referencia de un ensilaje de grano húmedo de sorgo.....	3
Tabla I.1.2. Composición de aditivos químicos y biológicos según la categoría.....	14
Tabla I.1.3. Inoculantes comerciales.....	17

III. Capítulo I: Crecimiento de *A. flavus* y producción de AFB1 en mini-silos de sorgo

Tabla III.3.1. Modelos estudiados y sus respectivas ecuaciones.....	33
Tabla III.4.1. Valores de Ct obtenidos para diluciones al décimo de ADN <i>A. flavus</i> en agua y en matriz.....	39
Tabla III.4.2. ANOVA del Diseño Central Compuesto.....	40
Tabla III.4.3 Criterios de bondad de ajuste para el modelo de crecimiento Gompertz a las diferentes temperaturas.....	42
Tabla III.4.4 Parámetros estimados del modelo de Gompertz para las diferentes temperaturas.....	43

IV. Capítulo II: Control Biológico de *A. flavus* en mini-silos de sorgo

Tabla IV.4.1. Índices de diversidad Alpha (Chao1 y Shannon) para las comunidades bacterianas y fúngicas en los mini-silos T1, antes (A) y después (B) de la incubación.....	75
Tabla IV.4.2. Pruebas fenotípicas para la identificación a nivel de especie de <i>Gluconacetobacter</i> sp.....	83
Tabla IV.4.3. Bacterias lácticas y levaduras aisladas del KA y de silobolsas de grano húmedo de sorgo.....	88
Tabla IV.4.4. Crecimiento de los diferentes aislamientos a partir de lactato como única fuente de carbono.....	89
Tabla IV.4.5. Diferentes tratamientos realizados con los microorganismos aislados del KA.....	90

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AFB1	Aflatoxina B1
AFM1	Aflatoxina M1
ANOVA	Análisis de varianza
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
AICc	Criterio de información de Akaike corregido
ARNr	Ácido ribonucleico ribosomal
BAA	Bacterias ácido acéticas
BAL	Bacterias ácido lácticas
Ct	<i>Cycle Threshold</i> , Ciclo Umbral
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
KA	Kefir de agua
KAS	Kefir de agua estéril
LSD	Least significant difference
MRS	de Man Rogosa Sharpe agar
PDA	Papa Dextrosa Agar
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pheS	subunidad alfa de la fenilalanil-tRNA sintetasa
RMSE	raíz del error cuadrático medio
TLC	Cromatografía de capa fina
Tm	Temperatura de melting
YES	Yeast Extract Sucrose

I. INTRODUCCIÓN GENERAL

I.INTRODUCCIÓN GENERAL

Los sistemas intensivos de producción animal basados en esquemas pastoriles requieren de la suplementación energética para lograr mayores producciones y de mayor eficiencia (Bartaburu, 2003). Muchas veces es necesario sustentar altas cargas animales para el logro de altas producciones o cumplir con determinadas exigencias en animales para la producción lechera. El alto contenido de agua y proteína con bajo aporte de fibra de las pasturas en el período invernal generan un desbalance a nivel ruminal por la falta de energía para utilizar esa proteína (Scarpitta, 2008). Para poder hacer uso eficiente de la pastura es necesario levantar esa limitante. Para levantar esta restricción se ha desarrollado un método de conservación que permite cosechar el grano con un elevado contenido de humedad y conservarlo de forma que no pierda valor nutritivo. Esta técnica se denomina ensilaje de grano húmedo (Chalkling & Brasesco, 2003) y el silo es la instalación en que tiene lugar este proceso (McDonald et al., 2011), denominándose en este caso silo de grano húmedo.

I.1. Silo de grano húmedo

Se define como silo de grano húmedo al grano cosechado con una humedad comprendida entre el 23% y 40%, que es conservado sin previo secado en condiciones de anaerobiosis. En nuestro país los granos destinados a este tipo de uso son maíz y sorgo, por la productividad de los cultivos, adaptación a la nutrición animal y costo (Chalkling, 2016).

I.1.1. Silo de grano húmedo de sorgo

En Uruguay, el cultivo de sorgo está sustituyendo al maíz como material para alimentación animal mediante ensilado (Irigoyen & Perrachon, 2002). Si bien el grano de maíz tiene un mayor valor nutritivo que el de sorgo, para niveles de suplementación menores al 40% de la dieta, no se han encontrado diferencias en parámetros productivos como ganancia de peso, condición corporal, calidad de carne o producción de leche (Scarpitta, 2008).

El sorgo presenta varias ventajas con respecto al maíz, en lo que se refieren a bajo costo, versatilidad y menor riesgo (Irigoyen & Perrachon, 2002). El sorgo es un cultivo rústico que se adapta a diferentes tipos de suelo por su menor requerimiento de humedad. Es más eficiente en la absorción de agua que el maíz debido a su particular sistema radicular. Además, presenta características morfológicas que le confieren ventajas comparativas frente al maíz en lo que respecta a necesidades hídricas. Estas características le otorgan al sorgo resistencia a la sequía, pudiendo pasar en períodos críticos por un estado casi latente, volviendo al crecimiento activo

cuando las condiciones de humedad se vuelven favorables (Irigoyen & Perrachon, 2002). Por otra parte este cultivo se reconoce como “mejorador de estructura de suelo”, por el alto volumen de rastrojo que deja el cual es de lenta descomposición, siendo una ventaja importante en siembra directa (Irigoyen & Perrachon, 2002).

En nuestro país la cosecha de sorgo como grano húmedo ha sido mayor a la de grano seco en los últimos años según los datos publicados por la Oficina de Programación y Política Agropecuaria (OPYPA) del Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca (MGAP) (Salgado et al., 2021) (Figura I.1.1). Esto puede deberse a que desde el punto de vista de la producción animal, dentro de cierto rango, el grano húmedo de sorgo supera las limitantes nutricionales que tiene el grano de sorgo entero, ya que mediante el incremento en su contenido de humedad y el procesamiento del grano se logra mejorar la digestión por parte de los rumiantes (Rovira & Velazco, 2012).

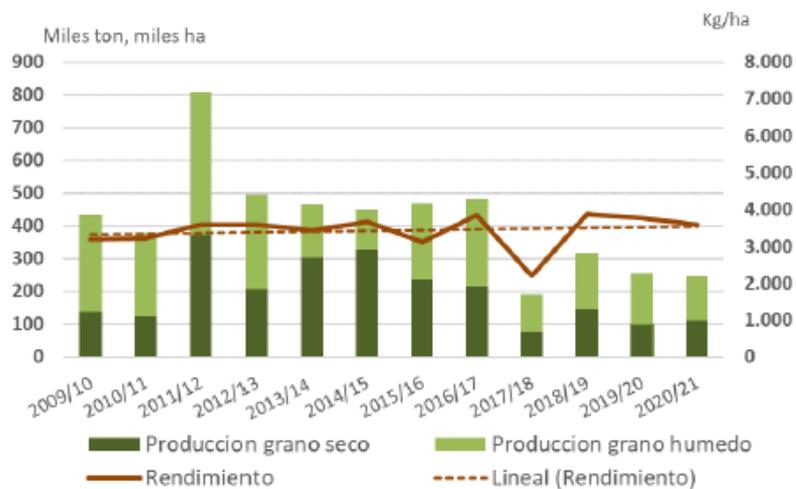


Figura I.1.1 Producción y rendimiento de grano húmedo y grano seco de sorgo en Uruguay (Salgado et al., 2021).

El sorgo alcanza la madurez fisiológica (35% de humedad) antes de lograr la madurez comercial (14% de humedad). Al alcanzar la madurez fisiológica el grano tiene el mayor peso seco, con la cantidad máxima de nitrógeno y carbohidratos totales. A partir de ese momento la comunicación vascular entre el grano y el resto de la planta se corta, y el mismo comienza a deshidratarse hasta llegar al momento de cosecha convencional con 14% de humedad. El momento para la cosecha del grano húmedo es cuando el mismo ha alcanzado la madurez fisiológica. A nivel de campo se identifica este momento, cuando los tejidos vasculares han cicatrizado y se observa el punto negro en la inserción del grano, el cual presenta de un 28 a 35% de humedad (Chalkling & Brasco, 2003).

La cosecha antes de la madurez fisiológica implica cosechar con menos nutrientes, ya que el grano no ha completado su llenado. A su vez, cosechar después de que el grano ha madurado, puede

implicar pérdidas en el rendimiento, por daños del ambiente (pájaros, inclemencias climáticas, pérdidas de plantas), acción de la cosechadora (mayores pérdidas cuanto más seco), y además por menor calidad del grano al disminuir el contenido de proteínas y la calidad de los almidones. A medida que disminuye la humedad el valor nutritivo del grano es menor y el proceso de ensilaje es más difícil que se desarrolle con éxito (Chalkling & Brasesco, 2003).

El grano húmedo se conserva mediante la técnica de ensilaje (Chalkling, 2016). En este proceso por acción de microorganismos en ausencia de oxígeno, se producen ácidos que inhiben los procesos de descomposición del material a ensilar. Se cumple a través de varias etapas que concluyen en 30 a 40 días según el material a ser conservado (Chiossone et al., 2011). El ensilado es el material producido por esta fermentación controlada (McDonald et al., 2011). En la tabla I.1.1 se muestran valores orientativos del valor nutritivo y calidad de confección deseados para un ensilaje de grano húmedo de sorgo (Rovira & Velazco, 2012) .

Tabla I.1.1. Parámetros y valores de referencia de un ensilaje de grano húmedo de sorgo (Rovira & Velazco, 2012) .

Parámetro	Valores orientativos
Materia Seca (%)	68,0 - 75,0
Proteína cruda (%)	7,5 - 9,5
Fibra Detergente Ácida (%)	10,0 – 15,0
Fibra Detergente Neutro (%)	15,0 – 25,0
Cenizas (%)	1,5 – 2,5
Energía Metabolizable, Mcal/kg de materia seca	2,9 – 3,2
pH	3,8 - 4,6
Nitrógeno amoniacal (%)	1,5 – 2,5

I.1.2. Tipos de silos de grano húmedo

Existen varios tipos de silos dependiendo de su estructura, siendo los silos horizontales más comunes, el silo trinchera (también llamado de pozo zanja), el silo búnker y el silobolsa (Figura I.1.2) (Chalkling & Brasesco, 2003; De la Roza, 2005). El silo trinchera se construye abriendo en el suelo un hueco largo no muy profundo el cual se va rellinando con el material a ensilar (Noble, 1980) (Figura I.1.2. a y b). El silo búnker se construye sobre la superficie del suelo y tiene una estructura de hormigón u otros materiales (Noble, 1980). Este silo es poco utilizado por los costos

de su estructura (Figura I.1.2. c). En cambio, el silobolsa es una bolsa, compuesta por tres capas constituidas por una mezcla de polietileno de alta y baja densidad, es negra por dentro y blanca por fuera, la cual se llena con el material a ensilar (Bartosik, 2012) (Figura I.1.2. d).

En todos los casos, una vez que el grano es cosechado con el grado de humedad adecuado, es importante realizar un buen quebrado del mismo, una buena compactación en el silo y el tapado o cerramiento para lograr la anaerobiosis, fundamental para el éxito del proceso de ensilaje (Scarpitta, 2008).



Figura I.1.2. Tipos de silos de grano húmedo. a, b- silo trinchera ([www. https://www.engormix.com/](https://www.engormix.com/)), c- silo búnker (<https://www.contextoganadero.com/>), d- silobolsa (silo muestreado en la presente tesis).

El almacenamiento en silobolsa ha sido la estrategia más utilizada porque ofrece ventajas desde el punto de vista operativo por realizar el quebrado y la compactación del grano al mismo tiempo. Los granos cosechados se descargan en la tolva de la embolsadora y se quiebran en el molino situado en la base de la máquina. El quebrado es fundamental, ya que el pasaje de granos enteros hacia la bolsa puede perjudicar la conservación y/o la utilización del suplemento. Los granos enteros impiden una buena compactación y no son digeridos por los bovinos por lo cual el suplemento no se aprovecha. El grano procesado cae a un sinfín que lo empuja al túnel de embolsado, en donde es compactado, comenzando a hacer presión y empujando al conjunto tractor embolsadora hacia adelante, desplegando gradualmente la bolsa (Figura I.1.3) (Rovira & Velazco, 2012).

El almacenamiento en silobolsa permite una buena compactación, lo que conlleva a una mejor conservación del material ensilado. Además posibilita un alto porcentaje de aprovechamiento, cercano al 90% y tiene bajo costo (Scarpitta, 2008).



Figura I.1.3. Llenado de un silobolsa para realizar un silo de grano húmedo de sorgo (<https://elabcrural.com/>).

I.1.3. Algunas ventajas y desventajas del silo de grano húmedo

Las ventajas que ofrece el ensilaje de grano húmedo con respecto al grano seco son varias. Esta técnica permite la cosecha anticipada, aprovechando el máximo potencial de rendimiento del cultivo obteniendo una mayor producción por hectárea por año. Además, se reducen los costos, ya que no hay que transportar el grano para realizar el secado y no se requiere infraestructura adicional para el almacenaje si se utiliza el silobolsa. Otras ventajas son que el suplemento alimenticio permanece en la chacra facilitando el suministro del alimento y tiene menor dependencia de factores externos a la empresa, ya que no depende del transporte del alimento teniendo el suplemento disponible para el momento en que se necesite administrarlo (Chalkling & Brasesco, 2003).

Por otra parte, algunas desventajas que presenta esta técnica son la buena logística que debe tenerse para lograr mantener la calidad del grano disminuyendo al mínimo el tiempo entre la cosecha y el almacenaje, las entradas de aire que puedan presentar los distintos tipos silos o las posibles roturas en la estructura del silobolsa que interrumpen la anaerobiosis y la conservación durante el suministro (Chalkling & Brasesco, 2003).

I.2. Proceso de ensilaje en silobolsa

Como se mencionó al definir el ensilaje, este método de conservación consta de varias etapas. El grano debe ser cosechado con la humedad deseada, quebrado y compactado en el silobolsa. Esta bolsa debe cerrarse de forma hermética para lograr la anaerobiosis y de esta forma permitir que los microorganismos presentes en el material a ensilar, mediante procesos de fermentación, generen ácidos que descendan el valor del pH dentro del silo, logrando así la estabilización del material hasta el momento de apertura para suministrar el alimento.

Barnett en 1954 dividió el proceso de ensilaje en cuatro fases principales, las mismas son: la fase aerobia, la fase de fermentación, la fase de estabilización y la fase de alimentación (Figura I.1.4) (Pahlow et al., 2003).

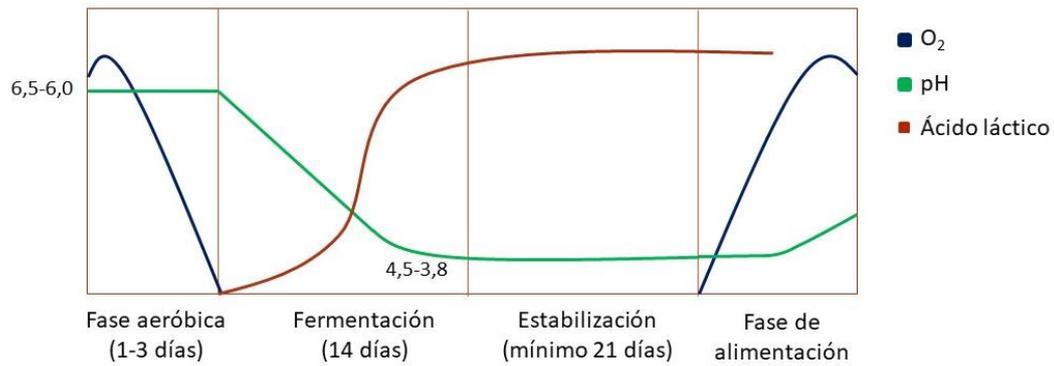


Figura I.1.4. Etapas del proceso de ensilaje. Los días se consideran a partir del día 0 en donde se arma el silo. (Chalkling, 2016; Piltz & Kaiser, 2004).

I.2.1. Fase I: Fase aerobia

La fase aerobia comienza luego de la cosecha del material a ensilar y se extiende hasta que se consume el oxígeno en el silo. En esta etapa ocurren procesos de respiración celular por parte del material vegetal y de los microorganismos aerobios y anaerobios facultativos, como enterobacterias, hongos y levaduras, presentes en el material ensilado (Dunière et al., 2013; Piltz & Kaiser, 2004). Los procesos de respiración generan pérdida de nutrientes ya que se consumen los carbohidratos hidrosolubles, que además serán necesarios para la producción de ácido láctico en la fase II, convirtiéndose en dióxido de carbono y agua, con producción de calor. El aumento de temperatura es el primer signo de que ocurren reacciones de respiración (Piltz & Kaiser, 2004).

Además de la pérdida de nutrientes por respiración, otro aspecto importante a considerar es el crecimiento de los microorganismos aerobios presentes en el material, dentro de los cuales se describen hongos de diversos géneros que pueden resultar micotoxigénicos. Por lo anteriormente mencionado esta fase debe ser lo más breve posible, la misma dura generalmente entre uno y tres días. Aunque su duración va a depender de factores como la composición del material a ensilar, del tiempo entre el llenado del silo y el cerramiento, del grado de compactación y del cerrado hermético del mismo. Estos últimos dos factores son determinantes para lograr la disminución paulatina del oxígeno en el silo, lo cual es fundamental para el éxito de esta técnica. En esta etapa los valores de pH oscilan entre 6,5 y 6,0 (Basilio & Orihuela, 2012; Piltz & Kaiser, 2004).

A su vez, las bacterias anaerobias facultativas por fermentación generan ácidos que comienzan a disminuir paulatinamente los valores de pH en el silo. A medida que baja la concentración de oxígeno se promueve el desarrollo de las bacterias ácido lácticas (BAL), las cuales son ácido tolerante y fermentan los carbohidratos hidrosolubles a ácido láctico (Dunière et al., 2013).

I.2.2. Fase II: Fase de fermentación

La fase de fermentación comienza cuando el oxígeno dentro del silo fue consumido. En esta fase los microorganismos anaerobios facultativos como enterobacterias, algunos *Bacillus* spp, levaduras, bacterias lácticas y anaerobios estrictos como clostridios pueden competir por los nutrientes en el silo (Pahlow et al., 2003). Los productos de fermentación que se obtienen están determinados por las características del material a ensilar y por la población microbiana que sea dominante en el silo. En un ensilaje exitoso la población dominante son las BAL, las cuales son bacterias ácido tolerantes. Las mismas producen principalmente ácido láctico a través de su metabolismo primario lo que genera una disminución de pH del material dentro del silo a valores de entre 4,5 y 3,8. Cuando se alcanzan estos valores de pH se inhibe el crecimiento microbiano dentro del silo y comienza la etapa de estabilización (Chalkling, 2016). A su vez el crecimiento de BAL se detiene por la escasez de azúcares y por acumulación de ácido láctico (De la Roza, 2005).

I.2.3. Fase III: Fase de estabilización

Esta fase comienza cuando el silo está estabilizado. En esta etapa las características del ensilado se mantienen relativamente inalteradas hasta el momento de apertura del silo (Pahlow et al., 2003).

I.2.4. Fase IV: Fase de alimentación o también llamada fase de deterioro aeróbico.

En esta etapa se abre el silo para alimentar a los animales, por lo tanto, el material se expone al aire y aumentan los niveles de oxígeno. La apertura del silo es una etapa inevitable. Al abrirlo, el aire puede penetrar por la cara del silo hasta una distancia de 4 metros, especialmente sobre la periferia (Borreani et al., 2018).

Al aumentar los niveles de oxígeno en el silo, aumenta el crecimiento de microorganismos aerobios como levaduras, bacterias ácido acéticas y hongos filamentos, generalmente responsables de la inestabilidad aeróbica. Las levaduras generalmente comienzan el deterioro aeróbico, consumiendo azúcares y fermentando los ácidos, generando un aumento de los valores de pH en el ensilado. Estas condiciones permiten el crecimiento de otros microorganismos entre ellos los del género *Bacillus* y hongos filamentosos. Por procesos de respiración estos microorganismos se multiplican, produciendo un aumento de temperatura en el silo y cambios químicos en el material ensilado, los cuales se observan por una disminución de ácido láctico, un aumento en los valores de pH y un descenso en el valor nutricional (Borreani et al., 2018; Pahlow et al., 2003).

El deterioro aeróbico del ensilado durante la fase de alimentación es un problema importante a nivel mundial que compromete la rentabilidad del productor y la calidad del alimento. Los

procesos de deterioro en general involucran una pérdida de hasta un 20% de la materia seca almacenada en el caso del sorgo. Las pérdidas pueden alcanzar un 70% de materia seca en las áreas periféricas y cerca de las paredes de los silo búnkers, las mismas se relacionan con el agotamiento de los de carbohidratos digeribles y ácidos orgánicos (Tabacco et al., 2011). Otro problema que se presenta en esta fase es el crecimiento de hongos filamentosos, los cuales además de generar pérdidas en la calidad del material ensilado y reducir la palatabilidad, pueden ser un potencial riesgo para la salud humana y animal ya que muchos de las especies encontradas son productoras de micotoxinas (Pahlow et al., 2003).

I.3. Problemas en el ensilaje

El material vegetal que se va a ensilar tiene una variedad de microorganismos aerobios y anaerobios en su superficie el cual se denomina microflora epífita. El tipo de microorganismos presentes en este material va a depender de sus características y de factores ambientales como el clima durante la cosecha y las técnicas para la misma. La microflora epífita determina en gran medida el tipo de fermentación que se va a llevar a cabo en el material ensilado según la cantidad y el tipo de ácidos orgánicos producidos, afectando la estabilidad del silo (Fabiszewska et al., 2019).

La flora epífita en general consiste en BAL y otros microorganismos indeseables desde el punto de vista del proceso de fermentación y de la calidad del ensilado. Estos microorganismos incluyen especies del género *Clostridium*, enterobacterias, *Listeria* spp., especies del género *Bacillus*, levaduras y hongos filamentosos (Fabiszewska et al., 2019; Pahlow et al., 2003). Los microorganismos mencionados pueden generar fermentaciones secundarias no deseadas y riesgos potenciales para la salud humana y animal.

I.3.1. Fermentaciones secundarias

Las BAL epífitas son esenciales para la fermentación espontánea del silo y la producción de ácido láctico generando un rápido descenso de pH. A valores de pH menores a 4,2, se considera que se inhibe el metabolismo de los microorganismos presentes en el ensilado principalmente de microorganismos anaerobios facultativos y estrictos como enterobacterias y *Clostridium* spp. (McDonald et al., 2011). Si estas condiciones no se alcanzan, estos microorganismos pueden desarrollarse generando fermentaciones secundarias no deseadas.

Las enterobacterias compiten con las BAL por los carbohidratos fermentables, por lo cual es deseable una rápida disminución de su actividad en el silo. El valor de pH óptimo para su crecimiento es 7,0 por lo que en general están activas solo en las fases tempranas de la fermentación (McDonald et al., 2011), ya que a valores de pH menores a 4,5 se inhibe su

crecimiento en silos (östling & Lindgren, 1993). Su rol al principio del ensilaje es positivo, ya que estos microorganismos son los principales reductores de nitrato generando intermediarios como nitrito y óxido nítrico, los cuales son inhibidores selectivos del crecimiento de *Clostridium* spp (Pahlow et al., 2003).

De todas formas, se busca una rápida inhibición de estos microorganismos generada por el rápido descenso de los valores de pH. Si este descenso se realiza en forma lenta, por ejemplo, por la baja cantidad de carbohidratos fermentables, las enterobacterias pueden dominar la fermentación generando fermentaciones no deseadas (Piltz & Kaiser, 2004). La fermentación por enterobacterias genera ácido acético, etanol, CO₂ e hidrógeno. Esta fermentación genera pérdida de energía y de materia seca, lo cual significa pérdida de calidad y valor nutricional del ensilado. El resultado de esta fermentación secundaria es un “silo acético” por la producción de acetato. El ensilado resultante es de aspecto normal con olor a vinagre, menos palatable para los animales (Pahlow et al., 2003; Piltz & Kaiser, 2004; Rovira & Velazco, 2012).

Las enterobacterias pueden descarboxilar y desaminar aminoácidos produciendo amonio, generando un aumento en el pH del ensilado, y aminas biogénicas lo cual es indeseable en el silo (McDonald et al., 2011). Las aminas biogénicas encontradas con más frecuencia en los silos son putrescina, cadaverina y tiramina, derivadas de los aminoácidos arginina, lisina y tirosina respectivamente. Otras aminas biogénicas como la triptamina, histidina, espermidina y espermina también han sido detectadas en menores cantidades (Dunière et al., 2013). Se ha observado que las aminas biogénicas tienen un impacto negativo sobre la salud de los rumiantes, ya que están implicadas como factores causantes de cetonemia y en la absorción ruminal de histamina, la cual se considera la mayor causa de histaminosis sistémica en rumiantes con acidosis (Dunière et al., 2013).

Clostridium spp. son microorganismos esporulados anaerobios estrictos, que en general no forman parte de la flora epífita de los cultivos, sino que aparecen a través de la contaminación con el suelo o las heces (Ávila & Carvalho, 2020). El crecimiento de los clostridios ocurre cuando el crecimiento de las BAL se estanca y el pH es muy alto (usualmente > 5). Estos microorganismos en general crecen a valores de pH de entre 7,0-7,4, no toleran condiciones ácidas inhibiéndose a pH de 4,2 y requieren condiciones de alta humedad para germinar (Ávila & Carvalho, 2020; McDonald et al., 2011). Las especies más frecuentes encontradas en los silos son *C. sporogenes*, *C. tyrobutyricum*, *C. butyricum* y *C. bifermentans* (Pahlow et al., 2003).

Las especies de *Clostridium* pueden dividirse en dos grupos, las sacarolíticas y las proteolíticas. Las primeras (*C. butyricum* y *C. tyrobutyricum*) fermentan el ácido láctico y los carbohidratos hidrosolubles a ácido butírico, generando un aumento de pH. En cambio, los clostridios proteolíticos (*C. sporogenes* y *C. bifermentans*) fermentan los aminoácidos produciendo una

variedad de compuestos, entre los cuales se encuentran los ácidos butírico y acético, aminas biogénicas y amonio (McDonald et al., 2011).

Si la población de especies de *Clostridium* aumenta, domina la fermentación produciéndose una fermentación secundaria, generando un aumento en los valores de pH. Este “ensilaje clostridial” presenta un elevado contenido en ácido butírico, con valores de pH superiores a 5, bajo contenido de materia seca y alto contenido de amonio y aminas, generando pérdida del valor nutritivo del ensilado (Chalkling, 2004). Los silos en donde los clostridios dominan la fermentación son silos con olor putrefacto generado por las aminas biogénicas, que visualmente se ven muy húmedos, los cuales no son palatables para los animales (Piltz & Kaiser, 2004; Rovira & Velazco, 2012).

Otra fermentación secundaria que puede tener lugar en el silo es la fermentación alcohólica por parte de las levaduras. En esta fermentación se produce etanol y CO₂, pudiendo generar olor a alcohol en el silo. Las levaduras son microorganismos no deseados porque producen pérdida de materia seca, disminuyen el valor nutritivo del ensilado y compiten por los carbohidratos fermentables con las BAL. A su vez, algunas levaduras pueden crecer a partir de lactato, consumiendo el ácido láctico generando un aumento en los valores de pH en el silo (Piltz & Kaiser, 2004; Rovira & Velazco, 2012).

La presencia de levaduras se presenta como un problema en la fase de alimentación. Una vez que entra oxígeno en el silo comienzan a crecer, generando un aumento de pH por el consumo de ácidos orgánicos y azúcares, lo cual se considera la primera causa del deterioro aeróbico (Borreani et al., 2018). A pesar de lo anteriormente mencionado, algunas levaduras como *Saccharomyces cerevisiae* se han patentado como inoculante de silos ya que aporta propiedades a la salud animal (Ávila & Carvalho, 2020), este concepto será desarrollado en el *Capítulo II*.

La presencia de bacterias ácido acéticas (BAA) tampoco es deseable en los silos (Oude Elferink et al., 2000), aunque hay autores que mencionan que podrían ayudar a mejorar la estabilidad aeróbica por la producción de ácido acético (Ávila & Carvalho, 2020). Estos microorganismos son aerobios estrictos que toleran ambientes ácidos. Si bien ellos no generan las denominadas fermentaciones secundarias, hay evidencia de que los mismos podrían iniciar el deterioro aeróbico, ya que son capaces de consumir el etanol y lactato. En general, son las levaduras las responsables de iniciar este deterioro, teniendo las BAA un rol minoritario (Oude Elferink et al., 2000).

I.3.2. Microorganismos potencialmente peligrosos

Los microorganismos esporulados comúnmente encontrados en los silos son especies de los géneros *Clostridium*, *Bacillus* y *Paenibacillus* (Ávila & Carvalho, 2020). Las esporas pueden tolerar

la fase de fermentación germinando en la fase de alimentación contribuyendo al deterioro aeróbico. Esta afirmación también es válida para las esporas de *Clostridium*. Este microorganismo es estrictamente anaerobio pero estudios han demostrado que las esporas pueden germinar durante la fase de alimentación del silo (Tabacco et al., 2009).

C. botulinum produce intoxicación por la neurotoxina botulínica. Si bien esta especie es raramente encontrada en los silos, es importante considerar que si la toxina botulínica fue producida antes del ensilado, la misma no se degrada por fermentación y permanece estable en las condiciones ácidas del silo (Ávila & Carvalho, 2020; Pahlow et al., 2003).

C. perfringens también es raramente encontrada en los silos. Esta especie está asociada con enfermedades entéricas en animales monogástricos y en rumiantes, como la enteritis bovina necrohemorrágica en terneros y el síndrome hemorrágico en el intestino observado en vacas lecheras (Ávila & Carvalho, 2020).

Otro microorganismo patógeno que puede encontrarse en los silos es la *Listeria* spp. Se han identificado en diferentes tipos de silos especies como *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. grayi*, *L. seeligeri* y *L. ivanovii* (Ávila & Carvalho, 2020). *L. monocytogenes* es la especie mayormente causal de la listeriosis en varios animales incluidos los humanos. Las manifestaciones clínicas de la listeriosis incluyen encefalitis, aborto o septicemia que puede provocar la muerte. Se ha observado que la presencia de esta especie en el silo, en las heces o en ambas aumenta el riesgo de la presencia en la leche y por ende la transmisión a los humanos (Dunière et al., 2013). *L. monocytogenes* no se ha aislado de silos con pH menores a 4,7 (McDonald et al., 2011).

Finalmente, otro problema que puede presentar el ensilado es la contaminación fúngica. La misma está asociada con la reducción en la palatabilidad, reducción del valor nutricional del ensilado y bajo consumo del alimento, problemas en la salud animal, descenso en la productividad y fertilidad y aumento de la susceptibilidad a enfermedades (Dunière et al., 2013). Muchos de estos efectos están asociados a que los hongos contaminantes pueden ser productores de micotoxinas (Tabacco et al., 2011). Las micotoxinas son metabolitos secundarios con efectos tóxicos en humanos y animales (Ghali et al., 2008).

Los hongos pueden desarrollarse en cualquier sitio del ensilaje donde encuentren oxígeno, aunque en un buen ensilaje su acción sólo ocurre al principio del almacenamiento, en la fase aeróbica y se restringe a la capa exterior. Sin embargo durante la fase de deterioro aeróbico pueden invadir todo el silo (Chalkling, 2004).

El crecimiento de los hongos y la concomitante producción de micotoxinas se ve favorecido con factores como la demora en la cosecha, un lento llenado de los silos, un almacenamiento y cerramiento inadecuado del silo, bajas tasas de suplementación de ensilado, el daño de la

silobolsa, del envoltorio o de la cobertura del silo (Ogunade et al., 2018). Un daño en la silobolsa o en la cobertura del silo por factores climáticos o por animales como roedores o pájaros, podría interrumpir la anaerobiosis generando un deterioro aeróbico antes de abrir el silo para la alimentación.

Los géneros comúnmente asociados al deterioro de los silos y producción de micotoxinas son *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium* (Cheli et al., 2013; Wambacq et al., 2016).

Las especies de *Fusarium* son consideradas como hongos de campo porque proliferan durante el crecimiento y la maduración de la planta. Las condiciones favorables de crecimiento son alta humedad (mayor al 70%) y temperaturas fluctuantes entre frío y calor. Las condiciones del ensilaje no son favorables para estas especies ya que no toleran el bajo pH y las condiciones de anaerobiosis (Ogunade et al., 2018). Sin embargo, las toxinas que producen son medianamente estables no destruyéndose completamente durante el ensilaje. Las toxinas producidas por algunas especies de este género que se han encontrado en silos son tricotecenos como la toxina T-2 y H-T2, deoxinivalenol, nivalenol, acetil-DON, diacetoxyscirpenol y fusarenon X. También se han encontrado fumonisinas y zeralenona ruminal (Ogunade et al., 2018). Estas toxinas generan diferentes problemas de salud animal al ser ingeridas. En los rumiantes sus efectos son menos potentes ya que la mayoría son degradados por la microbiota ruminal (Ogunade et al., 2018).

Aspergillus spp. y *Penicillium* spp. pueden crecer a actividades de agua más bajas y temperaturas mayores que *Fusarium* spp., siendo éstas las especies más abundantes durante el almacenamiento. Las especies de *Aspergillus* son más prevalentes en climas templados mientras que las especies de *Penicillium* spp. predominan en climas fríos (Cheli et al., 2013).

Una de las especies de *Penicillium* aislada con más frecuencia de los silos es *P. roqueforti*, por su capacidad de tolerar ambientes ácidos y poder crecer a bajas concentraciones de oxígeno (Ogunade et al., 2018; Pahlow et al., 2003). Esta especie puede producir la toxina PR, ácido micofenólico y roquefortina C (Ogunade et al., 2018). La toxina PR no ha sido encontrada en silos, mientras que las dos últimas si se han detectado. El ácido micofenólico es considerado un agente inmunosupresivo porque bloquea la respuesta proliferativa de los linfocitos B y T, e inhibe la formación de anticuerpos y producción de células T citotóxicas “in vitro” (en células de humanos, de ratón y de ratas) (Eugui et al., 1991), aunque no hay datos sobre los efectos de esta toxina en el ganado (Ogunade et al., 2018). En cambio, si hay datos sobre los efectos en estos animales de la roquefortina C, la cual se ha asociado a desordenes reproductivos, mastitis y falta de apetito (Auerbach et al., 1998).

Otra toxina que ha sido encontrada en bajas cantidades en el silo es la ocratoxina producida por diferentes especies entre las que se encuentran *Penicillium verrucosum*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus carbonarius* (Ogunade et al., 2018). Esta toxina es nefrotóxica e

inmunotóxica. Los rumiantes presentan tolerancia a esta toxina ya que la misma es rápidamente degradada en el rumen generándose un producto con baja toxicidad como ocratoxina- α (Ogunade et al., 2018).

El género *Aspergillus*, está compuesto por algunas especies que son productoras de aflatoxinas, como *A. flavus*, *A. parasiticus* y *A. nomius* (Gizachew et al., 2019). Las aflatoxinas son las micotoxinas más tóxicas y las más frecuentes en los alimentos y en los ensilados, las cuales tienen un gran impacto negativo en la salud animal (Ogunade et al., 2018).

1.4. *Aspergillus flavus*

El *Aspergillus flavus* pertenece al género *Aspergillus*, subgénero *Circumdati* sección *Flavi*. En esta sección están presentes algunas de las especies más importantes del género *Aspergillus* que son relevantes en áreas como biotecnología, alimentación y salud (Varga et al., 2011)

La sección *Flavi* está compuesta por 33 especies que se agrupan filogenéticamente en 8 clados. El clado con mayor cantidad de especies es el clado *A. flavus*, el cual contiene 15 especies, dentro de las cuales se encuentra *A. flavus* (Frisvad et al., 2019). *Aspergillus* sección *Flavi* tiene varias especies que producen micotoxinas, como por ejemplo aflatoxinas, ocratoxinas y ácido ciclopiazónico, las cuales se consideran las de mayor relevancia (Frisvad et al., 2019).

Aspergillus flavus es conocido por producir sólo aflatoxinas del tipo B. Sin embargo, hace unos años se encontraron en Corea cepas de *A. flavus sensu stricto* que podían producir aflatoxinas del tipo B y G (Frisvad et al., 2019). Este hongo tiene una forma domesticada, la especie *Aspergillus oryzae* la cual perdió su capacidad de producir aflatoxinas. Esta especie no logra diferenciarse molecularmente de la especie salvaje mediante el gen de la calmodulina, sino que la diferenciación se logra por características de sus conidias, poca esporulación, ausencia de esclerotos y la no producción de aflatoxina (Frisvad et al., 2019).

A. flavus es contaminante de varios alimentos como cereales y semillas, principalmente en climas húmedos tropicales y subtropicales (Bhatnagar-Mathur et al., 2015; Cheli et al., 2013; Ghali et al., 2008). Se ha observado que tiene un amplio rango de crecimiento con temperaturas mínimas de entre 10-12°C, temperaturas máximas de 43-48°C y una temperatura óptima alrededor de 33°C (Pitt & Hocking, 2009)

Este hongo se ha detectado como uno de los contaminante más frecuente de silos de grano húmedo de sorgo en Brasil (Keller et al., 2012) y Uruguay (del Palacio et al., 2016). Estudios mostraron que tiene la habilidad de sobrevivir a las condiciones de anaerobiosis del ensilado y crecer cuando las condiciones en el silo son favorables, es decir cuando hay oxígeno presente como ocurre en la fase aerobia o en la fase de alimentación (Ferrero et al., 2019).

Dado que su presencia en el silo es un riesgo potencial para la salud humana y animal, la presente tesis apunta a lograr la inhibición de este hongo, logrando así un suplemento libre de aflatoxinas.

I.5. Aditivos para ensilaje

El empleo de aditivos en el proceso de ensilaje tiene como fin contribuir a la creación de unas condiciones óptimas que permitan mejorar la conservación y valor nutritivo del alimento resultante. Los aditivos para silos pueden clasificarse en cuatro categorías: (1) Estimulantes de la fermentación, (2) inhibidores de la fermentación, (3) inhibidores del deterioro aeróbico y (4) nutrientes y absorbentes (Tabla I.1.2) (Muck et al., 2018).

Tabla I.1.2. Composición de aditivos químicos y biológicos según la categoría (Oude Elferink et al., 2000).

Categoría	Composición
Estimulantes de la fermentación	Bacterias ácido lácticas Azúcares (melaza) Enzimas
Inhibidores de la fermentación	Ácido fórmico Ácido láctico Sales de nitrito Sales de sulfito
Inhibidores del deterioro aeróbico	Bacterias ácido lácticas Ácido propiónico Ácido sórbico Ácido benzoico
Nutrientes	Urea Amoníaco
absorbentes	Pulpa de remolacha azucarera seca Paja

I.5.1. Estimulantes de la fermentación

Dentro del primer grupo se encuentran las BAL, las enzimas y los sustratos azucarados. La adición de un inóculo de BAL tiene como función aportar microflora láctica que puede no estar presentes en cantidad suficiente en el material ensilado, generando así que las BAL sean la población dominante en la fermentación (Fabiszewska et al., 2019). De esta forma se logra un rápido descenso en los niveles de pH del material a ensilar, estabilizando el mismo e impidiendo que

otros microorganismos indeseables como hongos, enterobacterias, bacilos o clostridios puedan crecer (Dunière et al., 2013).

Las enzimas comunes utilizadas son las que degradan las paredes celulares de las plantas como celulasas y hemicelulasas ó mezclas de los mismas. Mediante la ruptura de las paredes celulares, aumenta el contenido de azúcares solubles, los cuales son fermentados por bacterias lácticas, favoreciendo así la acidificación (Muck et al., 2018).

Los productos azucarados se utilizan con el propósito de aumentar la cantidad de carbohidratos fermentables, los cuales serán rápidamente utilizados por las bacterias lácticas que los hidrolizan y transforman en ácido láctico (Oude Elferink et al., 2000). Uno de los aditivos para silos más utilizados como fuente de azúcar es la melaza, que es un sub producto de las industrias de la remolacha azucarera y de la caña de azúcar (McDonald et al., 2011).

I.5.2. Inhibidores de la fermentación

Los aditivos químicos para ensilaje integran las categorías de Inhibidores de la fermentación e inhibidores del deterioro aeróbico. Los aditivos que inhiben la fermentación podría utilizarse teóricamente en cualquier ensilaje, pero en la práctica solamente se utilizan en cultivos húmedos con bajos contenidos de carbohidratos hidrosolubles y/o alta capacidad buffer (McDonald et al., 1991). La acción de estos aditivos reduce el crecimiento de clostridios, siendo los más efectivos en inhibir el crecimiento los basados en ácido fórmico, hexametileno y nitrito (Oude Elferink et al., 2000).

I.5.3. Inhibidores del deterioro aeróbico

Los aditivos que inhiben el deterioro aeróbico están compuestos por aditivos químicos y biológicos. Los aditivos químicos se basan en ácidos grasos volátiles como el propiónico, el sórbico, acético, benzoico (Oude Elferink et al., 2000). Estos ácidos mejoran la estabilidad aeróbica del silo en la fase de alimentación inhibiendo el crecimiento de hongos y levaduras. Además el ácido sórbico puede inhibir el crecimiento de alguna bacteria y de clostridios (Muck et al., 2018).

La BAL *Lactobacillus buchneri* es el aditivo biológico descrito como inhibidor del deterioro aeróbico por su capacidad de oxidar al ácido láctico en acético en una reacción independiente de oxígeno (Oude Elferink et al., 2001). Esta BAL ha mostrado mejorar en la estabilidad aeróbica en una variedad de silos (Muck et al., 2018).

I.5.4. Nutrientes y absorbentes

El otro grupo de aditivos incluye a los nutrientes y absorbentes que se utilizan al momento de ensilar para suplementar los déficits nutricionales que tenga el material ensilado. Los aditivos utilizados han sido urea y amoníaco para aumentar el contenido de proteína en el silo, piedra caliza y $MgSO_4$ para aumentar el calcio y el contenido de magnesio (Oude Elferink et al., 2000).

Los absorbentes son utilizados en cultivos con elevado porcentaje de agua (bajo porcentaje de materia seca) para evitar pérdidas de nutrientes por escurrimiento. Se utilizan la pulpa de remolacha azucarera y de cítricos, también puede utilizarse la paja, aunque esta tiene un efecto negativo en el valor nutritivo del ensilado (Oude Elferink et al., 2000).

La elección del aditivo adecuado para un silo específico va a depender de determinadas propiedades del aditivo como su efectividad, la idoneidad para el tipo de cultivo y su fácil manejo y aplicación (Oude Elferink et al., 2000). Estos factores en conjunto con el costo y la disponibilidad serán los tenidos en cuenta para realizar la elección del aditivo.

Los aditivos biológicos poseen ventajas frente a los aditivos químicos, ya que no son peligrosos, son de fácil manejo, no son corrosivos para la maquinaria agrícola, no contaminan el ambiente y son reconocidos como productos naturales (Weinberg & Muck, 1996). Dentro de este grupo la utilización de inoculantes microbianos, como las BAL, ha sido un tema de investigación que se ha incrementado en las últimas décadas, y por lo tanto ha contribuido a incrementar el conocimiento (Ávila & Carvalho, 2020). Actualmente se han estudiado otros microorganismos además de las BAL como inoculantes de silos. Por ejemplo la especie *Propionibacterium acidipropionici*, que mejora la estabilidad aeróbica por producción de ácido propiónico y la especie *Bacillus subtilis* que mejora la estabilidad aeróbica mediante la producción de una bacteriocina que inhibe el crecimiento de hongos y especies de levaduras (Muck et al., 2018).

Actualmente hay una variada disponibilidad de inoculantes microbianos para silos los cuales están compuestos en general por diferentes especies de BAL del género *Lactobacillus*, *Enterococcus* o *Pediococcus*. Los mismos se muestran en la tabla I.1.3. La combinación de aditivos es una práctica utilizada, por ejemplo, la combinación de BAL con enzimas celulolíticas como se puede ver en los inoculantes comerciales Sil-All 4x4 o LactoSilo y LacoSilo Gold (Tabla I.1.3).

El concepto del uso de inoculantes microbianos para controlar el crecimiento de otros microorganismos se enmarca dentro del control biológico.

Tabla I.1.3. Inoculantes comerciales.

Nombre y marca.	Composición	Descripción
BioStabil Mays. Biomin*	<i>E. faecium</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. plantarum</i>	Inoculante para maíz de planta entera y grano húmedo de maíz
Sil-All 4x4. Alltech*	<i>L. plantarum</i> , <i>L. salivarius</i> , <i>P. acidilactici</i> , <i>E. faecium</i> . Enzimas Amilasa, Celulasa, Hemicelulasa y Xilanasa	Ensilaje de pradera, alfalfa y cualquier cultivo que posea baja materia seca
Sila-Prime 4X. Bitay*	<i>L. plantarum</i> , <i>P. pentosaceus</i> , <i>P. acidilactici</i> , <i>E. faecium</i> , <i>Strptococcus lactis</i> . Extracto de fermentación de <i>Aspergillus oryzae</i> y <i>Bacillus subtilis</i> . Dextrosa	Ensilajes de maíz, sorgo granífero, forrajero, alfalfa, otras pasturas asociadas, verdes de cebada y otros cereales
Josilac Combi. Josera*	<i>L. buchneri</i> , <i>L. kefir</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>P. pentosaceus</i> . Dextrosa	Inoculante para el tratamiento de ensilados
SiloSolve AS. Chr. Hansen*	<i>L. buchneri</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>E. faecium</i>	Inoculante para ensilaje de maíz, cereales y cualquier forraje con alta materia seca
LactoSilo. Lage y Cía. S.A.**	<i>L. curvatus</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>P. acidilactici</i> , <i>Bacteria láctica sorgo S1 (aislado de silaje de sorgo) exclusivo de LactoSilo</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>E. faecium</i> . Complejo multienzimático celulolítico	Inoculante para maíz o sorgo de planta entera o grano húmedo. Pasturas de verdes, leguminosas o soja (micropicado o silopack)
LactoSilo Gold. Lage y Cía. S.A.**	<i>L. bucheneri</i> , <i>L. curvatus</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>P. acidilactici</i> , <i>Bacteria láctica sorgo S1 (aislado de silaje de sorgo) exclusivo de LactoSilo</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>E. faecium</i> . Complejo multienzimático celulolítico	Inoculante para maíz o sorgo de planta entera o grano húmedo. Pasturas de verdes, leguminosas o soja (micropicado o silopack)

*Información tomada de <https://www.prolesa.com.uy/>

**Información tomada de <https://www.lageycia.com/>

I.6. Problema para abordar en este trabajo

Dadas las condiciones climáticas de nuestro país y los problemas asociados al ensilaje de grano húmedo, *A. flavus* se evidencia como un problema potencial en estos silos. Es importante poder inhibir su desarrollo al comienzo del ensilaje, en la fase aerobia y de esa forma evitar la contaminación con aflatoxinas. En esta tesis se propone estudiar el comportamiento de *A. flavus* y la producción de AFB1 en silos de grano húmedo de sorgo, y desarrollar un inoculante capaz de controlar su crecimiento conservando las características del material ensilado.

II.OBJETIVOS

II.1 OBJETIVO GENERAL

Conocer el comportamiento de *A. flavus* en silos de grano húmedo de sorgo, en diferentes condiciones de temperatura y humedad, y obtener un inóculo mixto de bacterias lácticas y levaduras capaz de inhibir el crecimiento de dicho hongo en los silos.

II.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estudiar la influencia de la humedad, la temperatura, el tiempo y el inóculo inicial en el crecimiento de *A. flavus* y la producción de aflatoxina B1 en mini-silos experimentales de sorgo durante la fase aerobia.
- Seleccionar bacterias lácticas y levaduras capaces de inhibir el crecimiento de *A. flavus* en mini-silos de sorgo durante la fase aerobia del ensilaje.

II.3 ESTRUCTURA DE LA TESIS

El trabajo realizado para lograr los objetivos propuestos y los resultados obtenidos se presentan en dos capítulos.

En el primer capítulo, *Crecimiento de Aspergillus flavus y la producción de aflatoxina B1 en mini-silos de sorgo*, se describe el sistema de mini-silos experimentales recreando las condiciones de un silo de sorgo de grano húmedo en el laboratorio. Se presenta el desarrollo de una metodología de PCR en tiempo real y de extracción y detección de aflatoxina B1 por HPLC, para poder cuantificar el crecimiento de *A. flavus* y la producción de esta toxina en sorgo respectivamente. Se realiza el modelado de la producción de aflatoxina B1 mediante la metodología de superficie de respuesta utilizando un diseño Central Compuesto. Con estos resultados se conocen las variables significativas que afectan a la producción de este metabolito y sus valores óptimos de producción en el silo. Se estudia el crecimiento de *A. flavus* y la producción de aflatoxina B1 en las condiciones óptimas de producción en silos de grano húmedo de sorgo. Finalmente se modela el crecimiento de este hongo a diferentes temperaturas con el fin de conocer la tendencia de su velocidad de crecimiento en este sistema en función de las temperaturas a las que podría exponerse el silo en el campo.

En el segundo capítulo, *Control Biológico de A. flavus en mini-silos de sorgo*, se estudian diferentes microorganismos como bacterias lácticas y levaduras que podrían inhibir el crecimiento de este hongo en el sistema. Se aíslan e identifican bacterias lácticas y levaduras de silobolsas de grano húmedo de sorgo. A su vez, se estudia al kefir como fuente de microorganismos biocontroladores, capaces de inhibir el desarrollo de *A. flavus* en el silo. Por lo mencionado anteriormente, se estudia la comunidad del kefir de agua mediante secuenciación masiva y se realiza el aislamiento, la identificación molecular y en algunos casos identificación polifásica de bacterias lácticas y levaduras presentes en el mismo. Los diferentes aislamientos y combinaciones de estos se evalúan como controladores biológicos contra *A. flavus* en los mini-silos de grano húmedo de sorgo.

III. CAPÍTULO I: Crecimiento de *A. flavus* y producción de AFB1 en mini-silos de sorgo

III.1 INTRODUCCIÓN

Los silos de grano húmedo tienen importancia para el sector agropecuario en Uruguay ya que ofrecen una fuente de energía de mayor calidad que el grano seco con un costo menor y con una menor dependencia de factores externos (Scarpitta, 2008). Como se mencionó en la *Introducción general* los silos pueden presentar el problema de contaminación fúngica, lo cual puede ser un riesgo potencial para la salud animal, ya que los hongos contaminantes pueden ser productores de micotoxinas (Tabacco et al., 2011). A su vez, el crecimiento de los hongos en el silo genera la pérdida de nutrientes y de materia seca, reduce la palatabilidad y el consumo del mismo por los animales causando un bajo rendimiento (Alonso et al., 2013). Los hongos pueden desarrollarse en cualquier sitio del ensilaje donde encuentren oxígeno, aunque en un buen ensilaje su acción sólo ocurre al principio del almacenamiento y se restringe a la capa exterior. Sin embargo, luego de la apertura del silo pueden invadir todo el material (Chalkling, 2004). El deterioro aeróbico generado en la etapa de alimentación puede registrarse antes de abrir el silo por una mala confección del silobolsa o por daños en la misma por acción de roedores, pájaros o factores climáticos como el granizo. Por ello, el desarrollo fúngico y la aparición de problemas asociados es un riesgo potencial durante todo el proceso. El conocimiento de la influencia de distintas variables sobre el crecimiento y producción de toxinas de los contaminantes más frecuentes aporta herramientas para la predicción del riesgo asociado a la eventual presencia de oxígeno durante el proceso de ensilado. El deterioro aeróbico que se genera en la última etapa del proceso de ensilaje ha sido estudiado y se continúan desarrollando múltiples estrategias para minimizarlo por las pérdidas que el mismo implica (Cavallarin et al., 2011; Tabacco et al., 2011).

III.1.1. Fase aerobia

La primera fase del proceso de ensilaje se reconoce desde el momento de la cosecha hasta que el material es ensilado y se reducen los niveles de oxígeno. La duración de esta etapa es de entre 1 y 3 días (Piltz & Kaiser, 2004). En esta primera etapa se llevan a cabo procesos de respiración celular del material vegetal y de microorganismos respiradores los cuales se desarrollan hasta agotar completamente el oxígeno o cuando la acidificación logra detener su metabolismo (Dunière et al., 2013).

Para reducir el impacto negativo del oxígeno en la primera fase del ensilado se deben tener en cuenta factores como una buena compactación y un buen tamaño de partícula (Chalkling, 2016). En los silobolsas, en particular, en los días posteriores al llenado se debe controlar si la bolsa cambia de forma. Si la misma se “hincha” o expande puede deberse al exceso de gases, si la

misma se “desinfla” o distiende puede indicar la pérdida por efluentes (Rovira & Velazco, 2012). Cuando se ensilan granos de alta humedad es común que se concentren gases en los extremos de la bolsa. La estrategia que se utiliza para eliminarlos es realizar un pequeño orificio, los cuales se cierran con cinta apropiada al cabo de 2 o 3 días (Bartaburu, 2003).

En resumen, la primera fase del ensilado es una fase donde es importante lograr que el oxígeno remanente en la bolsa sea el menor posible y que a su vez se consuma de forma rápida logrando así la anaerobiosis. De María et al. (2017) sugieren que durante el tiempo que transcurre desde la confección hasta la estabilización del silo se generan condiciones de estrés para los hongos tales como la disminución de oxígeno y el aumento de temperatura, las cuales favorecen el desarrollo de micotoxinas en muchos casos. Por este motivo el estudio de la producción de micotoxinas y su detección en esta primera etapa es un tema de importancia.

III.1.2. Aflatoxinas

El estudio de la probabilidad de desarrollo fúngico y producción de micotoxinas va asociado a las especies aisladas con frecuencia del material ensilado. En Uruguay se ha encontrado como un contaminante frecuente de silos de grano húmedo de sorgo a la especie *Aspergillus flavus*, reconocida productora de aflatoxinas (del Palacio et al., 2016). Las aflatoxinas son un grupo de derivados de difuranocumarinas que son tóxicas, mutagénicas y carcinogénicas producidas mediante la vía policétida por varias especies de *Aspergillus*, entre ellas *A. flavus* (Ogunade et al., 2018). Las cuatro aflatoxinas mayoritarias que se producen naturalmente son la aflatoxina B1, G1 y sus dihidroderivados B2 y G2 respectivamente (Figura III.1). Las letras hacen mención al color que presentan al exponerlas bajo luz UV (blue or green) y los números indican la distancia relativa al migrar en una placa cromatográfica de capa fina (Klich, 2007). La aflatoxinas están clasificadas por la IARC (International Agency for Research on Cancer) dentro del Grupo 1, lo cual significa que son carcinogénicos para los humanos (IARC, 2002). Dentro de este grupo la aflatoxina B1 (AFB1) es considerada la principal toxina y el carcinógeno natural más potente producido por algunas especies de *Aspergillus* (Ogunade et al., 2018).

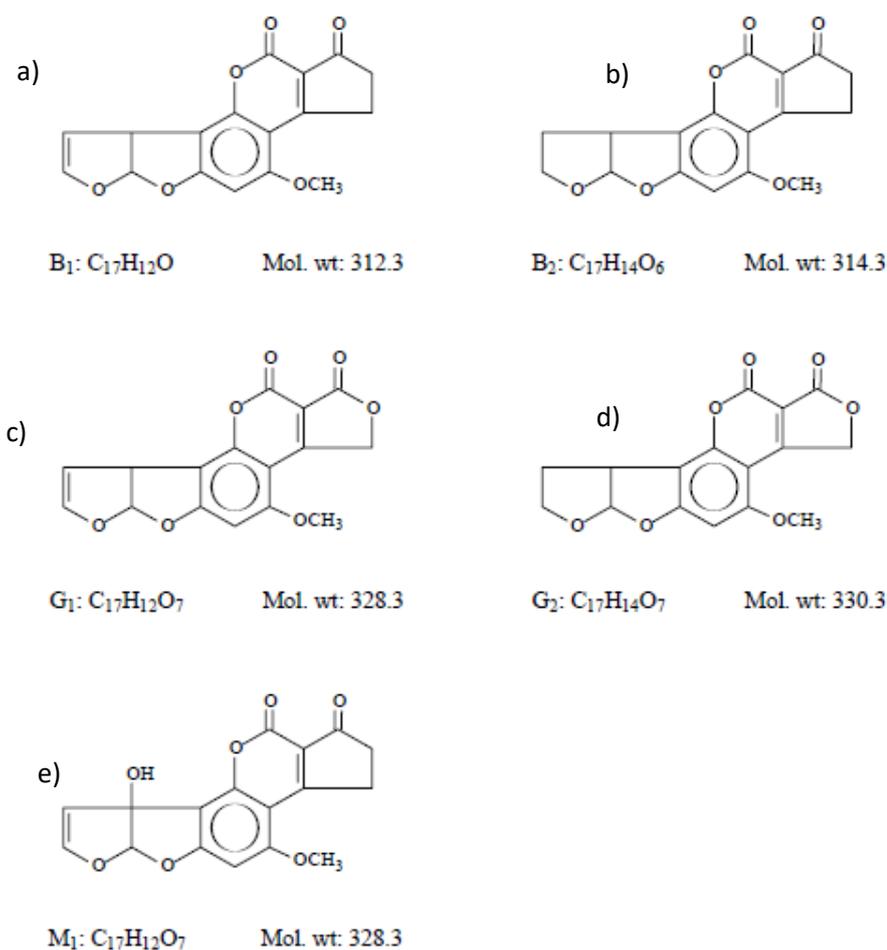


Figura III.1. Estructura de las aflatoxinas encontradas en la naturaleza: a) AFB1, b) AFB2, c) AFG1, d) AFG2, e) AFM1 (Tomado de IARC, 2002).

El problema que se presenta al detectar al *Aspergillus flavus* como contaminante frecuente de silos de grano húmedo de sorgo es el riesgo potencial de la presencia de aflatoxinas, en particular de la aflatoxina B1 la cual se reconoce tiene la mayor toxicidad en animales (Gourama & Bullerman, 1995). El consumo de alimentos contaminados con aflatoxinas (B1, B2, G1 y G2) se asocia con toxicidad, carcinogenicidad y pérdidas en la productividad de los animales. Las enfermedades causadas por el consumo de aflatoxinas se denominan aflatoxicosis, las misma puede ser aguda o crónica. Las aflatoxicosis agudas se generan por una exposición corta a una gran cantidad de toxina y se caracterizan por daño hepático severo, ictericia, hemorragia, edema y eventualmente la muerte. En cambio, la crónica se produce por una exposición subletal constante que genera inmuno supresión, disfunciones nutricionales y cáncer. Estudios muestran que el hígado es el órgano blanco de la aflatoxina B1 (Marchese et al., 2018; Zain, 2011).

El consumo de alimentos contaminados con AFB1 por parte del ganado lechero es un problema para la industria láctea, ya que este metabolito se biotransforma en los animales generando la

alfatoxina M1 (AFM1) (Figura III.1) que es excretada en la leche. Hay evidencias de que la AFM1 es detectada entre 12 y 24 horas posteriores a la ingesta de AFB1 y que la cantidad de AFM1 excretada en la leche de vaca varía entre 1 y 3 % con respecto a la cantidad de AFB1 ingerida (Sassahara et al., 2005). La AFM1 es resistente a procesos térmicos y de pausterización por lo tanto este problema podría alcanzar a los humanos a través del consumo de leche contaminada (Marchese et al., 2018). La IARC clasificó a la AFM1 en el grupo 2B como posible cancerígeno humano (IARC, 2002).

III.2.1. Regulación

La concentración de aflatoxinas en los alimentos para animales y en la leche es regulada. La Unión Europea y las GMP (2019) (Good Manufacturing practices) establecen un límite de 5 ppb (ng/g) de AFB1 en alimentos destinados a vacas lecheras, mientras que para alimentos destinados a otro tipo de ganado el límite es 20 ppb. En Uruguay, la Dirección General de Servicios Agrícolas del Ministerio de Agricultura y Pesca recomienda un límite máximo de aflatoxinas de 20 µg/kg (ppb) en alimentos destinados a estos animales en producción, coincidiendo con la reglamentación vigente del MERCOSUR y los límites de la FDA (Food and Drug Administration) y el USDA (United State Department of Agriculture) (Capelli et al., 2019; FAO, 2003). Con respecto a los límites de AFM1, Uruguay se rige por el Reglamento Bromatológico Nacional (RBN, 2020) donde el límite para consumo humano es de 0,5 µg/L para leche, derivados y productos lácteos. Sin embargo, la Unión Europea establece un límite inferior de 0,05 µg/L para leche fluida (Reglamento (EU) N° 165/2010, 2010).

La detección y cuantificación de las aflatoxinas puede realizarse por diferentes métodos analíticos que incluyen cromatografía en capa fina (TLC), ensayos de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), cromatografía líquida de alta performance (HPLC) acoplado a detectores de fluorescencia, UV, arreglo de diodos o a espectroscopía de masas (Wacoo et al., 2014). El método más utilizado para la separación y determinación de las diferentes aflatoxinas en alimentos es el de HPLC de fase reversa. Es común realizar una derivatización química de las aflatoxinas B1 y G1 para lograr la detección por parte del equipo ya que su fluorescencia natural puede no ser suficiente para alcanzar el límite de detección (Trucksess et al., 2006; Wacoo et al., 2014).

III.1. 3. Diferentes variables que afectan a la producción de aflatoxina B1 por *A. flavus*

Diferentes factores afectan el crecimiento de *A. flavus* y la producción de aflatoxinas en diferentes sustratos. Algunos de ellos son la humedad, la actividad de agua, la temperatura, la presencia de oxígeno, el tiempo de almacenamiento, la composición del sustrato, el inóculo inicial y la interacción con las especies que comparten el nicho ecológico (Astoreca et al., 2014). De los

factores anteriormente mencionados se considera que los más significativos en la influencia del crecimiento y producción de aflatoxina son la temperatura y la humedad del grano (Chalkling, 2004; Giorni et al., 2008; Ogunade et al., 2018). En particular, las interacciones entre estos factores son los que determinan si la contaminación fúngica aumenta y si el metabolito es sintetizado.

Las óptimas condiciones de temperatura y humedad descritas para la biosíntesis de AFB1 dependen del sustrato en donde se produzcan. En semillas de Nyjer molidas, las óptimas condiciones de producción se lograron a actividades de agua entre 0.90–0.98 a una temperatura de 27°C obteniendo concentraciones de AFB1 de entre 203-282 µg/kg (Gizachew et al., 2019). Mientras que en semillas de sorgo se determinó que la producción de AFB1 se daba en un rango de actividad de agua de entre 0,94-0,99 en un rango de temperaturas de entre 25-37 °C (Lahouar et al., 2016). En silos de grano húmedo de sorgo la humedad del grano se encuentra entre 23-40 % (Chalkling, 2016), siendo el óptimo entre 28-32% (Rovira & Velazco, 2012). Estas humedades corresponden aproximadamente a una actividad de agua mayor a 0,95 (Figura III.2), lo cual indicaría una condición favorable para la producción de aflatoxinas.

En Uruguay las temperaturas de otoño (meses de marzo-abril-mayo-junio), que es cuando en general se cosecha el grano de sorgo para ensilar, oscilan entre 17,5 y 19,5 °C , habiéndose registrado en 2019 una máxima de 23, 4 °C y una mínima de 13,2 °C (INUMET, 2019). No hay estudios disponibles sobre cómo afecta la temperatura y la humedad en la producción de AFB1 en silos de grano húmedo de sorgo. Sin embargo, se ha detectado este metabolito en este sistema (Capelli et al., 2019; Keller et al., 2012).

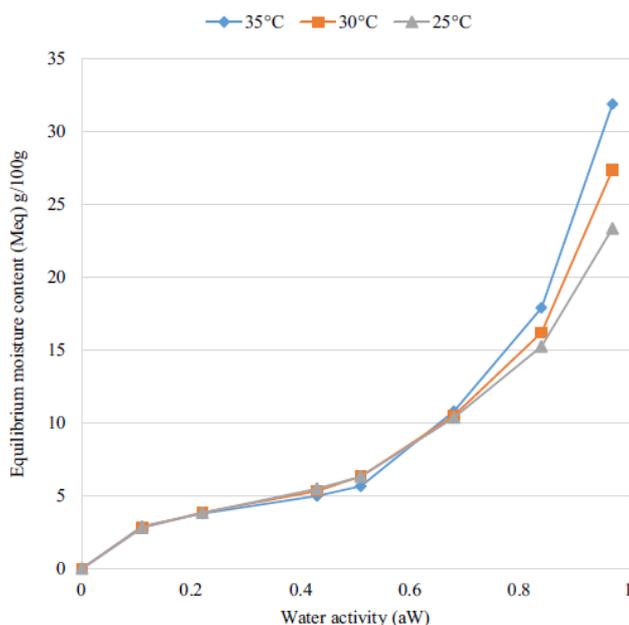


Figura III.2. Isotermas de adsorción de humedad de mezclas de granos molidos de amaranto y sorgo a 25 °C, 30 °C y 35 °C.

Para estudiar como las variables afectan al crecimiento fúngico y a la producción de micotoxinas se utilizan diferentes modelos que predicen estas respuestas. La microbiología predictiva, la cual permite describir, predecir y entender el crecimiento microbiano, es una metodología que se origina con el fin de lograr productos alimenticios inocuos (Esser et al., 2015). La obtención de modelos de crecimiento microbiano es fundamental para esta disciplina. A través de los mismos se pueden determinar valores de parámetros asociados al crecimiento (ej. velocidad y cosecha máxima) en distintos sistemas y estudiar su comportamiento frente a variaciones que afectan la duplicación microbiana (ej. temperatura, humedad). Como resultado se generan modelos secundarios que permiten predecir el crecimiento microbiano en diferentes condiciones dentro de un rango determinado. Algunos ejemplos del uso de esta metodología son el modelado del crecimiento de especies fúngicas contaminantes de productos panificados en función de la actividad de agua, la temperatura y el pH (Dagnas et al., 2014); el estudio de la influencia de la temperatura, la actividad de agua y el metabisulfito de sodio en el crecimiento y la producción de Ocratoxina A por *Aspergillus carbonarius* aislado de uvas (Ioannidis et al., 2015); el efecto de la temperatura, la actividad de agua y el tiempo de incubación en el crecimiento fúngico y producción de aflatoxina B1 por aislamientos de *Aspergillus flavus* toxigénicos en granos de sorgo no ensilados (Lahouar et al., 2016); el modelado para establecer el valor nutricional y el producto final de la fermentación del silo de sorgo relacionando la composición de materia seca en la planta antes de ensilar (Rodrigues et al., 2020).

Por lo anteriormente expuesto, es de relevancia el estudio de las condiciones de producción de AFB1 en silos de grano húmedo de sorgo en el Uruguay en la fase aerobia. Lograr predecir la producción de este metabolito en los silos según la temperatura externa, la humedad y el inóculo inicial del hongo en el sistema y estudiar el crecimiento de *A. flavus* en el mismo sería un aporte al sector agropecuario del país. La probabilidad de predecir de forma temprana la contaminación de los mismos con aflatoxinas facilitará el tomar medidas para lograr el éxito en la conservación de la calidad nutricional y en la seguridad animal en el ensilaje.

III.1.4. Diseño de mini-silos experimentales de grano húmedo de sorgo

En este trabajo se utilizó un modelo de mini-silo basado en el diseño desarrollado por Petersson & Schnurer (1995). Los autores realizaron mini silos experimentales a escala de laboratorio como un modelo intermedio entre los ensayos de medio de cultivo en placa y ensayos a escala piloto para estudiar el biocontrol de levaduras sobre hongos contaminantes de silos de grano húmedo de trigo (Bjornberg & Schnurer, 1993; Petersson et al., 1999). De esta forma lograron realizar la transición de ensayos en medio de cultivo a un sistema de mini-silos de laboratorio (18 gramos aproximadamente) para luego escalar a silos de 160 kg almacenados al aire libre. El diseño de los

mini silos de Petersson & Schnurer (1995) consistió en llenar tubos de ensayo de vidrio grueso de 27 mL con granos. Los tubos los cerraban con tapones de goma y para permitir la fuga de aire insertaban una aguja en el mismo para así simular un sistema de almacenaje con fuga de aire. Los tubos de ensayo utilizados tenían 1,5 cm de diámetro y 15 cm de altura con una capacidad de 18 gramos aproximadamente. Este modelo fue utilizado en diversos estudios de biocontrol de hongos contaminantes de silos de grano húmedo de cereales por acción de levaduras (Druvefors et al., 2005; S. Petersson & Schnurer, 1995; Petersson et al., 1999; Petersson & Schnürer, 1998). Mediante el uso de este sistema se pudo recrear en este trabajo un silo a escala de laboratorio permitiendo realizar los estudios sobre la matriz de trabajo. Lo mencionado anteriormente es muy importante ya que se pudieron desarrollar modelos de crecimiento y de producción de AFB1 sobre el sustrato de estudio.

III.2 OBJETIVO GENERAL

Estudiar la influencia de la humedad, la temperatura, el tiempo y el inóculo inicial en el crecimiento de *A. flavus* y la producción de aflatoxina B1 en mini-silos experimentales de sorgo durante la fase aerobia.

III.2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar la puesta a punto de un método de HPLC para cuantificar aflatoxina B1 en sorgo.
- Realizar la puesta a punto de un método de PCR en tiempo real para cuantificar *A. flavus* en sorgo.
- Obtener un modelo que permita predecir la producción de aflatoxina B1 en silos de grano húmedo de sorgo.
- Estudiar el crecimiento de *A. flavus* en silos de grano húmedo de sorgo en la fase aerobia.

III.3 MATERIALES Y MÉTODOS

III.3.1. Microorganismo

Para todos los ensayos se utilizó la cepa *Aspergillus flavus* (PJA), productora de aflatoxinas B1 y B2, perteneciente a la colección de cultivos de la Cátedra de Microbiología, Facultad de Química, UdelaR (Montevideo, Uruguay).

III.3.2 Puesta a punto del método de extracción y cuantificación de aflatoxinas en sorgo mediante HPLC

III.3.2.1. Extracción

La extracción de aflatoxinas se realizó según el AOAC Official Method 990.33 con algunas modificaciones. Se tomaron 5 g de muestra de sorgo seco y molido y se suspendieron en 25 mL de metanol 70%. La suspensión se homogeneizó 3 minutos en un mezclador (Stomacher 400, Seward, UK) y se filtró utilizando un papel de filtro Whatman No. 1. Se tomaron 10 mL del filtrado, los cuales se colocaron en un embudo de decantación de 100 mL y se agregaron 10 mL de hexano, se agitó para mezclar y lograr la separación de las fases. Posteriormente, se tomó la fase acuosa que es la inferior y se colocó en otro embudo de decantación de 150 mL para un nuevo reparto descartando la fase de hexano. Al embudo de decantación se le agregaron 5 mL de dicloro metano y se agitó por 30 segundos. Se tomó la fase inferior de dicloro metano, se secó con Na₂SO₄ y se filtró mediante un papel Whatman No. 1. El reparto de la fase acuosa volvió a

realizarse con 5 mL adicionales de dicloro metano procediendo como se describió anteriormente. La fase orgánica se evaporó hasta sequedad bajo presión reducida en un rotavapor (Rotavapor® R-114, Buchi, Suiza) y se resuspendió en 0.2 mL de acetonitrilo de grado HPLC (Merck, Alemania).

III.3.2.2. Derivatización y análisis de las muestras

El protocolo de derivatización se llevó a cabo según la metodología descrita en la AOAC Official Method 994.08 (AOAC Internacional, 2005) con algunas modificaciones. La solución que se utilizó para realizar la derivatización se preparó con 10 mL de ácido trifluoroacético (Merck, Alemania), 5 mL de ácido acético glacial (Merck, Alemania) y 35 mL de agua destilada. Para realizar la derivatización se mezclaron 117 µL de solución de derivatización con 50 µL de la muestra obtenida en la extracción. La mezcla se colocó por 9 minutos en un baño de agua a 65 °C. Posteriormente se dejó enfriar hasta temperatura ambiente. Una vez termostatizada se inyectaron 20 µL de la misma en el equipo de HPLC el cual tiene un sistema compuesto por una bomba Waters 510 (Waters, Millipore Corporation), una válvula de inyección equipada con un loop de 20 µL, una columna C-18(150 mm × 4.60 mm, Phenomenex) y un detector de fluorescencia Shimadzu RF-10A XL. Los datos se analizaron utilizando el software Peak Simple versión 4.26. El análisis se realizó a temperatura ambiente con un flujo isocrático de 1 mL/min utilizando como fase móvil una mezcla de agua, metanol y acetonitrilo (70:15:15, v/v/v). La detección de fluorescencia se realizó utilizando longitudes de onda de 360 y 440 nm para la excitación y la emisión respectivamente.

III.3.2.3. Curva de calibración

Se realizó una curva de calibración para la aflatoxina B1 analizando por duplicado cinco concentraciones del estándar de aflatoxinas para HPLC (2.0 µg/ml B1, G1 and 0.5 µg/ml B2, G2 en acetonitrilo, Trilogy, USA). 50 µL de la dilución del estándar de aflatoxinas para HPLC con concentración 500 ng/mL, 100 ng/mL, 50 ng/mL, 20 ng/mL y 10 ng/mL fueron derivatizados para realizar la curva de calibración con el método de derivatización mencionado anteriormente.

III.3.2.4. Porcentaje de recuperación del método

El porcentaje de recuperación de la aflatoxina B1 se realizó por duplicado agregando 100 µL del estándar de aflatoxinas para HPLC en 14 mL del filtrado obtenido de una suspensión de 5 g de sorgo de alto tanino en metanol 70%. De este filtrado se tomaron 10 mL para proseguir con la extracción (sección III.3.2.1).

III.3.3. Puesta a punto de una metodología de PCR en tiempo real para cuantificar ADN de *A. flavus* en sorgo

Con el fin de cuantificar el crecimiento de *Aspergillus flavus* en sorgo se optimizó la metodología de PCR en tiempo real descrita por Shweta et al. (2013). Para las condiciones seleccionadas se realizó una curva estándar a partir de ADN extraído de la cepa *Aspergillus flavus* PJA, se determinó la linealidad, el rango dinámico, el límite de detección y la eficiencia del método. Por último, se estudió el efecto de la matriz sorgo en el método optimizado.

III.3.3.1. Condiciones de amplificación en PCR en tiempo real

Las reacciones de PCR en tiempo real se realizaron en un termociclador Rotor Gene 6000 (Qiagen, Holanda) en un volumen de 10 µL conteniendo 5 µL de la mezcla SensiFAST™ SYBR® No-ROX kit (Bioline, Alemania), 0.5 µL de cada primer omt-F (5'-GACCAATACGCCACACAG-3') y omt-R (5'-CTTTGGTAGCTGTTTCTCGC-3') de concentración 10 µM (Shweta et al., 2013), 3 µL de agua MiliQ estéril y 1 µL de ADN. El ciclo de amplificación consistió en un paso inicial de desnaturalización por 5 minutos a 95°C, seguido por 35 ciclos de dos pasos: uno de 30 segundos de desnaturalización a 95°C y otro de hibridación-extensión de 35 segundos a 59°C donde se adquirió la fluorescencia.

III.3.3.2. Curva estándar

Para la construcción de la curva estándar se realizaron diluciones seriadas en base 10 de ADN extraído de micelio de *A. flavus* PJA. Para la obtención del micelio se inoculó el hongo en medio Yeast Extract Sucrose (Forsythe & Hayes, 2000) y se incubó a 28°C por tres días. La extracción de ADN del micelio se realizó con el kit Quick-DNA Fungal/Bacterial Miniprep (Zymo Research, USA). La concentración de ADN inicial se determinó con el kit de fluorescencia Quant-iT ds DNA (Invitrogen, USA) en un fluorímetro Qubit (Invitrogen, USA). Se utilizaron las condiciones de amplificación mencionadas anteriormente. Las amplificaciones de cada dilución se realizaron por duplicado, determinándose el ciclo umbral en cada caso. El análisis de los datos se realizó en el software Rotor-Gene 6000 (Qiagen, Holanda). Se graficaron los Ct para cada dilución en función del logaritmo de la concentración, se determinó la linealidad de la curva mediante regresión lineal y se utilizó la pendiente de la misma para determinar la eficiencia de la reacción según la ecuación: $\text{Eficiencia} = [10^{-1/\text{pendiente}}] - 1$. En la zona lineal se definió el límite de detección y el rango dinámico.

III.3.3.3. Análisis del efecto matriz

Se realizaron curvas estándares de ADN de *A. flavus* PJA diluido en agua y solubilizado en la matriz sorgo diluida al medio, al cuarto y al décimo. Cada punto de la curva se realizó por duplicado. Se

compararon los valores de Ct obtenidos en las muestras en agua con los obtenidos en las diferentes diluciones de matriz para las concentraciones de ADN 5.3 ng/ μ L, 0.53 ng/ μ L, 0.053 ng/ μ L y 0.0053 ng/ μ L.

III.3.4. Diseño de mini-silos experimentales de grano húmedo de sorgo

Todos los mini-silos de grano húmedo de sorgo a escala de laboratorio que se utilizaron en esta tesis se prepararon según Petersson & Schnurer (1995) con modificaciones. En tubos cónicos estériles para centrifuga de 15 mL (1,7 cm de diámetro y 12 cm de altura) se compactaron manualmente granos de sorgo de alto tanino (*Sorghum bicolor*) quebrados, con diferentes contenidos de humedad. La capacidad de estos tubos fue de aproximadamente 17 gramos. A los mini-silos se les colocó un filtro esterilizante (0,22 micras) en la tapa del tubo para permitir la entrada de aire (Figura III.3.1).



Figura III.3.1. Mini-silos de grano húmedo de sorgo.

III.3.5. Estudio de las variables que afectan y optimizan la producción de aflatoxina B1

Para conocer las variables que influyen en la producción de aflatoxina B1 por *A. flavus* en los mini-silos experimentales de grano húmedo de sorgo y las condiciones óptimas de las mismas, se utilizó la metodología de superficie de respuesta mediante un diseño central compuesto. El diseño del ensayo y su análisis se realizó utilizando el programa Design Expert 13 (STAT-EASE Inc., USA). Las variables estudiadas fueron el porcentaje de humedad en el silo (20%-40%), el tiempo de almacenamiento (4-8 días), la temperatura de almacenamiento (10°C - 30°C) y la concentración inicial de *A. flavus* (10^3 - 10^5 conidias/ g de sorgo) en el mini-silo. Se realizaron veintisiete ensayos en diferentes condiciones incluyendo tres réplicas del punto central (Tabla 1, Anexo 1). La respuesta (variable dependiente) fue la producción de aflatoxina B1, la cual se cuantificó mediante el método de HPLC puesto a punto en la presente tesis (sección III.3.2). Se obtuvo un modelo empírico que relaciona la producción de aflatoxina B1 con las variables estudiadas. Mediante este modelo se determinaron los valores óptimos de las variables significativas para obtener la máxima producción de aflatoxina B1 en los mini-silos.

III.3.5.1. Preparación del sorgo y ensilado

Los granos de sorgo se molieron en una licuadora (Philips Hr2109) a máxima velocidad por 30 segundos, se esterilizaron por autoclave (121 °C, 15 minutos) y luego se secaron a 60 °C hasta peso constante. El sorgo molido y estéril se hidrató con agua destilada (0.10 mL/g, 0.20 mL/g, 0.36 mL/g, 0.60 mL/g y 0.80 mL/g) para lograr humedades de 13.2%, 20%, 30%, 40% y 46.85% respectivamente.

El sorgo hidratado fue inoculado con 20 µL/g de una suspensión de esporas de *A. flavus* PJA cuya concentración varió según el tratamiento. De acuerdo con el diseño se prepararon suspensiones de esporas para lograr en el sorgo una concentración de $10^{2.32}$ esporas/g, 10^3 esporas /g, 10^4 esporas/g, 10^5 esporas/g, $10^{5.68}$ esporas/g según el caso.

Las suspensiones de esporas se realizaron con esporas de *A. flavus* PJA obtenidas de colonias con 4 días de crecimiento (en medio PDA a 28 °C) en suero fisiológico con 0.1% de Tween 80% y su concentración se determinó por recuento microscópico directo en cámara de Neubauer.

Los mini-silos se armaron como se menciona en la sección 3.4, y se incubaron por 2, 4, 6, 8 y 9 días a 3, 10, 20, 30 y 37°C según la matriz de diseño (tabla 1, anexo 1).

III.3.5.2. Análisis de los mini-silos

Al finalizar la incubación se cuantificó la aflatoxina B1 en los mini-silos (sección III.3.2.1 y III.3.2.2). El contenido de cada mini- silo se pesó, se pasó a tubos de mayor volumen y se guardó a -20 °C por 24 horas para su posterior liofilización. Luego de la liofilización, la cual se realizó en un liofilizador (Gamma 1-16 LSC, CHRIST, Germany), las muestras se pesaron y se molieron para obtener una muestra homogénea.

III.3.5.3. Análisis de datos

Se realizó un análisis de varianza para conocer la significancia del modelo obtenido, las variables significativas y sus interacciones en la producción de aflatoxina B1. A su vez, se optimizó la respuesta de las variables significativas para conocer las condiciones de máxima producción de aflatoxina B1 en los mini-silos de sorgo. Para la realización de estos análisis se utilizó el programa Design Expert 13 (Stat-Ease, Inc, USA). La validación del modelo se llevó a cabo realizando por duplicado mini-silos en las óptimas condiciones de producción de B1 (30% humedad e incubación a 25° C por 6 días).

III.3.6. Modelado de curvas de crecimiento a diferentes temperaturas

Se realizaron curvas de crecimiento de *A. flavus* PJA en los mini-silos a diferentes temperaturas. El sorgo utilizado se trató como se indica en la sección 3.5.1, el mismo se hidrató para obtener un 30% de humedad y se inoculó con una suspensión de esporas para tener una concentración final en el sorgo de 10^4 esporas/g. El sorgo se ensiló en mini-silos y se incubó a 15 °C, 20 °C, 25°C y 30 °C por diferentes tiempos. Al finalizar la incubación se cuantificó la concentración de ADN de *A. flavus* PJA en cada mini-silo. El contenido de cada mini-silo se pesó, se pasó a tubos de mayor volumen y se guardó a -20 °C por 24 horas para su posterior liofilización. Luego de la liofilización las muestras se pesaron y se molieron para obtener una muestra homogénea. Se tomaron 3 g de muestra del mini-silo liofilizado y se suspendió en 30 mL de agua destilada estéril, la cual se homogeneizó 1 minuto en un mezclador (Stomacher 400, Seward, UK). Posteriormente, de la suspensión se tomaron 2 mL y se centrifugaron durante 1 minuto a 10000 rpm. El pellet obtenido se resuspendió en el buffer de lisis perteneciente al kit de extracción Quick-DNA Fungal/Bacterial Miniprep (Zymo Research, USA) el cual se utilizó para realizar las extracciones de ADN. El ADN de *A. flavus* PJA se cuantificó mediante el método de PCR en tiempo real optimizado para sorgo y descrito anteriormente. En el caso de la curva a 25 °C se realizó la cuantificación de AFB1 en cada uno de los mini-silos.

III.3.6.1. Obtención del modelo primario

El crecimiento de *A. flavus* expresado como la biomasa obtenida en función del tiempo a diferentes temperaturas describe una curva sigmoideal y fue modelado con los siguientes modelos no lineales: Gompertz, Logístico, y el modelo Weibull (Tabla III.3.1). Los modelos fueron ajustados a los datos utilizando la función “nls” (Nonlinear Least Squares) del software R (RStudio Team, 2021)

Los valores iniciales de los parámetros de los modelos se obtuvieron utilizando la versión libre del software Infostat (Di Rienzo et al., 2008).

Tabla III.3.1. Modelos estudiados y sus respectivas ecuaciones.

Modelo	Ecuación
Gompertz	$Y = A \cdot \exp(-\exp\{[\mu \text{ máx} \cdot (e^{-1})^{\lambda \cdot t}]/A+1\})$
Logístico	$Y = A / (1 + \exp\{[4 \cdot \mu \text{ máx} \cdot (\lambda - t)]/A+2\})$
Weibull	$Y = 1 - \exp(- (t/\beta)^k)$

Y = Log (cantidad de ADN/g sorgo), A = asíntota superior, $\mu \text{ máx}$ = velocidad de crecimiento específica, λ = fase lag, β y k son parámetros; t es el tiempo.

La bondad de ajuste fue estimada con un estudio visual de los residuos, la raíz del error cuadrático medio (RMSE) y el pseudo R^2 . El RMSE es un indicador de la diferencia entre los valores observados experimentalmente y los predichos por el modelo. Un RMSE de 0 indica un ajuste perfecto (Ritter et al., 2011). El pseudo R^2 es preferible al R^2 en modelos no lineales y tiene el mismo significado que R^2 . Un pseudo R^2 cercano a 1 indica un buen ajuste (Hemmert et al., 2016). Se utilizó el criterio de información de Akaike corregido (AICc) para la selección de modelos (Burnham et al., 2002). El modelo seleccionado fue el que presentó el menor valor de AICc por ser el más plausible. Los valores de AICc que difieren en menos de 2 unidades no presentan diferencias en cuanto a su plausibilidad. Otros análisis estadísticos se realizaron mediante el uso de los paquetes: “qpcR” y “Metrics” del software R. Los gráficos de las funciones se realizaron mediante la función “plotfit” del paquete “nlsMicrobio” del software R (RStudio Team, 2021). Se realizó un gráfico con las velocidades máximas de crecimiento obtenidas en el modelo primario en función de la temperatura utilizando la función “plot” del software R (RStudio Team, 2021).

III.4 RESULTADOS

III.4.1. Puesta a punto de un método de HPLC para cuantificar aflatoxina B1 en sorgo

Para cuantificar AFB1 en minisilos de sorgo se puso a punto un método de extracción líquido-líquido, con separación por HPLC y detección por fluorescencia luego de derivatización. Se realizó una curva de calibración utilizando un estándar de aflatoxina para HPLC (2.0 µg/ml B1, G1 and 0.5 µg/ml B2, G2 en acetonitrilo, Trilogy, USA), se determinó el intervalo y el límite de cuantificación. La curva de calibración obtenida (“área bajo la curva” = 32382 x (concentración de AFB1) – 21351) muestra que existe una fuerte relación lineal ($R^2 = 0,996$) (Figura III.4.1), la cual se verificó en el rango de concentraciones de AFB1 entre 4 ppb y 200 ppb. El límite de cuantificación del método se estableció en 4 ppb de AFB1 para la muestra inyectada en el HPLC, lo que es equivalente a (0.78 ± 0.05) ng/g de AFB1 en sorgo. El porcentaje de recuperación de AFB1 obtenido con el método desarrollado en este trabajo fue de $85\% \pm 14\%$.

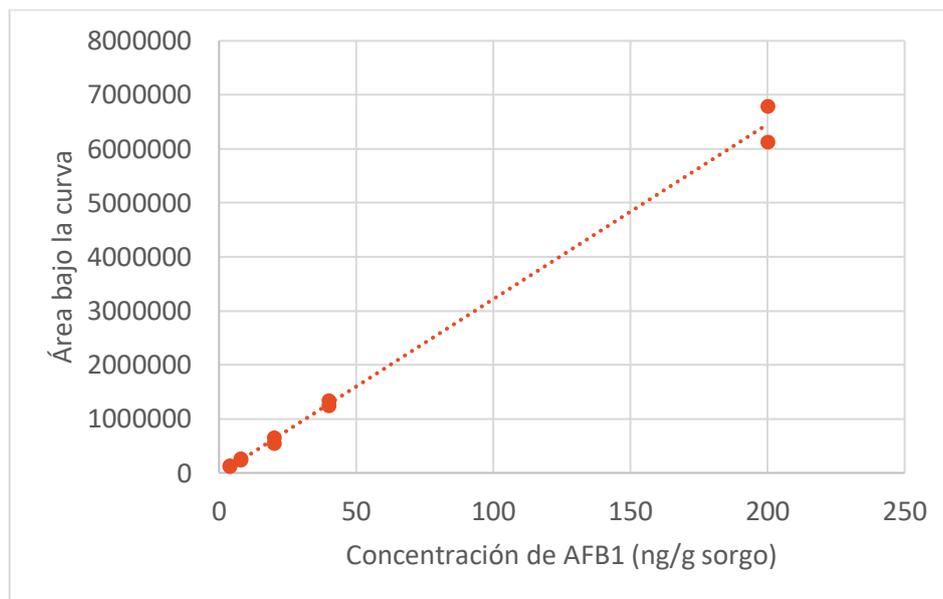


Figura III.4.1. Curva de calibración para la cuantificación de AFB1 por el método de HPLC.

Los tiempos de retención obtenidos para el estándar de aflatoxinas para HPLC (Trilogy, USA) fueron 7.6, 10.9, 16.9 y 26.1 minutos para la aflatoxina G1, B1, G2 y B2 respectivamente (Figura III.4.2).

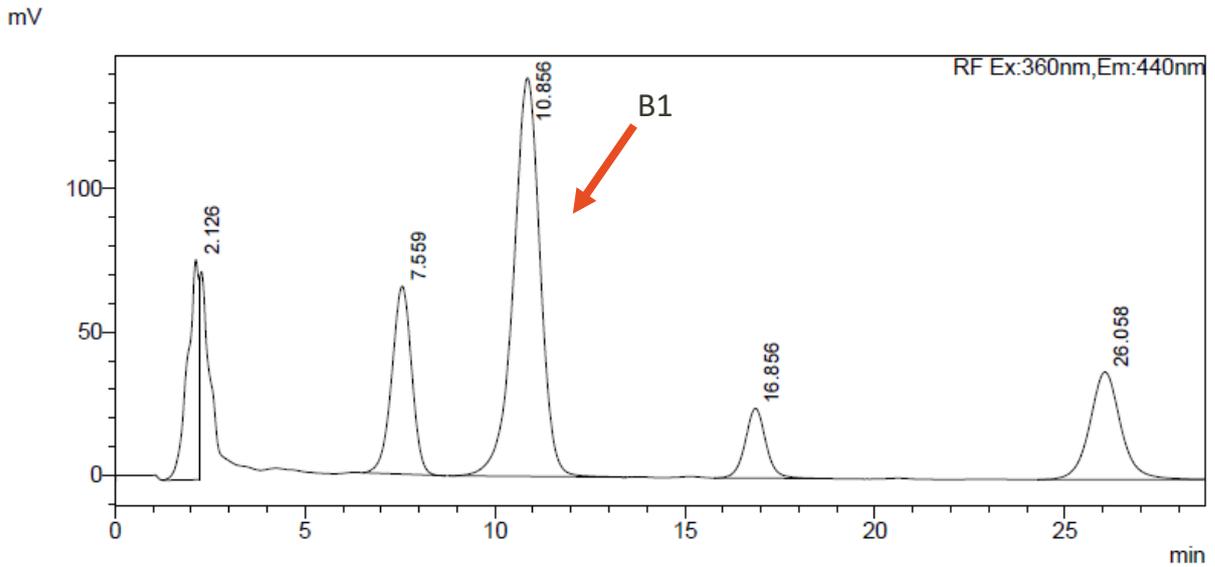


Figura III.4.2. Cromatograma de la solución del estándar de aflatoxina a una concentración de 500 ng/mL

El cromatograma obtenido para el extracto de sorgo de alto tanino sin inocular mostró que sus componentes no presentan tiempos de retención que solapen el pico correspondiente a la AFB1 (Figura III.4.3), el cual fue de 10.9 minutos en la solución de estándar de aflatoxina. Estos resultados muestran que el método optimizado puede ser utilizado para cuantificar la AFB1 de grano de sorgo (Figura III.4.4).

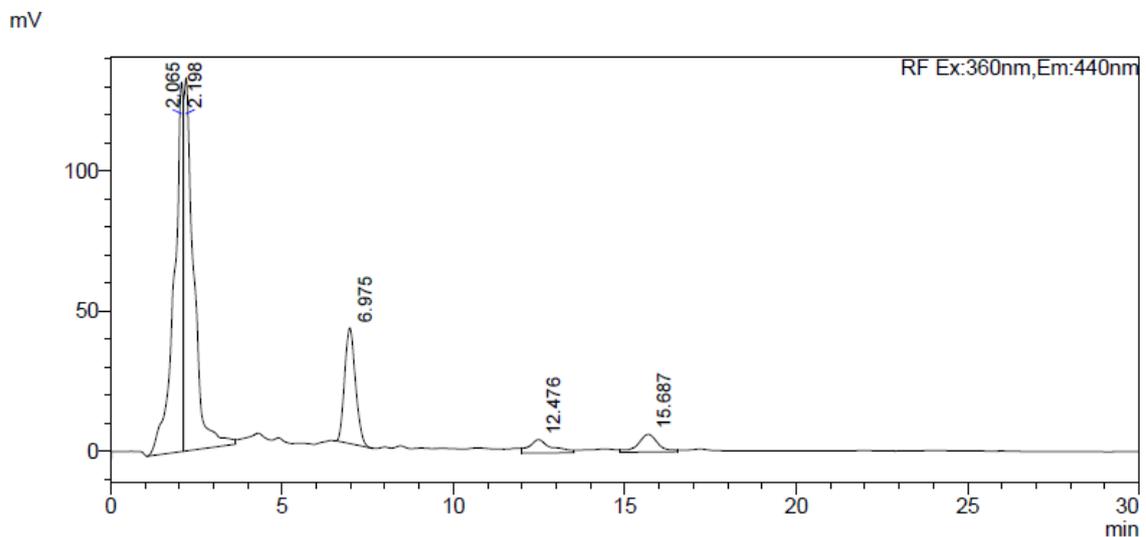


Figura III.4.3. Cromatograma del extracto de sorgo de alto tanino sin inocular derivatizado.

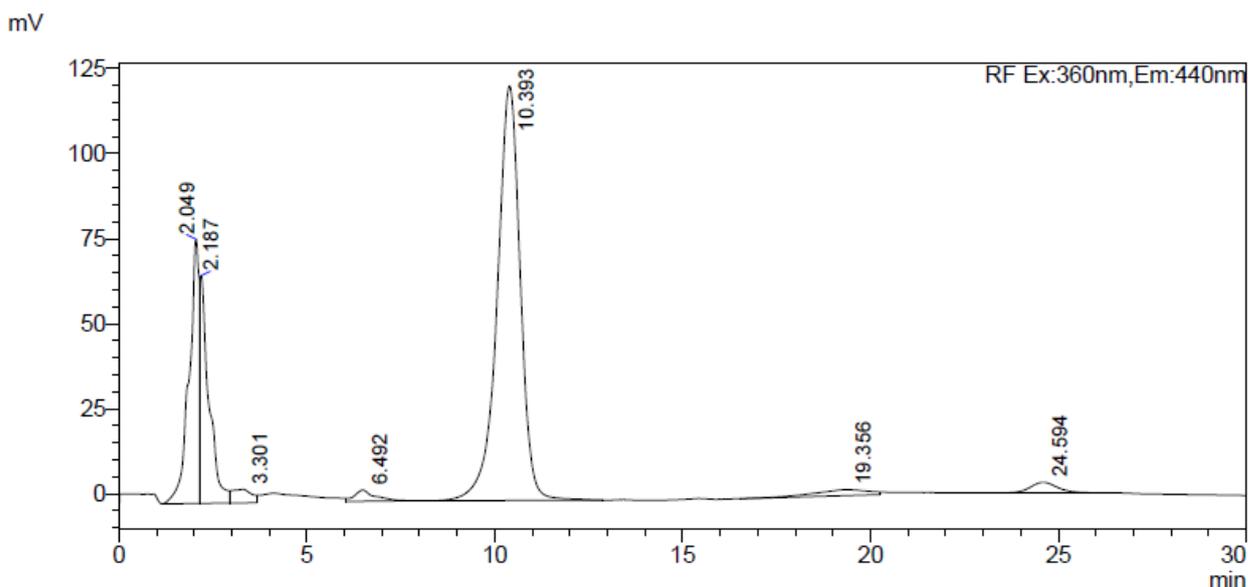


Figura III.4.4. Cromatograma de la muestra derivatizada correspondiente al ensayo 26 del diseño central compuesto diluido 1/50.

III.4.2. Puesta a punto de una metodología de PCR en tiempo real para cuantificar ADN de *A. flavus* en mini-silos de sorgo

La metodología se basó en el método desarrollado por Shweta et al. (2013) pero fue necesario incluir modificaciones para el análisis de las muestras obtenidas en esta tesis.

La curva estándar obtenida con el método modificado mostró una correlación lineal entre el logaritmo de la concentración de ADN y los valores de Ct obtenidos, con un R^2 de 0.99 (Figura III.4.5). Esta curva se realizó con cuatro diluciones al décimo a partir de una concentración de ADN de 53 ng/ μ L. El valor obtenido para la quinta dilución no se ajustó a la linealidad (Figura III.4.6). Para conocer el límite de detección del método se realizaron diluciones intermedias al medio, al cuarto y al quinto de la cuarta dilución al décimo (correspondiente a una concentración de 5.3×10^{-3} ng/ μ L). Estas diluciones presentaron valores de Ct que mostraron una correlación lineal con el logaritmo de la concentración de ADN (las diluciones intermedias no se muestran en el gráfico). La inclusión de las concentraciones correspondientes a las nuevas diluciones en la curva estándar no modificó el valor de R^2 y por lo tanto se consideraron dentro del rango dinámico. La ecuación obtenida de la curva estándar fue: $Ct = -3.277 \cdot \log(\text{concentración ADN}) + 19.538$. A partir de la misma se determinó la eficiencia del método, la cual fue de 102% al trabajar en el rango dinámico, el cual se estableció entre 5.3 ng y 1.3×10^{-3} ng de ADN de *A. flavus* (Figura III.4.5). El rango dinámico por gramo de sorgo se estableció entre 6.6×10^7 ng/g de sorgo y 2.9 ng/g de

sorgo. Las cuantificaciones de ADN de las muestras se realizaron trabajando en el rango dinámico establecido.

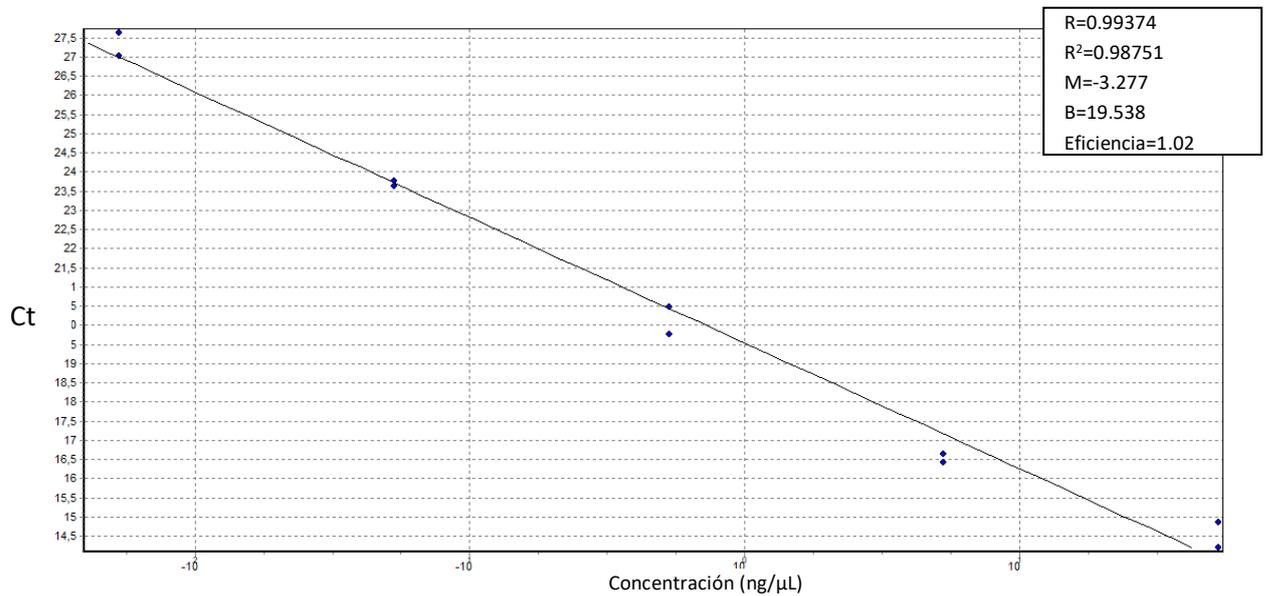


Figura III.4.5. Curva estándar de concentración de ADN de *A. flavus* PJA en función de los valores de Ct obtenidos. Se muestran los valores de la pendiente (B) y del coeficiente de correlación calculados mediante regresión lineal.

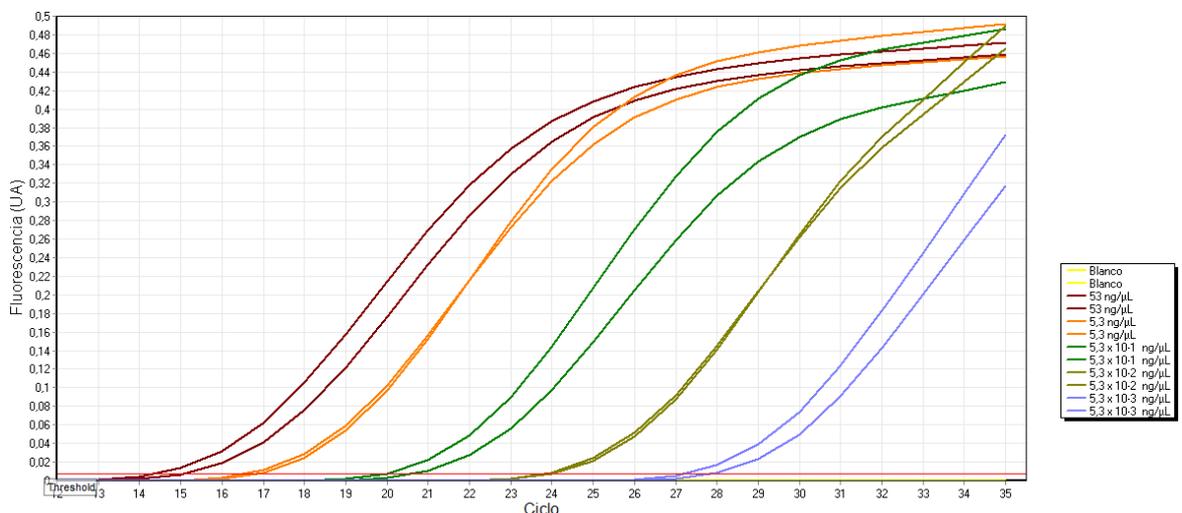


Figura III.4.6. Curva de fluorescencia adquirida en función de ciclos de amplificación de ADN de *A. flavus* PJA.

En la curva de melting se observa que la T_m del fragmento amplificado es de 85.5°C. No se observan productos de amplificación secundarios en las muestras y tampoco en los blancos. De esta forma se asegura que la fluorescencia obtenida en cada caso se debe exclusivamente a la amplificación de la región correspondiente a *A. flavus* (Figura III.4.7).

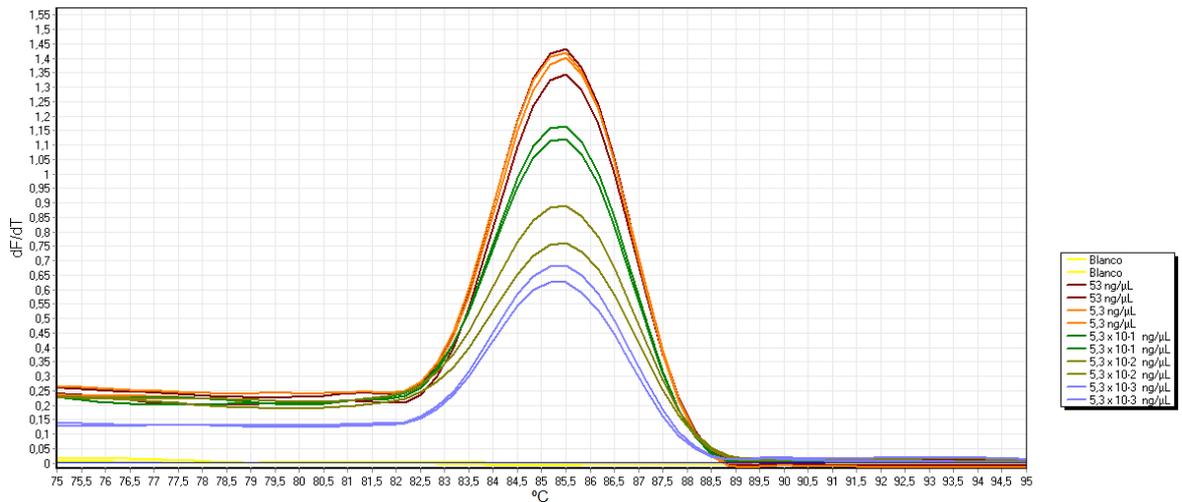


Figura III.4.7. Curva de melting para el producto de amplificación de *A. flavus* PJA.

III.4.2.1. Análisis del efecto matriz sorgo

Se analizaron muestras blanco (sin ADN de *A. flavus*) de agua y de ADN de matriz sorgo diluidas al medio, al cuarto y al décimo. A su vez, en estas matrices se analizó la misma concentración de ADN de *A. flavus*, por duplicado. Los valores de Ct obtenidos en el ensayo mostraron que el ADN de la matriz diluida al décimo no presentaba interferencias para cuantificar el ADN de *A. flavus*. Las diluciones menores que al décimo mostraban valores de Ct del blanco que se solapaban con los valores de Ct del límite inferior de la curva de calibración.

Para verificar que en el rango dinámico la dilución al décimo de la matriz no presentaba interferencias en la cuantificación del ADN de *A. flavus* se realizaron curvas de fluorescencia para diluciones de ADN de *A. flavus* en agua y en matriz diluida al décimo (Figura III.4.8). Las diferencias entre los valores de Ct (ΔCt) obtenidos para el ADN de *A. flavus* en agua y en matriz diluida al décimo fueron menores a 0.5 unidades (Tabla III.4.1.). Se consideran aceptables diferencias de hasta un 0.5 Ct entre el ADN fúngico diluido en agua y el mismo diluido en matriz (Cankar et al., 2006; CRL-GMFF, 2008). Por lo tanto, de estos resultados se concluye que las muestras de ADN extraídas del sorgo deben diluirse al décimo para ser cuantificadas por esta metodología, para que de esta manera la matriz no interfiera en la cuantificación de ADN fúngico en el rango dinámico establecido.

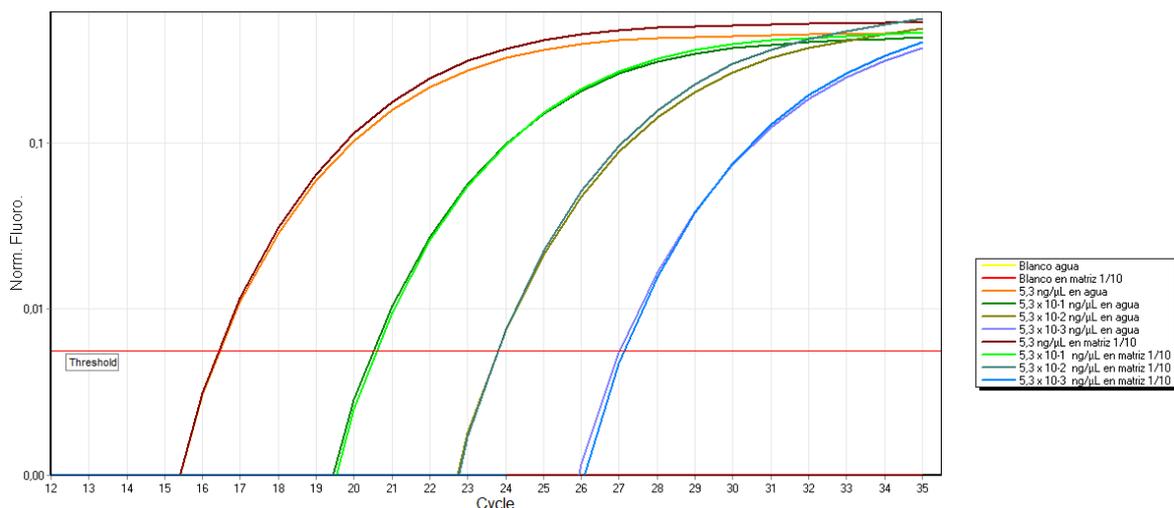


Figura III.4.8. Curva de fluorescencia en función de los ciclos de amplificación para diluciones al décimo de ADN de *A. flavus* (5.3 ng, 5.3x10⁻¹ ng, 5.3x10⁻² ng, 5.3x10⁻³ ng) en agua y en matriz.

Tabla III.4.1. Valores de Ct obtenidos para diluciones al décimo de ADN *A. flavus* en agua y en matriz. Se calculó el intervalo de 95% de confianza.

Concentración ADN (ng)	Ct agua	Ct matriz sorgo diluida al décimo
5,3x10⁰	16,53 ± 0,20	16,94 ± 1,05
5,3x10⁻¹	20,13 ± 0,70	20,39 ± 0,33
5,3x10⁻²	23,70 ± 0,15	23,58 ± 0,37
5,3x10⁻³	27,33 ± 0,60	26,87 ± 0,50

III.4.3. Estudio de las variables que afectan y optimizan la producción de AFB1

Se llevó a cabo la metodología de superficie de respuesta utilizando un diseño central compuesto para determinar la influencia de diferentes variables y los valores de las mismas que optimizaban la producción de AFB1 en el rango de estudio. Se obtuvieron 27 respuestas de producción de AFB1 en función de los 27 experimentos combinando diferentes valores de las variables estudiadas en el diseño (Tabla 1, Anexo 1). Los resultados se analizaron mediante ANOVA y se generó un modelo que incluye sólo a las variables significativas en la producción de AFB1 (Tabla III.4.2). En el intervalo estudiado el término lineal de la temperatura y los términos cuadráticos de la temperatura, la humedad y el tiempo fueron significativos para la respuesta ($p < 0.05$) no siendo significativo el inóculo inicial de *A. flavus* ($p > 0.05$). Los términos lineales de la humedad y el tiempo, no significativos, fueron incluidos en la ecuación para generar un modelo jerárquico. La significancia estadística del modelo también se verificó mediante ANOVA ($P=0.0001$) y se observó

el R² del modelo como indicador de la bondad de ajuste. Los datos de la respuesta al diseño central compuesto ajustaron a un modelo cuadrático para la producción de AFB1 con un R²=0.84 y la ecuación obtenida fue $\text{LOG}_{10}(\text{AFB1}) = -0.013*\text{humedad}^2 - 9.58 \times 10^{-3}*\text{temperatura}^2 - 0.11*\text{tiempo}^2 + 0.74*\text{humedad} + 0.47*\text{temperatura} + 1.51*\text{tiempo} - 18.31$.

Tabla III.4.2. ANOVA del Diseño Central Compuesto.

	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Valor F	p- valor prob > F
Modelo	54.27	6	9.04	17.48	< 0.0001
Humedad	0.70	1	0.70	1.34	0.2599
Temperatura	17.81	1	17.81	34.44	< 0.0001
Tiempo	2.07	1	2.07	4.00	0.0593
Humedad²	22.90	1	22.90	44.26	< 0.0001
Temperatura²	13.12	1	13.12	25.35	< 0.0001
Tiempo²	2.91	1	2.91	5.63	0.0278

El gráfico de superficie de respuesta del diseño obtenido muestra el efecto de dos variables significativas (la temperatura y la humedad) en la producción de AFB1 (Figura III.4.9). En este gráfico el inóculo inicial y el tiempo permanecen constantes con valores de 10⁴ esporas/g sorgo y 6 días respectivamente. La superficie de respuesta permitió observar los valores de temperatura y humedad que optimizan la producción de B1 en el rango de estudio (color rojo). El modelo predijo que los valores óptimos de las variables significativas que permitieron obtener la máxima producción de AFB1 dentro del rango de estudio fueron: humedad = 30%, temperatura = 25 °C y tiempo = 6 días.

Con el objetivo de validar el modelo se cuantificó la AFB1 en mini-silos de grano húmedo de sorgo con 30% de humedad incubados a 25 °C por 6 días. La concentración de AFB1 obtenida en estas condiciones fue de 10643 ± 1131 ng/ g sorgo, lo cual difiere solo un 3.4% del valor predicho por el modelo.

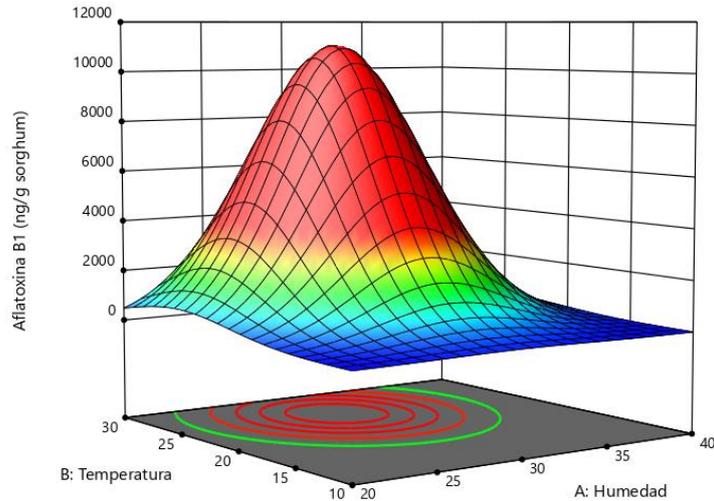


Figura III.4.9. Gráfico de superficie de respuesta en función de la humedad y la temperatura para la producción de AFB1 en los mini-silos de grano húmedo de sorgo.

III.4.4. Curva de crecimiento de *A. flavus* y cuantificación de AFB1 en las óptimas condiciones de producción

Las curvas de crecimiento de *A. flavus* a 25°C en los mini-silos de grano húmedo de sorgo con 30% de humedad mostraron que a las 24 horas comienza la fase exponencial y a las 48 horas ya se encuentra en la fase estacionaria (Figura III.4.10). Al realizar la cuantificación de AFB1 en estas condiciones se observó que a las 48 horas ya se detectaba este metabolito en el sistema con una concentración de 83.55 ng/ g de sorgo (Figura III.4.11).

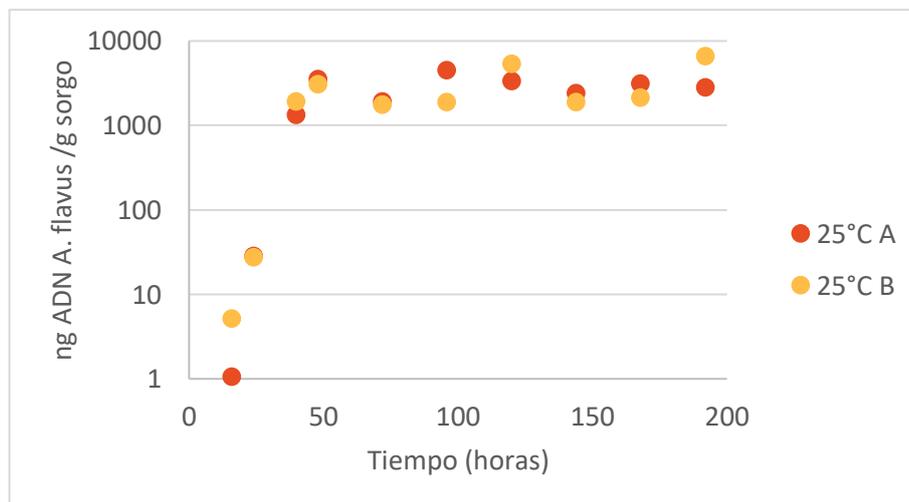


Figura III.4.10. Curva de crecimiento de *A. flavus* en mini-silos de grano húmedo de sorgo con 30% de humedad incubados a 25 °C. Las curvas se realizaron por duplicado (A y B).

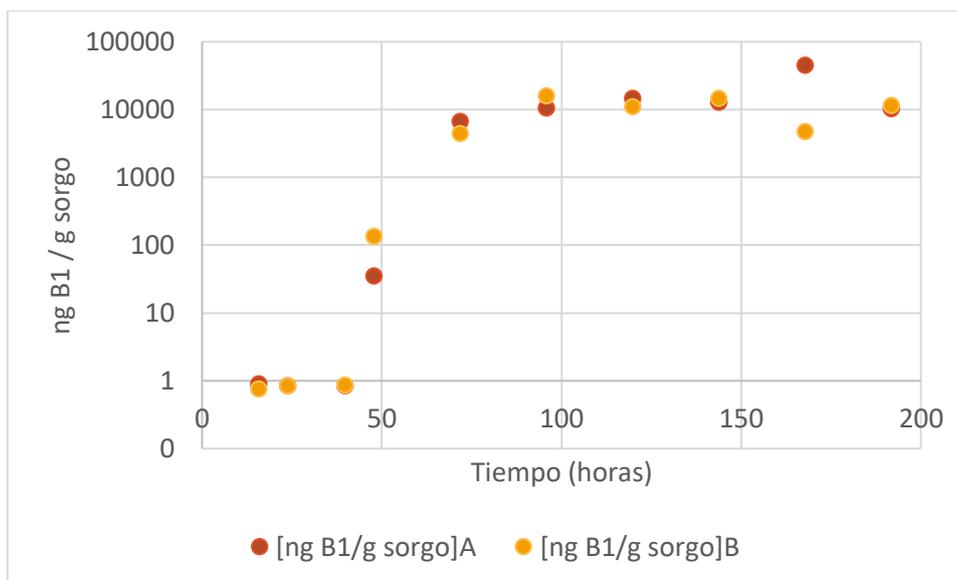


Figura III.4.11. Cuantificación de AFB1 en mini-silos de grano húmedo de sorgo con 30% de humedad incubados a 25 °C. Las curvas se realizaron por duplicado (A y B).

III.4.5. Modelado de curvas de crecimiento a diferentes temperaturas

En la tabla III.4.3 se observan los criterios de bondad de ajuste para el modelo de crecimiento de Gompertz y Logístico. Los datos se ajustaron a ambos modelos, pero no lo hicieron para el modelo de Weibull (no se logró que convergiera).

Tabla III.4.3 Criterios de bondad de ajuste para el modelo de crecimiento Gompertz a las diferentes temperaturas.

Abreviaciones: RMSE (raíz cuadrada del error medio), AICc (criterio de información de Akaike corregido).

Temperatura de crecimiento	Modelo de Gompertz			Modelo Logístico		
	RMSE	pseudo R ²	AICc	RMSE	pseudo R ²	AICc
15 °C	0,131	0,976	-3,79	0,114	0,982	-7,016
20 °C	0,11	0,990	-8,37	0,12	0,99	-5,74
25 °C	0,19	0,970	0,063	0,19	0,97	-0,92
30 °C	0,079	0,996	-15,73	0,099	0,994	-10,42

El modelo Logístico para la curva a 15 °C explica mejor los datos que el modelo de Gompertz ya que su valor de AICc es menor, presentando una diferencia de 3,2 unidades. Sin embargo, el modelo de Gompertz explica mejor los datos que el Logístico en las curvas a 20 °C y a 30 °C, presentando un AICc menor con diferencias entre los modelos de 2,6 y 5,3 unidades respectivamente. En la curva de 25 °C se considera que no hay diferencia entre ambos modelos ya que los valores de AICc son menores a 2 unidades.

En consecuencia, se elige el modelo de Gompertz como el modelo más plausible para representar el crecimiento del hongo a las temperaturas consideradas. En la Tabla III.4.4 se puede observar el valor estimado de los parámetros de este modelo para cada temperatura (Figura III.4.12 a, b, c y d).

Tabla III.4.4 Parámetros estimados del modelo de Gompertz para las diferentes temperaturas. A (asíntota superior), μ máx (velocidad de crecimiento máxima), λ (fase lag).

Temperatura	Parámetros	Error Estándar
15°C	A = 3.48 **	0.85
	μ máx = 0.03 ****	0.003
	λ = 63.77 ****	3.93
20°C	A = 3.90 ****	0.10
	μ máx = 0.085 ****	0.006
	λ = 17.90 ****	1.24
25°C	A = 3.48 ****	0.057
	μ máx = 0.17 ****	0.025
	λ = 15.37 ****	1.29
30°C	A = 4.52 ****	0.14
	μ máx = 0.13 ****	0.01
	λ = 8.01 ****	0.67

(***) p-valor < 0.001, (**) p-valor < 0.01

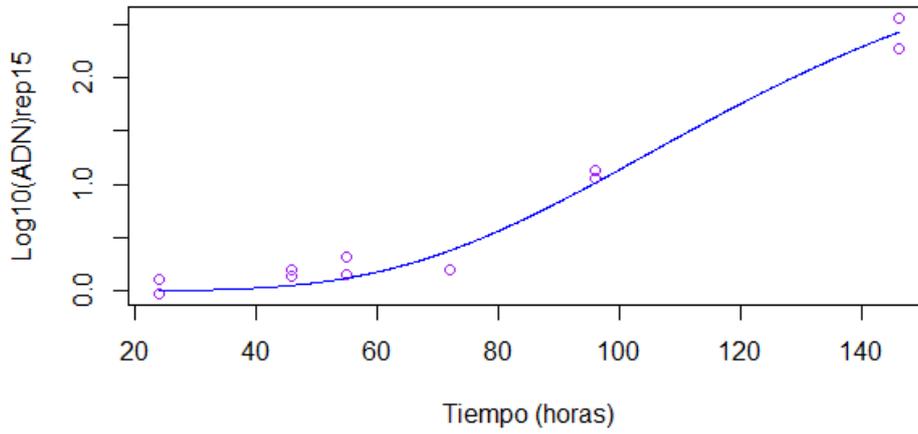


Figura III.4.12. a. Curva de crecimiento a 15 °C ajustada con el modelo de Gompertz.

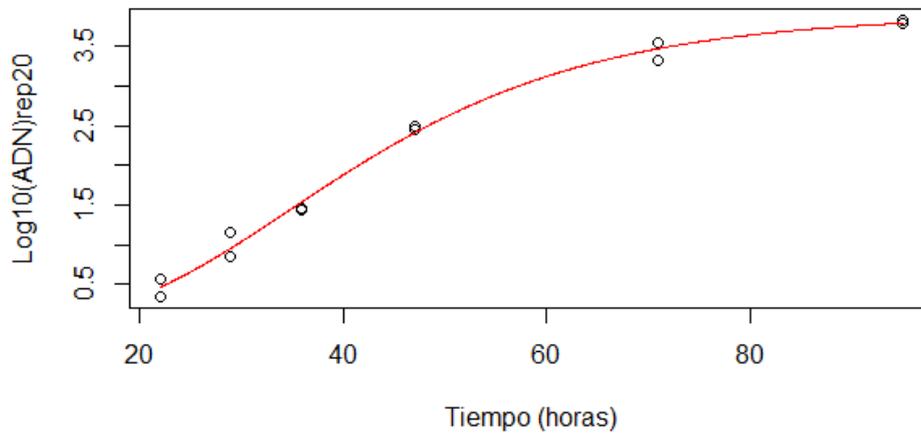


Figura III.4.12. b. Curva de crecimiento a 20 °C ajustada con el modelo de Gompertz.

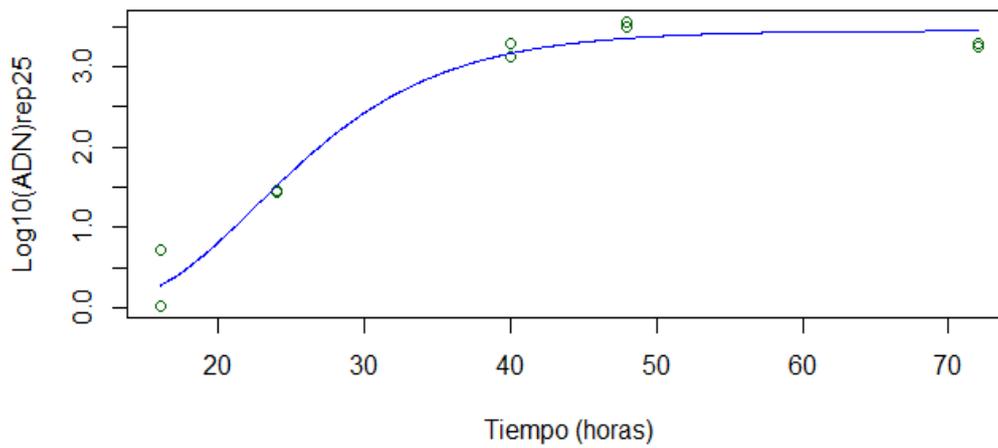


Figura III.4.12. c. Curva de crecimiento a 25 °C ajustada con el modelo de Gompertz.

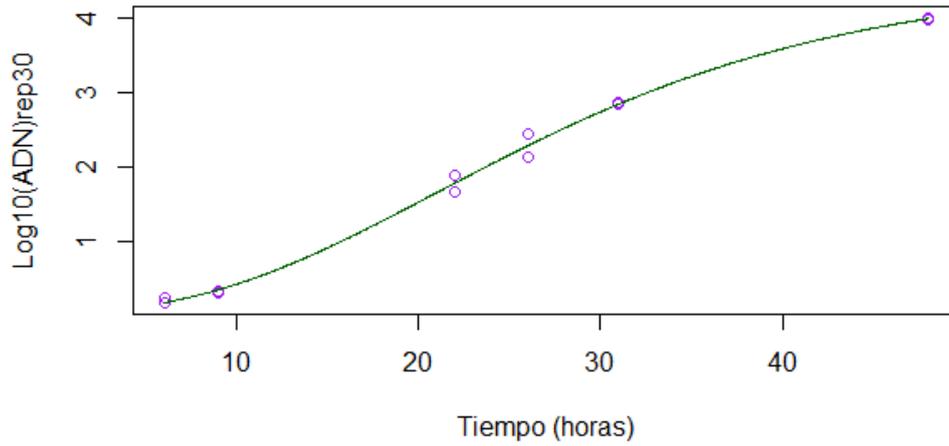


Figura III.4.12. d. Curva de crecimiento a 30 °C ajustada con el modelo de Gompertz.

De las ecuaciones que describen el crecimiento a las diferentes temperaturas se obtuvo el valor de velocidad de crecimiento (μ máx). En la figura Figura III.4.13 se puede observar que la velocidad de crecimiento de *A. flavus* aumenta rápidamente hasta 25 °C en el mini-silo, con un descenso no significativo a 30 °C. Posiblemente, la velocidad de crecimiento siga descendiendo más allá de los 30 °C.

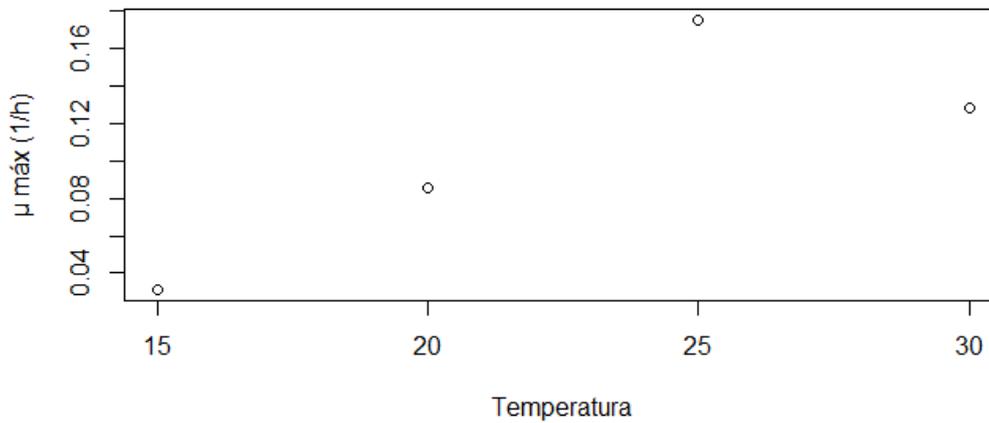


Figura III.4.13. μ máx en función de la temperatura (°C).

III.5 DISCUSIÓN

III.5.1. Desarrollo de una metodología de PCR en tiempo real para cuantificar ADN de *A. flavus* en mini-silos de sorgo

Para estudiar el crecimiento fúngico en diferentes sustratos se utilizan diversas estrategias, siendo una de las más utilizadas la medida del diámetro de la colonia en función del tiempo (Giorni et al., 2008; Lee et al., 2014). En este trabajo era imposible utilizar esta metodología ya que se trataba de determinar el crecimiento del hongo adentro del mini-silo. Para la cuantificación se utilizó una metodología de PCR en tiempo real, desarrollada por Shweta *et al.* (2013) para granos de maíz, la cual se modificó y se adaptó a la matriz sorgo.

En la modificación realizada en el presente trabajo del método desarrollado por Shweta *et al.* (2013) se logró disminuir el tiempo de la reacción en 17 minutos, realizando la hibridación y extensión en un solo paso (Figura III.5.1). Además, se logró una mejora en la eficiencia de la reacción la cual pasó de 161% a 102%.

Las ventajas obtenidas en la mejora de esta técnica son importantes debido a que la técnica publicada no cumplía con los parámetros de eficiencia establecidos para la PCR en tiempo real. La eficiencia debe encontrarse en un rango de entre 90% y 110% (0,9 y 1,1), ya que esto significa que el amplicón se está duplicando en cada ciclo, por lo que la cuantificación se está realizando en la fase exponencial (Dorak, 2007). Cuanto más cercana a 100% es la eficiencia, más precisos y reproducibles son los resultados.

Por otra parte, haber logrado una reducción del tiempo de reacción permitió optimizar el tiempo de trabajo.

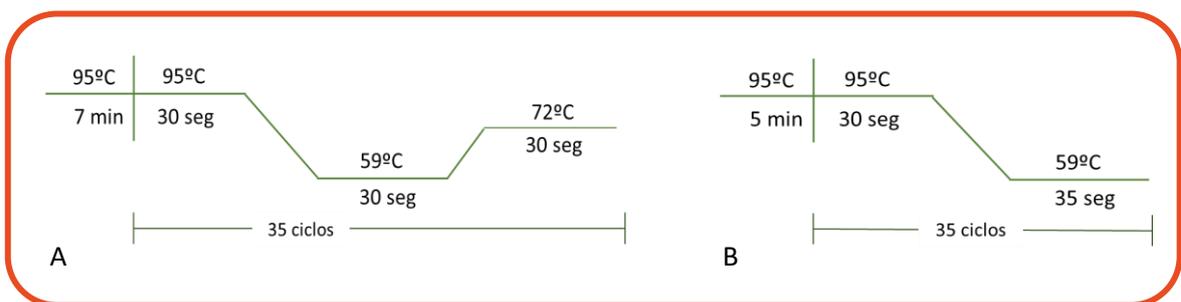


Figura III.5.1. Ciclo de amplificación del ADN de *A. flavus* por PCR en tiempo real. A: desarrollado por Shweta et al. (2013), B: método optimizado en la presente tesis.

III.5.2. Cuantificación de aflatoxina B1 en mini-silos de grano húmedo de sorgo

En este trabajo se desarrolló un método para cuantificar AFB1 en sorgo. Los límites permitidos de AFB1 en silos se rigen por los límites proporcionados para la alimentación animal. La Unión Europea y las GMP (2019) establecen un límite de 5 ppb (ng/g) de AFB1 en alimentos destinados a vacas lecheras, mientras que para alimentos destinados a otro tipo de ganado el límite es 20 ppb. En Uruguay, la Dirección General de Servicios Agrícolas del Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca recomienda un límite máximo de aflatoxinas de 20 µg/kg (ppb) en alimentos destinados a estos animales en producción, coincidiendo con los límites de la FDA y el USDA (Capelli et al., 2019; FAO, 2003). El método desarrollado en la presente tesis para la cuantificación de AFB1 en sorgo permitió un límite de cuantificación de $0,78 \pm 0,05$ ng/g, por lo cual puede utilizarse para determinar si las muestras cumplen con la reglamentación estipulada. Ferrero et al. (2019) encontraron contaminaciones con aflatoxinas en granos de maíz cercanos a 1 ppb previo al ensilado. Dado estos antecedentes, es muy importante contar con una técnica sensible que permita detectar este tipo de contaminación en el material de partida ya que alerta de posibles riesgos en ensilado final.

III.5.3. Variables que inciden sobre la producción de AFB1 en silos de grano húmedo de sorgo

Se ha demostrado que los granos de sorgo son un buen sustrato para el crecimiento de *A. flavus* y la producción de aflatoxinas (Ghali et al., 2009; Lahouar et al., 2015, 2016, 2018). Sin embargo, los niveles de contaminación detectados son variables y dependen de factores como la temperatura y la humedad de los granos. Los estudios acerca de la influencia de estos factores sobre contaminación de grano ensilado son escasos, pero se han detectado diferencias en cuanto a la temperatura y humedad del material a ensilar (Bernardes et al., 2018). A su vez hay referencias que muestran que la producción de AFB1 en silos de grano húmedo de sorgo es un potencial peligro para la salud animal, ya que en ciertas condiciones se alcanzan valores que superan los límites establecidos por las legislaciones vigentes en cada país (Keller et al., 2012).

Las aflatoxinas una vez formadas no se eliminan en el ensilado, por ello el diseño de estrategias para inhibir el crecimiento de los hongos productores es fundamental para disminuir los riesgos asociados (Cheli et al., 2013). Dado que el crecimiento de *A. flavus* en granos húmedos ensilados está limitado a las etapas donde la presencia de oxígeno permite su desarrollo, en este trabajo se estudió la influencia de diferentes factores sobre la aparición de aflatoxinas en la fase aerobia del ensilaje. Los resultados mostraron que, dentro de los rangos estudiados, la humedad, la temperatura y el tiempo de duración de la fase aerobia tenían un efecto significativo en la

cantidad de AFB1 encontrada en granos contaminados artificialmente con *A. flavus*. También se constató que la concentración inicial de esporas de *A. flavus* en el material a ensilar no tenía efecto significativo en la concentración final de AFB1, en el intervalo de concentraciones estudiado ($10^{2.32}$ esporas/g a $10^{5.68}$ esporas/g). Estos resultados corroboran reportes anteriores que sugieren que niveles muy bajos de contaminación con *A. flavus* en el material a ensilar, incluso indetectables por recuento en placa, podrían evolucionar dando como resultado un recuento mayor de este hongo y niveles detectables de AFB1, tanto en sorgo como en maíz (del Palacio & Pan, 2020; González Pereyra et al., 2008; Keller et al., 2013). Estos estudios también describen a *A. flavus* como el principal contaminante fúngico del material ensilado al momento de apertura del silo, demostrando la dificultad de obtener granos a ensilar libres de este hongo. Lo mencionado anteriormente señala la importancia de estudiar el efecto de diferentes variables sobre el desarrollo de *A. flavus* y la contaminación con aflatoxinas en los silos de sorgo.

En este sentido, Cheli et al. (2013) señalan la necesidad de desarrollar modelos predictivos sobre la presencia de micotoxinas en ensilados de acuerdo a las condiciones de almacenamiento. Los datos bibliográficos disponibles sobre modelos predictivos de crecimiento de *A. flavus* y producción de AFB1 se basan en su mayoría en datos de crecimiento fúngico y producción en medios de cultivo con agar en placa (García et al., 2013; Lee et al., 2014). Los datos obtenidos en estas condiciones difieren con lo que sucede realmente en las diferentes matrices y sistemas de almacenamiento por lo cual es necesario validar los modelos desarrollados o desarrollarlos directamente en los sistemas de estudio (Aldars-García et al., 2016; Giorni et al., 2008).

Hasta el presente no había datos disponibles que permitieran predecir la producción de AFB1 en la fase aerobia de silos de grano húmedo de sorgo. En esta tesis como aproximación al sistema en estudio, se utilizó el modelo de mini-silos de grano húmedo de sorgo realizado según el mini-silo a escala de laboratorio, desarrollado y validado por Petersson & Schnurer (1995), en sus estudios de control biológico.

Los resultados del presente trabajo mostraron que la producción de aflatoxina en los ensilados es máxima a 30% de humedad, 25°C de temperatura, luego de 6 días en fase aerobia. La temperatura óptima de producción de la toxina determinada en este estudio coincide con lo publicado en el Reporte Científico de la EFSA (European Food Safety Authority) (Battilani et al., 2012), donde se menciona que la mayoría de las cepas de *A. flavus* producen la mayor cantidad de aflatoxina a 25° C, y que a 15° C y 30° C disminuye la cantidad de AFB1 producida.

Con respecto a los valores óptimos de humedad para producción de aflatoxinas en granos, los estudios son escasos (Battilani et al., 2012) y dependen de la matriz en estudio. El valor óptimo para la producción de AFB1 determinado por el modelo desarrollado en esta tesis (30%) está dentro del rango de valores de humedad recomendados para el ensilado (Chalkling, 2016; Rovira

& Velazco, 2012). En cuanto a la duración de la fase aerobia debe considerarse que dicha fase, en silos bien confeccionados, en general se extiende por un período no mayor a 72 horas después del cierre (Piltz & Kaiser, 2004). Por ello, en ese tipo de silos no se alcanzarían los niveles máximos de producción predichos por el modelo. Sin embargo, las curvas de crecimiento de *A. flavus* y de producción de AFB1 desarrolladas en esta tesis demostraron que, a las 48 horas de incubación, en condiciones óptimas de temperatura y humedad, la concentración de AFB1 en los minisilos contaminados artificialmente con *A. flavus* superaba ampliamente los límites permitidos por la legislación nacional. Estos resultados remarcan el riesgo de la presencia de este hongo en el material a ensilar y enfatizan la necesidad de controlar su desarrollo en silos de sorgo.

Las curvas de crecimiento de *A. flavus* en los minisilos, obtenidas en este trabajo, mostraron que la proliferación del hongo está limitada en el sistema, alcanzando valores máximos equivalentes a 10^7 esporas/g. Como los estudios se han realizado con cultivos puros y no hay influencia de metabolitos producidos por otros microorganismos, se postula que la limitación del crecimiento se debe al agotamiento de algún nutriente esencial para el desarrollo del hongo. Si bien la entrada de oxígeno no está limitada, a medida que el hongo se desarrolla la difusión de gases a través del material se dificulta, por lo cual también podría suponerse una limitación del crecimiento debido a la menor disponibilidad de oxígeno.

Los valores finales de contaminación fúngica obtenidos en silos comerciales normalmente son menores a este valor, ya que ocurre competencia por oxígeno o nutrientes con otros microorganismos presentes, los cuales además pueden producir metabolitos que limitan el crecimiento fúngico. Sin embargo, valores de contaminación fúngica post fermentación mayores a 10^6 propágulos/g han sido detectados en silos de grano húmedo de sorgo y maíz (del Palacio et al., 2016; Ferrero et al., 2019). Estos valores superan el límite máximo admisible para los recuentos de hongos en las buenas prácticas de manipulación en alimentación animal (GMP, 2019) lo cual remarca la necesidad de contar con una estrategia que reduzca el crecimiento fúngico en estos sistemas.

III.5.4. Modelos de crecimiento de *A. flavus*

Los modelos predictivos se utilizan para predecir el comportamiento microbiano bajo diferentes condiciones (temperatura, pH, actividad de agua), así como su uso para prevenir la contaminación de alimentos y los riesgos potenciales para la salud asociados a la producción de toxinas. De los distintos modelos considerados en este trabajo, el modelo de Gompertz fue el más adecuado para describir el crecimiento de *A. flavus* en los mini-silos a diferentes temperaturas. Entre las temperaturas estudiadas, la mayor velocidad de crecimiento se obtuvo a 25 °C, coincidiendo con la temperatura de máxima producción de aflatoxinas en el sistema. A dicha temperatura se

determinó que *A. flavus* alcanzaba la fase estacionaria a las 48 horas, momento en el cual la concentración de AFB1 alcanzó valores cercanos a 100 ppb.

El modelo de Gompertz (Winsor, 1932) tiene la ventaja de presentar parámetros con un claro significado biológico, como la fase lag, la velocidad de crecimiento y el máximo aumento en la población microbiana, por lo cual es muy utilizado para modelar el crecimiento microbiano (Arroyo et al., 2005; Ochoa-Velasco et al., 2018). Así por ejemplo, se ha utilizado para modelar el crecimiento fúngico en granos de cebada almacenados a diferentes temperaturas y actividades de agua (Wawrzyniak, 2021) y para estudiar el crecimiento de *Fusarium verticilloides* y *Rhizopus stolonifer* en presencia de antifúngicos como timol y carvacol (Ochoa-Velasco et al., 2018). También en trabajos como los de Char et al. (2005), donde analizan la influencia de la actividad de agua, el pH y la adición de sorbato de potasio en el crecimiento fúngico de *Eurotium chevalieri*, *Aspergillus fumigatus* y *Penicillium brevicompactum* en dulce de leche almacenado a diferentes temperaturas. Estudios como los de Marín et al. (2006) modelaron mediante la ecuación de Gompertz el crecimiento de *Aspergillus carbonarius* y la producción de ocratoxina A en función de la temperatura en un medio de uva sintético.

En el presente trabajo los patrones de crecimiento ajustados por la ecuación de Gompertz mostraron que la velocidad de crecimiento a temperaturas menores que 25 °C disminuía marcadamente, alcanzando la mitad del valor máximo a 20 °C y un valor 4 veces menor a 15 °C. Estos resultados sugieren que la concentración de biomasa de *A. flavus* al final de la fase aerobia, resultaría menor si dicha etapa transcurriera a temperaturas menores a 25 °C. En cambio, a 30 °C la velocidad de crecimiento fue muy similar a la obtenida a 25 °C, no observándose una diferencia significativa. Esto muestra que oscilaciones de temperatura de almacenamiento en ese rango no evidenciarían cambios importantes en la colonización del sorgo en la fase aerobia del ensilado. Lo observado anteriormente sugiere que si el ensilado de grano húmedo se realiza a temperaturas de entre 25 °C y 30 °C el crecimiento de *A. flavus* va a darse en condiciones óptimas. Por lo tanto, hay que tener especial cuidado en la calidad de higiene del material de partida, en adicionar un inoculante que estimule la fermentación y en asegurar un rápido descenso del oxígeno para impedir la contaminación del material ensilado con *A. flavus* y concomitante producción de aflatoxinas.

IV. CAPÍTULO II: Control Biológico
de *A. flavus* en mini-silos de
sorgo

IV.1. INTRODUCCIÓN

IV.1.1. Control biológico

En sentido amplio, el control biológico se define como el control del crecimiento de una población por acción de uno o más organismos antagonistas (Pimenta et al., 2009). Esta interacción antagónica se puede dar a nivel microbiano. Son numerosos los trabajos que evidencian la acción de microorganismos capaces de proteger diversas matrices de los efectos deletéreos que causa el desarrollo de ciertas bacterias u hongos. En tal sentido el control biológico es ampliamente usado como solución para diferentes problemas agronómicos incluyendo la prevención de daños durante el almacenamiento poscosecha de diferentes productos. Las bases del desarrollo del control biológico en esta etapa cercana al consumo se han sustentado en las ideas pioneras de Wilson & Pusey (1985) sobre el control de hongos patógenos en frutas, las cuales, a lo largo de más de 30 años, han sido adoptadas por investigadores de todo el mundo para la búsqueda y desarrollo de productos destinados a este fin, algunos de los cuales han alcanzado desarrollo comercial (Wisniewski et al., 2007). Los microorganismos utilizados como agentes de biocontrol pueden ejercer su acción directamente sobre el patógeno (efecto antagonista), sobre el hospedero (inducción de resistencia) o a través de cambios en la matriz donde ocurre la interacción con el patógeno, limitando de esa forma su crecimiento (Arrarte et al., 2021). A su vez, estos microorganismos pueden actuar en diferentes momentos. Su efecto puede impedir la infección inicial, el desarrollo del patógeno sobre la matriz vegetal o evitar la aparición de las actividades productoras de daño o enfermedad bloqueando o eliminando factores de virulencia (Arrarte et al., 2021). Resulta fundamental conocer las variables que afectan cada proceso (infección, colonización, desarrollo del daño) y las condiciones en que se producen para poder realizar una búsqueda dirigida hacia el tipo de antagonista adecuado.

Estos conceptos se han aplicado también a la selección de microorganismos destinados al control del desarrollo de bacterias u hongos que causan pérdidas en la calidad o inocuidad de granos ensilados. En tal sentido se han desarrollado inoculantes microbianos los cuales, desarrollándose a partir de los compuestos solubles del ensilado, logran inhibir el desarrollo de microorganismos perjudiciales, sin afectar la calidad del ensilado. En la Introducción general se mencionaron los diferentes inoculantes comerciales disponibles, los cuales se pueden adquirir en nuestro país, pero no son de desarrollo nacional.

IV.1.2. Inoculantes microbianos

Los inoculantes microbianos se han convertido en los aditivos para silos más utilizados durante los últimos 12 o 15 años (Pahlow et al., 2003). Los mismos están compuestos principalmente por bacterias ácido lácticas (BAL) las cuales son encargadas de convertir los carbohidratos hidrosolubles principalmente en ácido láctico, logrando así el descenso de pH necesario en la fase de fermentación (Muck et al., 2018), segunda fase en el proceso de ensilado (*Introducción general*). Como se comentó en la *Introducción general*, también se han estudiado otros microorganismos además de las BAL como inoculantes de silos, entre ellos las lavaduras.

IV.1.2.1. Selección de microorganismos y clasificación de inoculantes

Según Whittenbury (1961) los microorganismos seleccionados como inoculantes de silos debían cumplir con las siguientes características: “ser competitivo, crecer de forma vigorosa en el silo, ser homofermentativo y producir la máxima cantidad de ácido láctico en corto tiempo, ser ácido tolerante, poder crecer en material con alto contenido de materia seca y a temperaturas cercanas a los 50 °C”. De acuerdo a Weinberg & Muck (1996) la capacidad de un inoculante microbiano de desarrollarse en el material a ensilar es una característica fundamental y por lo tanto debe considerarse esta especificidad al momento de seleccionar los inoculantes a utilizar. La incapacidad de colonizar el material del silo impide que los microorganismos inoculados dominen la fermentación e inhiban la actividad de otros microorganismos que pueden causar pérdidas de calidad e inocuidad. A su vez, los mismos autores señalan la necesidad de que los inoculantes microbianos incluyan también microorganismos seleccionados por su capacidad de inhibir el desarrollo de microbiota no deseada y BAL heterofermentativas por su capacidad para mantener la estabilidad aerobia luego de la apertura del silo

Actualmente los inoculantes microbianos pueden clasificarse en generaciones según su desarrollo en el tiempo. Las distintas generaciones se componen de microorganismos con diferentes características (Duniere et al., 2015). De esta manera, la primera generación está compuesta por BAL homolácticas, que disminuyen rápidamente el pH del silo (Lesins & Schulz, 1968). Las BAL más frecuentemente utilizadas como inoculantes de primera generación son *Lactobacillus plantarum*, *Enterococcus faecium* y *Pediococcus* spp. (Weinberg et al., 2003).

La segunda generación de inoculantes incorpora bacterias heterolácticas como *L. buchneri* que producen ácido acético. La producción de ácido acético se obtiene junto con la formación de 1,2-propanediol por degradación de ácido láctico en condiciones de anaerobiosis (Oude Elferink et al., 2001). Estudios mostraron que la adición de *L. buchneri* mejora la estabilidad aeróbica del ensilado inhibiendo a los microorganismos causantes de deterioro. La mejora en la calidad del

material ensilado depende de las BAL homofermentativas que se combinan en el inóculo junto a *L. buchneri* (Reich & Kung, 2010).

Los inoculantes de tercera generación apuntan a mejorar la digestibilidad ruminal, por lo tanto los mismos incluyen microorganismos capaces de producir enzimas fibrolíticas que aumenten la digestibilidad del forraje (Duniere et al., 2015). Por ejemplo, cepas de *L. buchneri* productoras de feruloil esterasas, que hidrolizan a los polisacáridos feruloilados presentes en la pared celular del forraje, los cuales limitan la digestión ruminal de la fibra presente en cereales y forraje. La utilización de un inoculante microbiano compuesto por una mezcla de BAL homolácticas y *L. buchneri* productor de feruloil esterasas aumentó la estabilidad aeróbica en el silo y mejoró la eficiencia en la alimentación, lo cual se observó por una ganancia de peso corporal en los animales que consumieron el ensilado (Addah et al., 2012).

Duniere et al. (2015) proponen una cuarta generación de inoculantes combinando *Lactobacillus* spp. con “microorganismos de alimentación directa” conocidos por su sigla en inglés como DFM (direct feed microorganisms), como la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Estos microorganismos se han utilizado en la industria ganadera por más de 20 años por sus efectos benéficos en el crecimiento animal, la producción de leche y la digestibilidad ruminal (McAllister et al., 2011). Esta cuarta generación de inoculantes microbianos además de mejorar la calidad del ensilado y la estabilidad aeróbica, tiene como finalidad mejorar la salud de los rumiantes y/o su producción alterando la ecología microbiana de su tracto gastrointestinal (Duniere et al., 2015).

IV.1.2.2. Bacterias ácido lácticas (BAL)

Las BAL son cocos o bacilos gram positivos, no esporulados, anaerobios o aerotolerantes, catalasa y oxidasa negativos, que tienen un metabolismo exclusivamente fermentativo (Carr et al., 2002).

El grupo funcional pertenece al Phylum *Firmicutes*, clase *Bacilli*, orden *Lactobacillales* está distribuido en 5 familias diferentes (*Aerococcaceae*, *Carnobacteriaceae*, *Enterococcaceae*, *Lactobacillaceae* y *Streptococcaceae*), 67 géneros y más de 500 especies (Kwok, 2014; Zheng et al., 2020). Diversos géneros integran el grupo de BAL, algunos de ellos son *Lactobacillus* spp., *Leuconostoc* spp., *Pediococcus* spp., *Lactococcus* spp., *Enterococcus* spp., *Pediococcus* spp., *Streptococcus* spp. (Carr et al., 2002; Kwok, 2014).

Recientemente se realizó una reclasificación que ubicó a la familia *Leuconostocaceae*, que formaba parte del grupo funcional de BAL, dentro de la *Lactobacillaceae*. A su vez el género *Lactobacillus* se reclasificó en 25 géneros (Zheng et al., 2020). Actualmente se está transcurriendo por una fase de transición para realizar las adjudicaciones de los nuevos géneros. En el presente trabajo, dado que se realizaron análisis de comunidades microbianas antes de la reclasificación y

los datos ya fueron publicados (Gonda et al., 2019), se consideró oportuno en el contexto de esta tesis continuar nombrando al género *Lactobacillus*.

Lactobacillus es el género que tiene el mayor número de especies reconocidas como GRAS (Generally Recognized As Safe), varias de estas especies son relevantes para la microbiología de alimentos y la salud humana y animal por su participación en los productos fermentados o su rol como probiótico (Salveti et al., 2012).

Las BAL se caracterizan por la producción de ácido láctico a partir de la fermentación de carbohidratos (Madigan et al., 2019; Zheng et al., 2020). De acuerdo a los productos obtenidos por fermentación de los azúcares las BAL pueden clasificarse como homofermentativas o heterofermentativas (Madigan et al., 2019).

Las BAL homofermentativas fermentan hexosas por la vía de la glucólisis (Embden-Meyerhof-Parnas, EMPP) obteniéndose ácido láctico como producto del proceso. En cambio, las BAL heterofermentativas carecen de la enzima aldolasa, enzima clave en la glucólisis, por lo cual el primer paso del catabolismo es el de la vía de las pentosas fosfato. En este caso, en la fermentación de las hexosas se generan otros productos además de lactato, principalmente etanol y CO₂ (Madigan et al., 2019).

Las BAL son fundamentales en el proceso de ensilaje logrando la disminución del pH por producción de ácido orgánicos, principalmente láctico y la consecuente inhibición del crecimiento de los microorganismos presentes en el material ensilado. Además, se ha demostrado en muchos casos la capacidad de producir una amplia gama de metabolitos con propiedades antimicrobianas como etanol, ácidos grasos, peróxido de hidrógeno, diacetilo, fenil lactato, hidroxifenil lactato, dipéptidos cíclicos y bacteriocinas como nisina, reuterina, pediocina, lacticina, enterocina (Magnusson & Schnürer, 2005; Reis et al., 2012). Estos compuestos también contribuyen a la inhibición de los contaminantes microbianos en el proceso de ensilado. Dependiendo del material a ensilar y el tipo de silo corresponderá estudiar la potencialidad del conjunto de BAL utilizadas.

IV.1.2.3. Levaduras como inoculantes

Las levaduras han sido consideradas como un defecto en silos por iniciar la fase de deterioro aeróbico, asimilar lactato y generar fermentaciones no deseadas (Pahlow et al., 2003). Sin embargo, Schnürer & Jonsson (2011) propusieron que, en el caso de ensilado de granos, el cultivo inoculante debería estar compuesto por una mezcla de levaduras y BAL seleccionadas. Las bacterias controlarían el desarrollo microbiano por producción de ácidos orgánicos, con una concomitante disminución del pH, y de otros compuestos con actividad antimicrobiana y las levaduras contribuirían a la inhibición del desarrollo fúngico, en especial, pero no exclusivamente, en la primera etapa aerobia. Estos investigadores seleccionaron la levadura *Pichia anomala*

(actualmente *Wickerhamomyces anomalus*) J121 capaz de inhibir el crecimiento y producción de toxinas de *Penicillium roquefortii* y otros hongos toxicogénicos en silos de grano húmedo de varios cereales. Trabajos posteriores demostraron que la acción inhibitoria de la levadura seleccionada ocurría principalmente por competencia por oxígeno con los hongos a controlar y a través de la producción de etilacetato y etanol que actuaban como inhibidores del crecimiento fúngico (Druvefors et al., 2005).

En los últimos años se patentó una cepa de *S. cerevisiae* como un inoculante de silos. Los autores declararon que el uso de la levadura mantenía la estabilidad aeróbica del silo y potenciaba la fermentación y digestión ruminal incrementándose la producción de carne y leche (Owens & Smiley, 2018).

Las levaduras, en particular *Saccharomyces* spp., están entre los DFM más utilizados. *Saccharomyces cerevisiae* se ha utilizado como DFM de forma extensiva en rumiantes, especialmente en vacas lecheras. Se observó que el suplementar a los rumiantes con *S. cerevisiae* como DFM podía inducir cambios en la población bacteriana del rumen, aumentando el número de bacterias fibrolíticas, lo que explicaría los resultados de la mejora en la digestibilidad de la fibra (Duniere et al., 2015).

Estudios en silos experimentales inoculados de forma individual con dos cepas de *S. cerevisiae* y una de *S. paradoxus* mostraron que estos microorganismos no afectaban la calidad nutricional, la estabilidad aeróbica o la población microbiana del silo, por lo cual los mismos podían formar parte de un inoculante microbiano para silos (Duniere et al., 2015). A su vez, cuando se utilizó un inóculo mixto compuesto por *S. cerevisiae* y *L. buchneri* en micro silos experimentales de maíz (Xu et al., 2019), ambos microorganismos coexistieron, aumentando *L. buchneri* en la fase de ensilado y manteniéndose estable durante la apertura del silo, mientras que *S. cerevisiae* se mantuvo viable durante el ensilado e incrementó durante la apertura del mismo. Este inoculante de cuarta generación mostró que el inóculo mixto puede convertir al silo en un vehículo para administrar levaduras benéficas a los rumiantes.

Otra característica fundamental, particularmente en el caso de *S. cerevisiae*, han sido los estudios que muestran que los polímeros de manano presentes en su pared tienen la capacidad para adsorber micotoxinas como ocratoxinas y aflatoxinas (Abdolshahi et al., 2019). Los glucomanos esterificados presentes en sus paredes se unen de forma irreversible a las aflatoxinas (Raju & Devegowda, 2001), impidiendo la absorción de las mismas en el intestino y por ende provocando su excreción en las heces. Estudios *in vitro* mostraron que esta levadura podía reducir la biodisponibilidad de AFB1 a nivel intestinal sin perder su capacidad de mejorar la fermentación ruminal (Dogi et al., 2011).

Por lo anteriormente expuesto un inóculo mixto integrado por BAL seleccionadas y levaduras parecería ser la opción más completa al momento de mitigar las deficiencias del método de ensilado. En general, se sugiere que el aislamiento de microorganismos para el desarrollo de un potencial inoculante se realice del mismo tipo de silo ya que se considera que dichos microorganismos van a tener una mejor adaptabilidad al sistema. Sin embargo, en el presente trabajo se utilizó como una estrategia innovadora al kefir de agua como reservorio de potenciales microorganismos inoculantes, ya que la microbiota asociada es similar a los inoculantes de cuarta generación.

IV.1.3. Kefir de Agua

IV.1.3.1. Generalidades

El kefir de agua (KA) es una bebida fermentada, ligeramente ácida obtenida por fermentación de soluciones azucaradas con gránulos de kefir de agua. Los gránulos de kefir de agua son transparentes, mucilaginosos y están formados por microorganismos embebidos en exopolisacáridos formados principalmente por α -glucanos, siendo el principal el dextrano. El consorcio de microorganismos presentes en el gránulo de KA está compuesto por BAL, especialmente del género *Lactobacillus*, bacterias ácido acéticas (BAA) y levaduras principalmente del género *Saccharomyces* (Lynch et al., 2021).

El origen del KA es desconocido. Se los llamo “gránulos de kefir azucarados” para diferenciarlos de los gránulos utilizados para fermentar la leche (Pidoux et al., 1988). El primer artículo científico publicado sobre gránulos de kefir fue por Beijerinck en 1889 quien los relacionó con las plantas de la cerveza de jengibre que los soldados ingleses trajeron de la guerra de Crimea en 1855 (Fiorda et al., 2017). Se cree que la planta de la cerveza de jengibre proviene de la región caucásica. Sin embargo, parece que hay más de un origen de los gránulos de kefir de agua. Pidoux et al. (1988) distinguieron tres orígenes: gránulos Tibi originarios de México, gránulos de la planta de cerveza de jengibre originarios de la región caucásica y los gránulos de kefir azucarados, los cuales fueron encontrados en Francia, pero su origen es desconocido (Lynch et al., 2021). De todas formas, más allá de su origen actualmente no se distinguen los gránulos según esta clasificación.

Es importante no confundir a los gránulos de kefir de agua con los gránulos de kefir de leche. Los gránulos de kefir de leche tienen color blanco o marfil y el polisacárido principal del gránulo es el kefiran (Rosa et al., 2017). El consorcio de microorganismos también está formado por BAL, BAA y levaduras pero la abundancia relativa y la composición de éstos en el gránulo es muy diferente al encontrado en los gránulos de kefir de agua (Guzel-Seydim et al., 2021).

El kefir de agua es una bebida generalmente casera. Los gránulos de kefir se retiran para consumir la bebida y los mismos se colocan en un sustrato fresco para una nueva fermentación. De esta

manera los gránulos pasan de generación en generación. En general estos gránulos no son comerciales, sino que la forma de adquirirlos es por donación. El uso de cultivos iniciadores definidos para obtener el KA no es una práctica que se realice. Además, no se ha logrado aún reconstituir los gránulos de KA a partir de un inóculo definido (Lynch et al., 2021).

Las soluciones azucaradas que se utilizan como sustratos de fermentación son soluciones que contienen sacarosa, las mismas pueden realizarse a partir de azúcar de mesa o azúcar mascabo, panela (producto derivado de la caña de azúcar), melaza. Los azúcares son la fuente de carbono mientras que se suelen adicionar frutas o frutos secos como fuente de otros nutrientes (Gamba et al., 2019; Lynch et al., 2021; Martínez-Torres et al., 2017).

IV.1.3.2. Microorganismos presentes en el Kefir de Agua

Como se mencionó anteriormente la diversidad microbiana del kefir de agua consiste en un consorcio estable formado principalmente por BAL, BAA y levaduras (Fiorda et al., 2017). Se estudió la comunidad microbiana del kefir de agua, y se determinó que era muy similar a la presente en los gránulos a partir de los cuales se produce y que se mantenían estable durante el proceso de fermentación (Laureys & De Vuyst, 2014).

Los microorganismos predominantes del gránulo de KA son las BAL del género *Lactobacillus*, BAA del género *Acetobacter* y levaduras del género *Saccharomyces*. Estudios de diferentes comunidades de KA sugieren que hay una tendencia en las especies de microorganismos que se encuentran con alta frecuencia en estas comunidades, pero que no hay una especie característica o común a todas. Lo mencionado anteriormente ocurre en particular en la comunidad bacteriana. Parece que el origen geográfico del gránulo de kefir, el sustrato que se utilice para la fermentación, la disponibilidad de nutrientes y la presencia de oxígeno son factores que determinan que especies serán las predominantes en el KA (Laureys et al., 2018; Lynch et al., 2021).

El estudio de estas comunidades se ha realizado utilizando técnicas dependientes o independientes del cultivo. Los métodos de cultivo han sido útiles para caracterizar a los microorganismos presentes en el KA ya que son los únicos métodos que permiten aislar y seleccionar a las cepas microbianas para aplicaciones biotecnológicas. Sin embargo, en algunos casos estos métodos no permiten detectar todos los miembros de las comunidades microbianas, en particular los que se encuentran en menor número, los que requieren condiciones especiales de cultivo, los que se encuentran en un estado viable no cultivable o aquellos que hasta el momento no han sido recuperados por cultivo (Zanirati et al., 2015). Los métodos independientes del cultivo son capaces de evidenciar la presencia de estos microorganismos, pero tienen la desventaja de que detectan microorganismos viables y no viables. En algunos casos, además, el

sesgo del método de amplificación utilizado puede impedir la detección de ciertos microorganismos (Garmendia et al., 2021). Por ello, el uso de ambos tipos de métodos es fundamental para aproximarse al conocimiento de una comunidad microbiana.

Las especies de BAL comúnmente aisladas o detectadas en el kefir de agua son especies del género *Lactobacillus* como *L. hilgardii*, *L. nagelii*, *L. casei*, *L. paracasei*, *L. harbinensis* (Fiorda et al., 2017; Gamba et al., 2021; Gulitz et al., 2011; Laureys & De Vuyst, 2014). *L. hilgardii* es considerado como uno de los microorganismos imprescindibles para la comunidad microbiana del gránulo de kefir porque está asociado a la producción del exopolisacárido (Fels et al., 2018).

Además de *Lactobacillus* spp. se han aislado o identificado otras bacterias lácticas del género *Leuconostoc* spp, siendo las especies más frecuentes *L. mesenteroides* y *L. citreum* (Fiorda et al., 2017; Gulitz et al., 2011). También se han encontrado especies del género *Bifidobacterium* como *B. psychraerophilum* y *B. aquikefiri* (Laureys et al., 2016; Laureys & De Vuyst, 2014). Con menos frecuencia, también se han encontrado especies de *Oenococcus* como *O. oeni* y *O. kitaharae* (Laureys et al., 2019; Laureys & De Vuyst, 2014).

Otras bacterias presentes en el KA son las BAA, las cuales oxidan el etanol ácido acético. Se ha visto que la concentración de las mismas en el KA es muy variable, lo que lleva a que muchas veces no se puedan recuperar por métodos dependiente de cultivo (Laureys et al., 2018). Generalmente en la fase de fermentación se encuentran en baja cantidad debido a la variabilidad en la disponibilidad de oxígeno ya que las BAA son aerobias estrictas. A su vez, el etanol que es una importante fuente de energía para las BAA, se produce al final de esta fase.

A. fabarum, *A. indonesiensis*, *A. lovaniensis*, *A. orientalis*, *A. tropicalis*, *A. okenawensis* han sido frecuentemente identificadas en el kefir de agua (Gamba et al., 2021; Gulitz et al., 2011; Laureys et al., 2018; Laureys & De Vuyst, 2014; Martínez-Torres et al., 2017). Otras BAA detectadas con menor frecuencia pertenecen al género *Gluconobacter* por ejemplo *G. roseus/oxydans* y *G. liquefaciens* (Fiorda et al., 2017; Gamba et al., 2021; Laureys et al., 2018). Hasta el momento, el género *Gluconacetobacter* sólo ha sido detectado por método independiente de cultivo en esta matriz (Marsh et al., 2013).

Las levaduras son menos diversas que las especies bacterianas. La especie *Saccharomyces cerevisiae* ha sido encontrada con una alta frecuencia sugiriendo que es un microorganismo fundamental en la comunidad del KA. Otras especies de levaduras han sido encontradas con menos frecuencia como *Zygorhynchus florentina*, *Hanseniaspora valbyensis*, *Kluyveromyces lactis*, *Dekkera bruxellensis*, *Pichia membranifaciens*, *Pichia occidentalis* (Fiorda et al., 2017; Gamba et al., 2019; Gulitz et al., 2011; Laureys et al., 2019; Lynch et al., 2021).

IV.1.3.3. Efectos benéficos del KA

El KA es reconocido por ser una excelente fuente de microorganismos probióticos con beneficios potenciales para la salud (Dong-Hyeon et al., 2015; Guzel-Seydim et al., 2011; Vinderola et al., 2005). Algunas de las propiedades que el KA presenta es actividad antioxidante, anti-inflamatoria, antifúngica y antibacteriana (Gamba et al., 2019; Silva et al., 2009).

Lo mencionado anteriormente sugiere que el KA representa un excelente recurso para obtener microorganismos y generar un inóculo definido para silos. Este inóculo por su composición podría lograr los beneficios de los inoculantes de cuarta generación.

IV.2 OBJETIVO GENERAL

Seleccionar bacterias lácticas y levaduras capaces de inhibir el crecimiento de *A. flavus* en mini-silos de sorgo durante la fase aerobia del ensilado.

IV.2.1. Objetivos específicos

- Aislar e identificar bacterias lácticas y levaduras de silos de grano húmedo de sorgo
- Estudiar el control del crecimiento de *A. flavus* en mini-silos tratados con kefir de agua
- Estudiar la comunidad microbiana del kefir de agua
- Aislar e identificar las bacterias lácticas y levaduras del kefir de agua
- Seleccionar bacterias lácticas y levaduras para ensayos de inhibición de *A. flavus* en mini-silos de sorgo
- Seleccionar bacterias lácticas y levaduras para generar un inóculo mixto

IV.3 MATERIALES Y MÉTODOS

IV.3.1. Aislamiento de bacterias ácido lácticas (BAL) y levaduras de silos de grano húmedo de sorgo

Se muestrearon dos silos de grano húmedo de sorgo de un tambo del noroeste de Uruguay. Un silo confeccionado con sorgo granífero Jowar food II y otro con sorgo granífero Flash 10. El primer silo estaba cerrado y estabilizado, mientras que el segundo estaba abierto para alimentación. Se tomó una muestra de cada silo pinchando la bolsa en la mitad de la cara superior. Además del silo abierto se tomaron dos muestras de la cara frontal del mismo en la zona media en los extremos.

Para el aislamiento se tomaron 5 g de muestra y se suspendieron en 45 mL de suero fisiológico estéril. La suspensión se homogeneizó 1 minuto en un mezclador (Stomacher 400, Seward, UK) y a partir del producto homogeneizado se prepararon diluciones seriadas al décimo de forma de obtener las diluciones 10^{-3} , 10^{-5} y 10^{-7} las cuales se sembraron en superficie (0.1 mL) en los medios Papa Dextrosa Agar (Oxoid Ltd, Inglaterra) (PDA) con 0,017 % cloranfenicol (Sigma-Aldrich, USA) y de Man Rogosa Sharpe agar (Oxoid Ltd, Inglaterra) (MRS) con 0,01% de cicloheximida (Sigma-Aldrich, USA). Las placas de PDA con cloranfenicol se incubaron en aire a 28 °C, mientras que las últimas se incubaron a 28°C en anaerobiosis. La anaerobiosis fue generada utilizando sobres de anaerobiosis AnaeroGen™ 2,5 L (Thermo Scientific™, USA). Se realizaron recuentos en los medios PDA con cloranfenicol y MRS con cicloheximida. Se aislaron todas las colonias de levaduras y bacterias que presentaron una morfología diferente y se identificaron a nivel de

especie como se describe en IV.3.2, IV.3.3, IV.3.4. Las bacterias aisladas se conservaron en caldo MRS con 20 % de glicerol a -70 °C, mientras que las levaduras se conservaron en tubos de PDA inclinado a 4°C.

IV.3.2. Identificación de levaduras

Para la identificación de los aislamientos de levaduras se analizó la región D1/D2 perteneciente a la región que codifica para el 26S ARNr. La extracción de ADN se realizó según Schena et al. (1999), utilizando perlas de vidrio. La amplificación de las secuencias se realizó según Martínez et al. (2016) utilizando un termociclador MultiGene Mini Personal TC020-24 (Labnet International Inc., USA) en un volumen de 25 µL conteniendo 2,5 µL de buffer 10X, 2,5 µL de solución de dNTPs (2 mM), 1,5 µL de solución de MgCl₂ (25mM), 0,5 µL de primer ITS 1 (White et al., 1990), 0,5 µL de primer D2R (Peterson & Horn, 2009), 16,3 µL de agua MiliQ estéril, 0,2 µL de la enzima Taq (2.5 U/µL) (Fermentas, Thermo Fisher Scientific, USA) y 1 µL de ADN. La amplificación se verificó por electroforesis en gel de 0.8% de agarosa utilizando como revelador el intercalante de ADN Gel Red (Biotium, California, USA). Los fragmentos de ADN obtenidos por PCR, fueron purificados y secuenciados por Macrogen Inc. (Seoul, Korea) a partir del primer D2R. Una vez obtenidas las secuencias, las mismas se analizaron por comparación en base de datos del GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), aplicando el algoritmo BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). En todos los casos, el criterio utilizado para la asignación taxonómica a nivel de especie fue una homología de secuencias entre la secuencia del aislamiento y la secuencia de la cepa tipo depositada en el GenBank mayor al 99 % (Kurtzman, 2011a).

IV.3.3. Identificación de bacterias

La identificación molecular de los aislamientos se realizó por análisis de parte del gen que codifica para el 16S ARNr. La extracción de ADN se realizó mediante lisis alcalina. En resumen, se agregaron 100 µL de una solución de NaOH 0.05 M a una suspensión de bacterias cuya turbidez era equivalente al tubo 1 de la escala de Mc Farland, realizada con un cultivo sembrado en MRS de 48 horas. La suspensión alcalina se incubó durante 15 minutos a 95°C. Posteriormente las lisis se centrifugaron a 10000 rpm por 2 minutos y se guardaron los sobrenadantes. Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador MultiGene Mini Personal TC020-24 (Labnet International Inc., USA) en un volumen de 25 µL conteniendo 2,5 µL de buffer 10X, 2,5 µL de solución de dNTPs (2 mM), 1,5 µL de solución de MgCl₂ (25mM), 1 µL de primer 27F (10 µM)(Hogg & Lehane, 1999), 1 µL de primer 1492R (10 µM) (Hogg & Lehane, 1999), 15,3 µL de agua MiliQ estéril, 0,2 µL de la enzima Taq (2.5 U/µL) (Fermentas, Thermo Fisher Scientific, USA) y 1 µL del sobrenadante de la lisis. El ciclo de amplificación consistió en un paso inicial de desnaturalización por 5 minutos a

94°C, seguido por 35 ciclos, cada uno de 1 minuto de desnaturalización a 94°C, 1 minuto de hibridación a 55°C y 3 minutos de extensión a 72°C, finalizando con un paso de extensión de 7 minutos a 72°C. La amplificación se verificó por electroforesis en gel de 0.8% de agarosa, utilizando como revelador el intercalante de ADN Gel Red (Biotium, California, USA). Los fragmentos de ADN obtenidos por PCR, fueron purificados y secuenciados por MacroGen Inc. (Seoul, Korea). Al igual que en el caso de levaduras, las secuencias obtenidas se compararon aplicando el algoritmo BLAST con secuencias preexistentes en la base de datos GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). En todos los casos, el criterio utilizado para la asignación taxonómica a nivel de especie fue una homología de secuencias entre la secuencia del aislamiento y la secuencia de la cepa tipo depositada en el GenBank mayor al 98.7 % (Yarza et al., 2014)

IV.3.4. Identificación de *Lactobacillus* spp.

La identificación molecular se complementó mediante análisis de la región que codifica para la subunidad alfa de la fenilalanil-tRNA sintetasa (*pheS*) y comparación con secuencias de cepas tipo depositadas en el GenBank. La extracción de ADN se realizó como se explicó anteriormente en la sección IV.3.3 (*Identificación de bacterias*). La amplificación de las secuencias se realizó según Naser et al. (2005) con modificaciones. Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador MultiGene Mini Personal TC020-24 (Labnet International Inc., USA) en un volumen de 25 µL conteniendo 2,5 µL de buffer 10X, 0,5 µL de solución de dNTPs (10 mM), 0,5 µL de primer *pheS*-21-F (25 µM) (Naser et al., 2005), 0,5 µL de primer *pheS*-22-R (25 µM) (Naser et al., 2005), 19,9 µL de agua MiliQ estéril, 0,1 µL de la enzima Taq (2.5 U/µL) (Fermentas, Thermo Fisher Scientific, USA) y 1 µL del sobrenadante de la lisis. El ciclo de amplificación consistió en un paso inicial de desnaturalización por 5 minutos a 95°C, seguido por 35 ciclos, cada uno de 35 segundos de desnaturalización a 95°C, 1 minuto 15 segundos de hibridación a 50°C y 1 minuto 15 segundos de extensión a 72°C, finalizando con un paso de extensión de 7 minutos a 72°C. La amplificación se verificó por electroforesis en gel de 0.8% de agarosa, utilizando como revelador el intercalante de ADN Gel Red (Biotium, California, USA). Los fragmentos de ADN obtenidos por PCR, fueron purificados y secuenciados por MacroGen Inc. (Seoul, Korea) a partir del primer *pheS*-21-F. Una vez obtenidas las secuencias, las mismas se analizaron por comparación en base de datos del GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), aplicando el algoritmo BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

IV.3.5. Análisis filogenético

El análisis filogenético de las secuencias D1/D2 para levaduras y las secuencias del ARN ribosomal 16S y del gen *pheS* para bacterias se realizó utilizando el programa MEGA 11 (Tamura et al.,

2021). Las secuencias de ADN se alinearon con secuencias de regiones homólogas de cepas tipo que se obtuvieron por comparación con la base de datos del Gen Bank. En todos los casos, las distancias evolutivas se calcularon utilizando el método Jukes-Cantor y los árboles filogenéticos se obtuvieron por neighbor-joining. La estabilidad de los clados se evaluó con 1000 repeticiones de Bootstrap.

IV.3.6. Pruebas fenotípicas para identificación de bacterias

Para los aislamientos bacterianos que no pudieron ser identificados molecularmente se realizaron pruebas fenotípicas que se describen a continuación.

IV.3.6.1. Diferenciación de *Lactobacillus nagelii* y *Lactobacillus ghanensis*

Para la identificación de aislamientos como *L. nagelii* o *L. ghanensis* se evaluó el crecimiento en caldo MRS con 6,5% de NaCl (Nielsen et al., 2007). Se inoculó el caldo con 10 µL de una suspensión del aislamiento en estudio cuya turbidez era equivalente al tubo 1 de la escala de Mc Farland y se incubó en anaerobiosis por 4 días a 30 °C. En paralelo se realizó un control inoculando el aislamiento en estudio en el caldo MRS sin NaCl. Los ensayos se realizaron por duplicado. El crecimiento fue evidenciado cualitativamente mediante visualización de turbidez y cuantitativamente a través de la medida de absorbancia en un espectrofotómetro (Jenway 6700, Cole-Parmer, UK) a una $\lambda=600$ nm y comparación con el valor de absorbancia del control.

IV.3.6.2. Identificación de especies del género *Gluconacetobacter* spp.

Para determinar si un aislamiento del género *Gluconacetobacter* pertenecía a algunas de las siguientes especies: *G. liquefaciens*; *G. dulcium*; *G. sacchari*; *G. takamatsuzukensis* o *G. tumulicola* fue necesario realizar varias pruebas fenotípicas que se detallan a continuación (Sombolostani et al., 2021):

- i) Crecimiento a 37 °C en el medio LMG Agar (Anexo 2). De forma paralela se realizó un control el cual se incubó a 28 °C en el mismo medio. La incubación fue por 4 días.
- ii) Crecimiento con 1% NaCl. Se utilizó el medio SM (Anexo 2), se realizó de forma paralela un control de crecimiento en el mismo medio sin adición de NaCl. Los viales se incubaron a 28 °C por 4 días.
- iii) Crecimiento con 10% EtOH. Se utilizó el medio SM (Anexo 2), se realizó de forma paralela un control de crecimiento en el mismo medio sin adición de EtOH. Los viales se incubaron a 28 °C por 4 días.

En i) el medio de sembró mediante estrías, mientras que en ii) y iii) se inoculó el medio de cultivo con 10 µL de una suspensión del microorganismo en estudio cuya turbidez era equivalente al tubo

1 de la escala de Mc Farland. Los ensayos se realizaron por duplicado. El crecimiento en i) fue evidenciado por observación visual mientras que en ii) y iii) también se determinó absorbancia en cada tratamiento en un espectrofotómetro (Jenway 6700, Cole-Parmer, UK) a una $\lambda=600$ nm y se comparó con el valor de absorbancia del control.

IV.3.7. Ensayos de Biocontrol con Kefir de agua

Los gránulos de kefir de agua (CMUNLP1) fueron donados por la Cátedra de Microbiología, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad de La Plata (La Palta, Argentina). Estos gránulos se incorporaron al 10 % m/v en una solución azucarada al 4,5 % la cual se preparó disolviendo azúcar mascabo (Terra verde, Brasil) en agua destilada. La mezcla se incubó a 28 °C por 24 horas. Para la obtención la solución de kefir de agua (KA) se retiraron los gránulos reteniéndolos por filtración mediante un tamiz de plástico. El KA se centrifugó a 3500 g por 15 minutos y el sobrenadante se filtró mediante filtro de membrana de 0,45 μ m para obtener la solución de kefir de agua estéril (KAS).

IV.3.7.1. Tratamiento del sorgo y ensilado

Los granos de sorgo de alto tanino (*Sorghum bicolor*) se molieron en una licuadora (Philips Hr2109) a máxima velocidad por 30 segundos, se esterilizaron por autoclave (121 °C, 15 minutos) y luego se secaron a 60 °C hasta peso constante. El sorgo seco y estéril fue tratado en proporción 1:1 (m/v) con agua (control), KA o KAS y homogeneizado con una espátula estéril para obtener las mezclas: control (sorgo y agua), **Tratamiento 1** (sorgo y KA) y **Tratamiento 2** (sorgo y KAS). Las mezclas se secaron a 60 °C hasta alcanzar una humedad de 30%. Posteriormente se tomaron 50 g de cada mezcla y se inocularon con 1 mL de una suspensión de esporas de *A. flavus* PJA de concentración 5×10^5 esporas/mL, la cual se determinó mediante conteo en cámara de Neubauer. Los mini-silos de sorgo se prepararon como se menciona en el *Capítulo III (III.3.4. Diseño de mini-silos experimentales de grano húmedo de sorgo)*, compactando las diferentes mezclas inoculadas en dichos tubos. Los mini-silos se incubaron por 7 días a 25°C. Se prepararon mini-silos adicionales para el análisis del tratamiento 1 (T1) antes de la incubación. Todos los tratamientos se realizaron por duplicado. Los mini-silos con el tratamiento 1 se llamaron mini-silos T1, mientras que los mini-silos con el tratamiento 2 se llamaron mini-silos T2.

IV.3.7.2. Análisis de los mini-silos

Al finalizar la incubación se midió el pH y se cuantificó la biomasa de *A. flavus* en cada mini silo. Para los mini-silos T1 se realizaron análisis adicionales antes y después de la incubación.

El contenido de cada mini-silo se colocó en una bolsa estéril conteniendo 180 mL de agua destilada estéril y la suspensión se homogeneizó por 1 minuto (Stomacher 400, Seward, UK). El pH de cada homogenato se determinó mediante un pHmetro (HANNA HI1131). El ADN total fue extraído de todos los homogenatos. Se tomaron 2 mL de cada suspensión y se centrifugaron 1 min a 10000 rpm. Los pellets obtenidos se reconstituyeron en 750 µL de buffer de lisis, solución perteneciente al kit de extracción Quick-DNA Fungal/Bacterial Miniprep (Zymo Research, USA), y mediante este kit se realizó la extracción de ADN de todos los pellets. La cantidad de ADN de *A. flavus* de cada muestra se cuantificó mediante el método de qPCR desarrollado en el *Capítulo III (III.3.3 Puesta a punto de una metodología de PCR en tiempo real para cuantificar ADN de A. flavus en sorgo)*. Todas las cuantificaciones se realizaron en las muestras diluidas al décimo para eliminar el efecto matriz y todas las determinaciones se realizaron por duplicado.

Se utilizaron alícuotas de las soluciones de ADN total obtenido de los mini-silos T1 (realizados en el tiempo inicial y después de 7 días de incubación) para caracterizar a la comunidad microbiana utilizando un enfoque de metabarcoding como se describe más adelante. La concentración de levaduras y bacterias ácido lácticas y acéticas en los mini-silos preparados en T1 se determinó antes y después de la incubación. El análisis microbiológico se realizó por recuento en placa, sembrando 0,1 mL de las diluciones seriadas al décimo -3, -4, -5 en medio PDA con cloranfenicol 0.017 % y -4, -5, -6 y -7 en medio MRS con 0,04 % de cicloheximida respectivamente. Las placas se incubaron por 4 días a 28 °C en condiciones de aerobiosis y anaerobiosis. Se aislaron todas las colonias de levaduras y bacterias que presentaron una morfología diferente tanto en la incubación en aire como en anaerobiosis y se identificaron a nivel de especie como se describe IV.3.2, IV.3.3, IV.3.4, IV.3.6. Las bacterias aisladas se conservaron en caldo MRS con 20 % de glicerol a -70 °C, mientras que las levaduras se conservaron en tubos de PDA inclinado a 4°C.

El análisis filogenético se realizó como se describe en IV.3.5.

Los resultados de los recuentos se analizaron utilizando el software INFOSTAT (Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina, 2009), mediante ANOVA y las diferencias significativas entre las medias se determinó mediante el test LSD con un nivel de significancia de 0,05. Los resultados de control biológico se analizaron utilizando el software SPSS (IBM Corp. Released 2017. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 25.0. Armonk, NY: IBM Corp.) y las diferencias significativas entre los tratamientos y el control se determinaron mediante el test de Dunnett con un nivel de significancia de 0,05.

IV.3.7.3. Caracterización de la microbiota fúngica y bacteriana utilizando metabarcoding y

secuenciación masiva

La caracterización de la microbiota de los mini-silos T1 antes y después de la incubación se realizó mediante metabarcoding y secuenciación masiva. El ADN genómico se extrajo directamente de la muestra de mini-silo utilizando el mismo kit de extracción descrito anteriormente (IV.3.7.2 *Análisis de los mini-silos*). El ADN total de cada muestra se cuantificó en un espectrofotómetro ($\lambda = 260$ nm) (Nanodrop; Thermo Fisher Scientific Inc.) y la concentración de ADN se ajustó a 5,0 ng / μ l. A partir de este ADN se realizó la secuenciación masiva de bacterias y hongos en el laboratorio de ARS-USDA. La región ITS 2 del ARNr fúngico se amplificó con los primers universales ITS3 / KYO2 e ITS4 (Toju et al., 2012). La región V4 del ARNr 16S bacteriano se amplificó utilizando los cebadores universales 515F y 806R (Lundberg et al., 2013). Se incorporaron un par de péptido-ácidos-nucleicos (PNA) en la amplificación por PCR para reducir la generación de amplicones mitocondriales y de cloroplasto no diana. Todos los primers se modificaron para incluir adaptadores Illumina (www.illumina.com). Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen total de 25 μ l que contenía 12,5 μ l de KAPA HiFi HotStart ReadyMix (Kapa Biosystems, Wilmington, EE. UU.), 1,0 μ l de cada primer (10 μ M), 2,5 μ l de ADN molde y 8,0 μ l de agua libre de nucleasas. Las amplificaciones se llevaron a cabo en un T100 thermal cycler (Bio-Rad) con un calentamiento inicial por 3 min a 98°C, seguido por 30 ciclos de 30 s a 95°C, 30 s a 50°C y 30 s a 72°C, y una extensión final de 1 min a 72°C. Los controles negativos se realizaron utilizando agua libre de nucleasas (QIAGEN, Valencia, CA, EE. UU.) en lugar de ADN molde. Todos los amplicones y mezclas de amplificación, incluidos los controles negativos, se secuenciaron en una plataforma MiSeq utilizando el kit V2 (Illumina, San Diego, CA EE. UU.)

IV.3.7.4. Análisis de las secuencias obtenidas mediante secuenciación masiva

Se obtuvieron lecturas pareadas (paired-end) utilizando el software PEAR 0.9.6 (Paired-end read merger) (J. Zhang et al., 2014) y se obtuvieron los parámetros predeterminados. La eliminación de la secuencia de cebadores y la selección por calidad ($Q > 20$) se realizó utilizando CLC genomics workbench V8 (Qiagen). Las secuencias que no contenían alguno de los primers fueron descartadas y las quimeras fueron identificadas y removidas usando VSEARCH 1.4.0 (Rognes et al., 2015). Se utilizó el paquete del algoritmo UCLUST (Edgar, 2010) del software QIIME 1.9.1 (Caporaso et al., 2010) para agrupar a las secuencias con una similitud mayor al 97%, los reads correspondientes a la secuencia ITS 2 se compararon con la base de datos dinámica UNITE publicada el 31.01.2016 (Abarenkov et al., 2010) y los reads correspondientes al ARNr 16S se compararon con la base de datos Greengenes. Se eliminaron los “singletons” y las secuencias que no se agruparon en la base de datos se agruparon *de novo* utilizando el mismo algoritmo. Las

secuencias más abundantes en cada OTU (del inglés: Operational taxonomic unit) se seleccionaron como secuencias representativas y se utilizaron para la asignación taxonómica utilizando el algoritmo BLAST (Altschul et al., 1990) implementado en QIIME 1.9.1. La tabla OTU se normalizó por rarefacción a una profundidad de secuenciación uniforme para eliminar la heterogeneidad de la muestra. La tabla OTU enrarecida se utilizó para calcular los índices de diversidad alfa, incluidos los índices de Chao1 y Shannon, utilizando el programa PAST (Ryan et al., 2001). Se generó un árbol filogenético utilizando el programa MEGA 7 con las OTU correspondientes a las especies de *Lactobacillus* y las secuencias de las cepas tipo que se obtuvieron por comparación de las OTU con la base de datos de GenBank. Se utilizó el método de Neighbor-Joining y se calcularon las distancias evolutivas mediante el método de Jukes-Cantor. La estabilidad de los clados se evaluó con 1000 repeticiones de bootstrap.

IV.3.8. Ensayos de control biológico en mini-silos a partir de inóculos seleccionados

Para realizar los mini-silos se inocularon 40 g de sorgo seco y estéril (secado y esterilizado como en sección IV.3.7.1) con 14,5 mL de agua estéril en el caso de los mini-silos control, mientras que para los mini-silos tratamiento se inocularon 14,5 mL de mezcla de agua estéril y suspensión de inóculo. Los mini-silos control y tratamientos se inocularon finalmente con 1 mL de una suspensión de esporas de *A. flavus* PJA de concentración 4×10^5 esporas/mL, la cual se determinó mediante conteo en cámara de Neubauer. El sorgo una vez hidratado e inoculado se homogeneizó con una espátula estéril de forma de obtener una mezcla homogénea.

Una vez obtenidas las mezclas se prepararon los mini-silos. Este procedimiento se realizó como se menciona en el Capítulo I (III.3.4. Diseño de mini-silos experimentales de grano húmedo de sorgo), compactando las diferentes mezclas inoculadas en dichos tubos. Los mini-silos se incubaron por 7 días a 25°C. Todos los tratamientos se realizaron por duplicado, a excepción de los tratamientos 12 y 13 los cuales se realizaron por triplicado. En todos los casos las condiciones de los mini-silos fueron de 30% de humedad e incubación a 25 °C. Estas condiciones se utilizaron ya que en las mismas se obtuvo la óptima producción de AFB1 en los mini-silos (Capítulo I).

Los inóculos de bacterias se prepararon con diferentes concentraciones ajustadas mediante la escala Mc Farland o diluciones de las mismas. En todos los casos se realizaron recuentos de las suspensiones en medio de cultivo MRS (Oxoid Ltd, Inglaterra), incubando las placas a 28 °C por 72 horas en condiciones anaerobias o aerobias según correspondiera, para verificar la concentración de los inóculos. Las suspensiones de levaduras se ajustaron a la concentración deseada por conteo en cámara de Neubauer. Como en el caso anterior se realizaron recuentos en medio PDA (Oxoid Ltd, Inglaterra) incubando las placas a 28 °C por 48 horas en condiciones aerobias para verificar la concentración de los inóculos. Los ensayos realizados se definen a continuación.

IV.3.8.1 Tratamiento con los aislamientos de *Lactobacillus* sp. de silobolsas.

Los inóculos utilizados fueron los diferentes *Lactobacillus* sp. aislados de silobolsa de grano húmedo de sorgo. Se realizaron mini-silos tratamiento con inóculos *L. paracasei* B, *L. plantarum* Da, *L. brevis* C. Se realizó un inóculo para cada *Lactobacillus* y los mismos se inocularon en una concentración de 2×10^4 células/g de sorgo.

IV.3.8.2 Tratamiento con los aislamientos del kefir de agua.

Tratamiento 3. El inóculo fue con una concentración de *Saccharomyces cerevisiae* SC1 1.0×10^6 ufc/g.

Tratamiento 4. El inóculo fue con una concentración de *Pichia membranifaciens* PM1 de 1.0×10^5 ufc/g

Tratamiento 5. Se utilizó un inóculo compuesto por las levaduras de *S. cerevisiae* SC1 y *P. membranifaciens* PM1 en una concentración 1.0×10^6 ufc/g y 1.0×10^5 ufc/g de sorgo respectivamente

Tratamiento 6. Se utilizó un inóculo compuesto por *L. ghanensis* E1 y *L. paracasei* ANRB1. Los microorganismos se inocularon en concentraciones de 6.8×10^7 ufc/g y 3×10^7 ufc/g de sorgo respectivamente.

Tratamiento 7. Se utilizó un inóculo compuesto por *L. ghanensis* E1, *L. paracasei* ANRB1, *Gluconacetobacter dulcium* AR2C1. Los microorganismos se inocularon en concentraciones de 6.8×10^7 ufc/g, 3×10^7 ufc/g y 1×10^5 ufc/g de sorgo respectivamente.

Tratamiento 8. Se utilizó un inóculo compuesto por *L. ghanensis* E1, *L. paracasei* ANRB1, *S. cerevisiae* SC1. Los microorganismos se inocularon en concentraciones de 6.8×10^7 ufc/g, 3×10^7 ufc/g y 1.02×10^6 ufc/g de sorgo respectivamente.

Tratamiento 9. Se utilizó un inóculo compuesto por *L. ghanensis* E1, *L. paracasei* ANRB1, *S. cerevisiae* SC1, *P. membranifaciens* PM1. Los microorganismos se inocularon en concentraciones de 6.8×10^7 ufc/g, 3×10^7 ufc/g, 1.0×10^6 ufc/g y 1.0×10^5 ufc/g de sorgo respectivamente.

Tratamiento 10. Se utilizó un inóculo compuesto por *L. ghanensis* E1, *L. paracasei* ANRB1, *G. dulcium* AR2C1 y *S. cerevisiae* SC1. Los microorganismos se inocularon en concentraciones de 6.8×10^7 ufc/g, 3×10^7 ufc/g, 1.0×10^6 ufc/g y 1.0×10^5 ufc/g de sorgo respectivamente.

Tratamiento 11. Se utilizó un inóculo compuesto por todos los microorganismos presentes en el pellet de 40 mL de KA (relación 1:1 m/v con el sorgo a inocular). El primer paso para la obtención de este inóculo fue obtener el KA. Para ello se fermentó una solución azucarada al 4,5 %, la cual se preparó disolviendo azúcar mascabo (Terra verde, Brasil) en agua destilada y agregando 10 % m/v de gránulos de kefir de agua (CMUNLP1). La solución con los gránulos se fermentó durante 24 horas a 28 °C de. Se centrifugaron 40 mL del producto obtenido por 10 minutos a 8000 g. El sobrenadante se filtró por membrana de 0,45 μ m y se descartó. Los microorganismos del KA

retenidos en la membrana fueron removidos con espátula estéril y junto al pellet obtenido previamente resuspendidos en 14,5 mL de agua destilada estéril.

Tratamiento 12. Se utilizó el inóculo compuesto por *L. ghanensis* E1, *L. paracasei* ANRB1, *G. dulcium* AR2C1, *S. cerevisiae* SC1, *P. membranifaciens* PM1. Los microorganismos se inocularon en concentraciones de 6.8×10^7 ufc/g, 3×10^7 ufc/g, 1.0×10^5 ufc/g 1.0×10^6 ufc/g y 1.0×10^5 ufc/g de sorgo respectivamente. Este inóculo mixto se ensayó suspendido en 14,5 mL de solución acuosa realizada a partir de la hidratación del KAS liofilizado. El KA se obtuvo como se menciona en el tratamiento 11. Se centrifugaron 40 mL de KA por 10 minutos a 8000 g. Posteriormente el sobrenadante se filtró por membrana de 0,45 μ m y por membrana de 0,22 μ m. De esta manera se obtuvo el KA estéril (KAS). El mismo se liofilizó por 48 horas en un liofilizador Gamma 1-16 LSC, CHRIST (Germany). El KA liofilizado se hidrató con las suspensiones del inóculo mixto más la cantidad de agua destilada estéril necesaria para alcanzar un volumen de 14,5 mL.

Tratamiento 13. Se utilizó el mismo inóculo que en el Tratamiento 12 pero el mismo se resuspendió en 14,5 mL de agua destilada estéril.

IV.3.8.3. Análisis de los mini-silos

Al finalizar la incubación se cuantificó la concentración de ADN de *A. flavus* PJA en cada mini-silo. El contenido de cada mini-silo se pesó, se pasó a tubos de mayor volumen y se guardó a -20 °C por 24 horas para su posterior liofilización. Luego de la liofilización las muestras se pesaron y se molieron para obtener una muestra homogénea. Se colocó todo el contenido del mini-silo liofilizado y molido y se suspendió en 90 mL de agua destilada estéril, la cual se homogeneizó 1 minuto en un mezclador (Stomacher 400, Seward, UK). El pH de cada homogenato se determinó mediante un pHmetro (HANNA HI1131). Posteriormente, de la suspensión se tomaron 2 mL y se centrifugaron durante 1 minuto a 10000 rpm. El pellet obtenido se resuspendió en el buffer de lisis perteneciente al kit de extracción Quick-DNA Fungal/Bacterial Miniprep (Zymo Research, USA) el cual se utilizó para realizar las extracciones de ADN. El ADN de *A. flavus* PJA se cuantificó mediante el método de PCR en tiempo real optimizado para sorgo y descrito en el *Capítulo I (III.3.3. Puesta a punto de una metodología de PCR en tiempo real para cuantificar ADN de A. flavus en sorgo)* con la adición de un tercer paso de 5 segundos a 82 °C para adquirir la fluorescencia de forma de eliminar fluorescencia inespecífica que sobreestima la concentración de ADN de *A. flavus* en los tratamientos.

Todas las cuantificaciones se realizaron en las muestras diluidas al décimo para eliminar el efecto matriz y todas las determinaciones se realizaron por duplicado. Los resultados se expresaron como porcentaje de crecimiento, los cuales fueron calculados como la concentración de ng de ADN por gramo de sorgo cuantificado en el tratamiento sobre la concentración de ng de ADN por

gramo de sorgo cuantificada en el control por cien. El análisis de los datos se realizó utilizando el software SPSS (IBM Corp. Released 2017. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 25.0. Armonk, NY: IBM Corp.) y las diferencias significativas entre los tratamientos y el control se determinaron mediante el test de Dunnett con un nivel de significancia de 0,05.

IV.3.9. Evaluación del crecimiento de diferentes inóculos en mini-silos de grano húmedo de sorgo

Se realizaron mini-silos para recuentos inoculando 40 g de sorgo seco y estéril con 15,5 mL de la mezcla de agua estéril e inóculo. El sorgo una vez hidratado e inoculado se homogeneizó con una espátula estéril de forma de obtener una mezcla homogénea. Se realizaron mini-silos recuento para los inóculos *L. paracasei* B, *L. plantarum* Da, *L. brevis* C. También se realizaron mini-silos recuento para inóculos compuestos por aislamientos del KA como los inóculos de los tratamientos 7 (*L. ghanensis* E1, *L. paracasei* ANRB1, *G. dulcium* AR2C1) y 9 (*L. ghanensis* E1, *L. paracasei* ANRB1, *S. cerevisiae* SC1, *P. membranifaciens* PM1). Los inóculos, las concentraciones y las condiciones de incubación para los mini-silos recuento fueron las mismas que las utilizadas en los ensayos de biocontrol. Los mini-silos se realizaron por duplicado

IV.3.9.1. Análisis de los mini-silos

Para realizar el recuento de los microorganismos inoculados en los mini-silos después de la incubación se procedió a colocar el contenido de cada mini-silo en una bolsa estéril conteniendo 180 mL de agua destilada estéril. Las suspensiones se homogeneizaron por 1 minuto (Stomacher 400, Seward, UK). El pH de cada homogenato se determinó mediante un pHmetro (HANNA HI1131). De estas suspensiones se realizaron diluciones seriadas al décimo en suero fisiológico, las cuales fueron sembradas por recuento en superficie en medio MRS (Oxoid Ltd, Inglaterra) para el recuento de *L. ghanensis* E1, *L. paracasei* ANRB1, *G. dulcium* AR2C1. Las placas se incubaron por 72 horas a 28 °C en anaerobiosis para las especies de *Lactobacillus* y en aire para el recuento de *G. dulcium* AR2C1. La anaerobiosis fue generada utilizando sobres de anaerobiosis AnaeroGen™ 2,5 L (Thermo Scientific™, USA).

Para el recuento de *S. cerevisiae* SC1 y *P. membranifaciens* PM1 se sembraron diluciones al décimo de las suspensiones de los mini-silos en medio PDA (Oxoid Ltd, Inglaterra). Las placas se incubaron por 24 horas a 28 °C en condiciones de aerobiosis.

Los resultados de los recuentos se analizaron utilizando el software INFOSTAT (Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina, 2009), mediante ANOVA y las diferencias significativas entre las medias se determinó mediante el test LSD con un nivel de significancia de 0,05.

IV.3.10. Estudio de la capacidad de crecimiento a partir de lactato como fuente de carbono

El ensayo se realizó en viales con 5 mL de caldo el caldo Yeast Nitrogen Base (YNB, Difco, USA), al cual se le adicionó 0.1% de glucosa o lactato como fuente de carbono. El medio YNB sin fuente de carbono, con glucosa o con lactato se ajustó a pH 6 y se inoculó con 100 μ L de una suspensión Mc Farland 1 de los diferentes aislamientos de levaduras obtenidos. Los aislamientos estudiados fueron PM1, PM2, SC1, SC2, Lev1, Lev2, Lev3, Lev4, Lev5. Los medios inoculados se incubaron a 28 °C por 6 días con una agitación de 150 rpm.

El crecimiento en todos los casos fue evidenciado cualitativamente mediante visualización de turbidez y cuantitativamente a través de la medida de absorbancia en un espectrofotómetro (Jenway 6700, Cole-Parmer, UK) a una $\lambda=600$ nm y comparación con el valor de absorbancia del control sin fuente de carbono y con glucosa.

IV.4 RESULTADOS

IV.4.1. Aislamiento y caracterización de bacterias lácticas y levaduras de silobolsas de grano húmedo de sorgo.

Las muestras tomadas al pinchar la bolsa en el punto medio de los silos presentaron un recuento de bacterias ácido lácticas (BAL) de $3,2 \times 10^7$ ufc/g y $1,4 \times 10^7$ ufc/g, mientras que los recuentos obtenidos para las muestras tomadas de la cara frontal del silo fueron $< 1,4 \times 10^4$ ufc/g. En todos los casos se obtuvo un recuento de levaduras de entre $6,0 \times 10^8$ ufc/g y $8,0 \times 10^8$ ufc/g.

Se aislaron tres colonias de bacterias y 5 colonias de levaduras con diferente aspecto macroscópico. Tres levaduras, Lev1, Lev2 y Lev3, provinieron del centro del silo, mientras que las restantes (Lev4 y Lev5) fueron obtenidas de la cara frontal. Las bacterias (nombradas B, C, Da) correspondieron en todos los casos a bastones Gram positivos, catalasa negativos.

Los aislamientos bacterianos fueron capaces de crecer en los mini-silos de sorgo, en las condiciones de estudio. Luego de 7 días de incubación a 25 °C se verificó un aumento significativo de la carga bacteriana (más de 4 órdenes) con respecto al inóculo inicial (2×10^4 ufc/g), el cual fue fijado de acuerdo con la concentración de uso sugerida en varios inóculos comerciales (Figura IV.4.1).

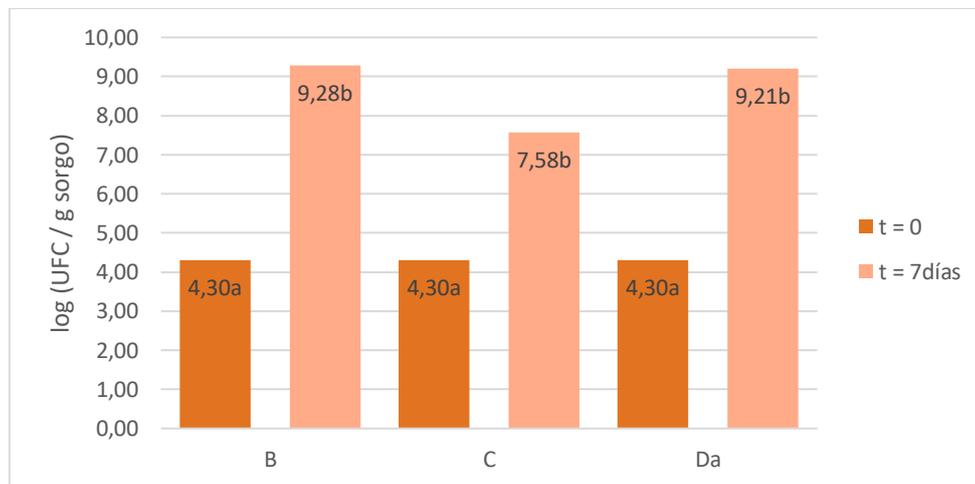


Figura IV.4.1. Recuentos a tiempo 0 y a los 7 días de incubación de los mini-silos inoculados con los aislamientos B, Da, C. Los valores con diferentes letras son significativamente diferentes, calculados por el Test LSD Fisher ($\alpha = 0.05$).

IV.4.2. Biocontrol de *A. flavus* en mini-silos de sorgo con bacterias lácticas aisladas de silobolsa

Ninguno de los aislamientos bacterianos obtenidos de silobolsa de grano húmedo de sorgo logró controlar el crecimiento de *A. flavus* en el sistema de mini-silos (Figura IV.4.2). En ninguno de los casos el crecimiento de *A. flavus* en presencia de los inóculos bacterianos tuvo diferencias significativas con el control, aunque la cepa C lograra disminuir a casi la mitad la biomasa de *A. flavus* en el sistema. Los valores de pH del sorgo fueron 5 para el control y 4,5; 5 y 4,5 para los mini-silos tratados con los aislamientos B, C y Da respectivamente.

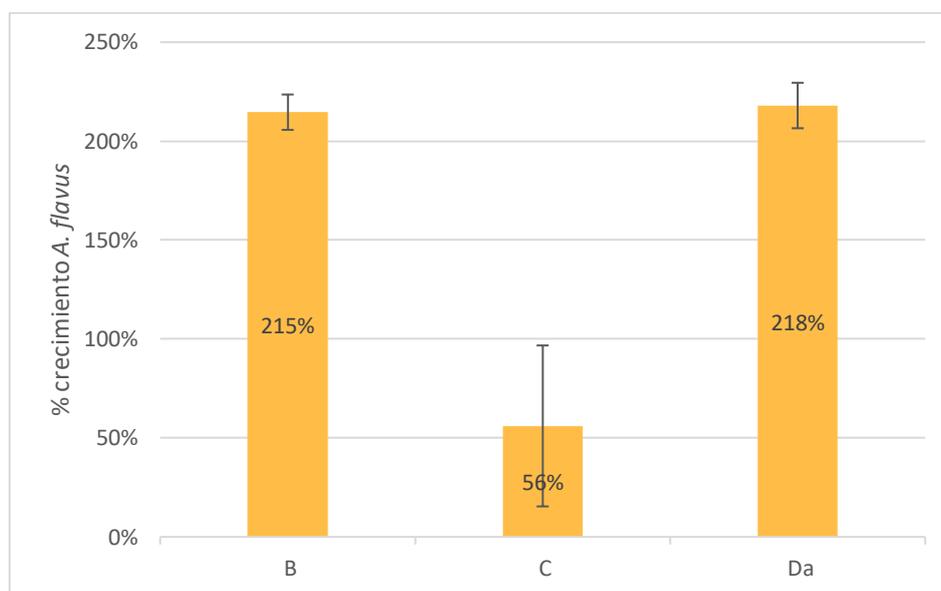


Figura IV.4.2. % de crecimiento de *A. flavus* tratado con los aislamientos B, C y Da con respecto al control. En ninguno de los casos se observaron diferencias significativas respecto al control según el test de Dunnett con un 95% de confianza. Las barras de error representan el desvío estándar.

IV.4.3. Biocontrol de *A. flavus* en minisilos de sorgo con kefir de agua

En los mini-silos T1 (Tratamiento 1: tratados con kefir de agua-KA) se observó una inhibición significativa del crecimiento de *A. flavus*, reduciendo el mismo al 1% con respecto al control (Figura IV.4.3). En cambio, en los mini-silos T2 (Tratamiento 2: tratados con kefir de agua estéril-KAS) se observó un aumento significativo en el crecimiento de *A. flavus* (201%). Estos resultados concordaron con lo observado visualmente al abrir los mini-silos luego de la incubación. En el caso de los mini-silos control y T2 el crecimiento fúngico era evidente, mientras que no era apreciable en los mini-silos T1, tratados con el kefir de agua (Figura IV.4.4). Estos resultados mostraron que los microorganismos presentes en el kefir de agua utilizado estaban involucrados en la inhibición del crecimiento de *A. flavus*. A su vez, también se observó que los compuestos

presentes en el sobrenadante del kefir no fueron capaces por sí mismos de lograr la inhibición, sino que favorecieron el crecimiento del hongo en los mini-silos.

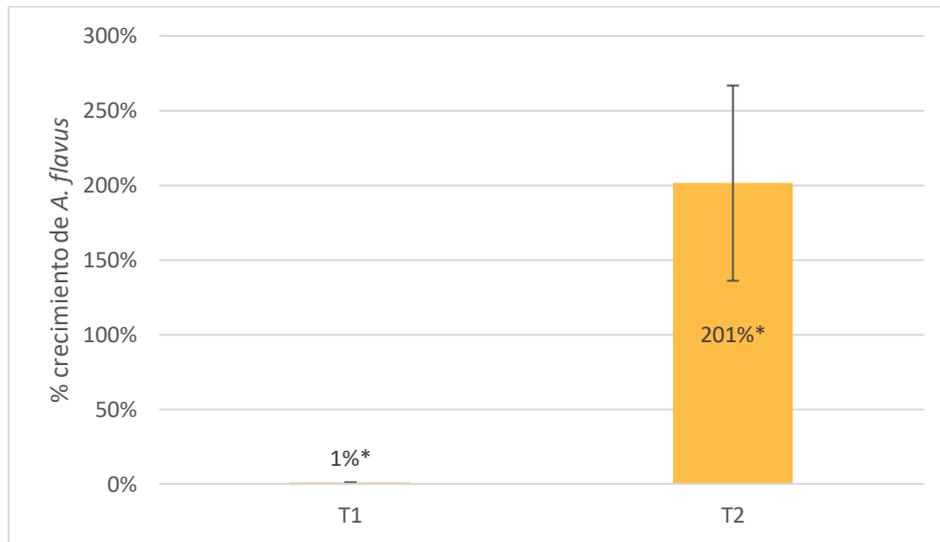


Figura IV.4.3. % de crecimiento de *A. flavus* en el tratamiento T1 y T2 con respecto al control. *Valores de concentración de *A. flavus* significativamente diferentes al control calculados mediante el test de Dunnett con un 95% de confianza. Las barras de error representan el desvío estándar.

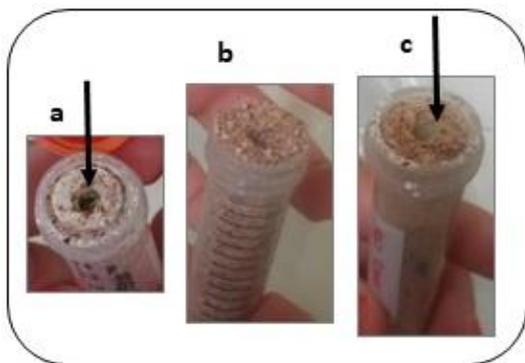


Figura IV.4.4. Mini-silos experimentales de grano húmedo de sorgo abiertos luego de 7 días de incubación a 25 °C. (a) Control (agua estéril); (b) T1 (KA); T2 (KAS). Las flechas indican el crecimiento de *A. flavus*.

IV.4.4. Análisis de la comunidad microbiana del KA.

La comunidad microbiana del KA se estudió en los mini-silos a tiempo 0, es decir antes de la incubación a 25 °C por 7 días y después de la incubación. Se obtuvo un total de 175.936 secuencias de la región V4 del gen 16S ARNr para los mini-silos T1 (tratamiento 1), 66.571 y 190.365 antes y después de la incubación respectivamente. A su vez, se obtuvieron 155.971 secuencias de la región ITS2 para la comunidad fúngica, 77.432 pre incubación y 78.539 post incubación.

El número de OTUs bacterianas obtenidas para los mini-silos T1, antes y después de la incubación fue 41 y 51 respectivamente, mientras que para las OTUs fúngicas fue de 21 y 13. Se calcularon para cada conjunto de datos los índices de Chao 1 y Shannon (Tabla IV.4.1). El estimador de la

riqueza, índice Chao 1, para la comunidad bacteriana fue de 42.7 y 52.5 antes y después de la incubación respectivamente; mientras que para la comunidad fúngica fue de 21.2 y 16.0. El índice de diversidad de Shannon fue prácticamente igual para antes y después de la incubación tanto en la comunidad bacteriana como en la fúngica. Los valores obtenidos evidencian que la comunidad fúngica es menos diversa que la comunidad bacteriana.

Tabla IV.4.1. Índices de diversidad Alpha (Chao1 y Shannon) para las comunidades bacterianas y fúngicas en los mini-silos T1, antes (A) y después (B) de la incubación.

	Muestra	Secuencias	OTUs	Chao1	Shannon
Bacteria	A	66571	41	42,7	1,681
	B	109365	51	52,5	1,613
Hongos	A	77432	21	21,2	0.1383
	B	78539	13	16,0	0.2657

Las curvas de rarefacción mostraron que la diversidad de la comunidad bacteriana y fúngica en ambas muestras estaba bien representada en los resultados obtenidos (Figura IV.4.5 y IV.4.6).

La mayoría de las OTUs bacterianas y fúngicas pudieron asignarse a nivel de género. La asignación taxonómica se realizó por comparación y alineamiento de secuencias homólogas obtenidas de base de datos.

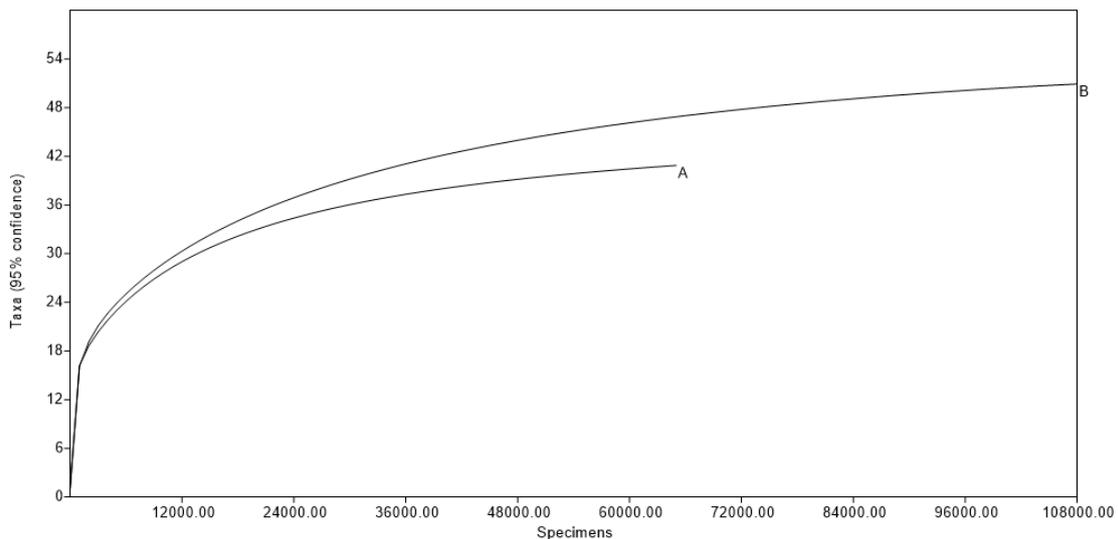


Figura IV.4.5. Curvas de rarefacción de la secuencia parcial del gen que codifica para el ARNr 16S de bacterias antes de la incubación (A) y después de la incubación (B).

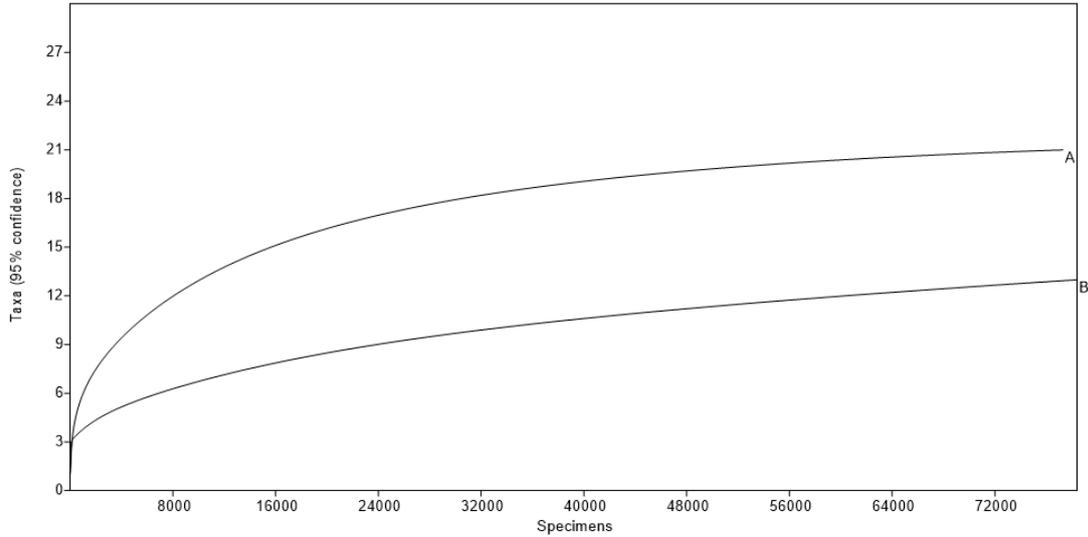


Figura IV.4.6 Curvas de rarefacción para la secuencia parcial de la región fúngica ITS2 antes (A) y después (B) de la incubación.

El filo fúngico predominante fue Ascomycota al cual pertenecieron más del 99% de las secuencias, siendo *Saccharomyces* y *Pichia* los géneros predominantes. *Saccharomyces* representó el 68% y el 56% de las secuencias de los mini-silos T1 antes y después de la incubación respectivamente, mientras que *Pichia* comprendió el 30% y 44% respectivamente (Figura IV.4.7).

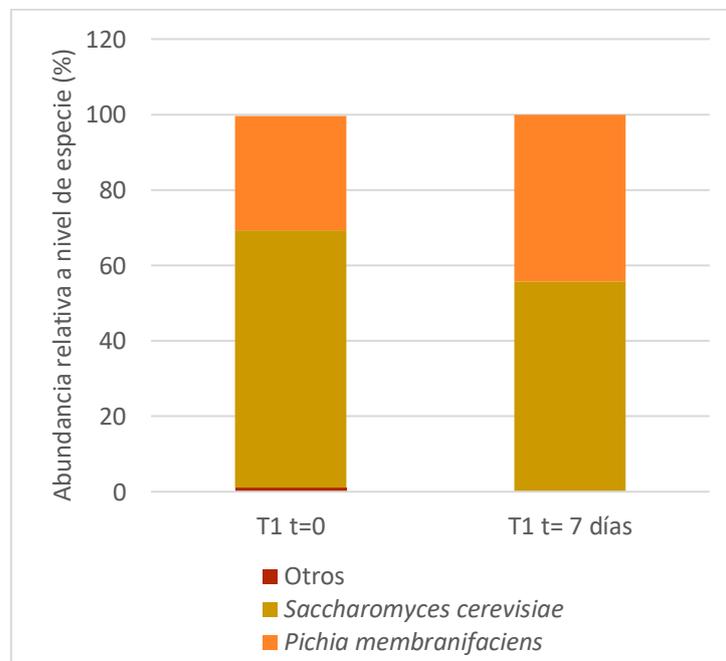


Figura IV.4.7. Abundancia relativa de la comunidad fúngica a nivel de especie.

En las muestras obtenidas antes de la incubación se encontraron también secuencias correspondientes a los géneros *Aspergillus*, *Dekkera*, *Candida*, *Malassezia*, *Mortierella*, *Rhodotorula*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Hypocrea* y *Bionectria*, las cuales representaron aproximadamente el 2% del total de las secuencias correspondientes antes de la incubación. Las secuencias correspondientes a estos géneros no se encontraron en las muestras obtenidas de los mini-silos T1 después de la incubación. Al comparar las secuencias asignadas al género *Aspergillus* con secuencias de cepas tipo en el GenBank, las secuencias más cercanas (99% de similitud) correspondieron a especies de *Aspergillus* de la Sección *Flavi*, la cual incluye a *A. flavus*.

La asignación taxonómica de las OTUs bacterianas mostró que tanto antes como después de la incubación los filos dominantes fueron Firmicutes y Proteobacteria (más de 99,9%) (Figura IV.4.8). Menos del 0,05% de las secuencias obtenidas antes de la incubación correspondieron a otros filos (Deinococcus-Thermus, Actinobacteria y Cyanobacteria). La abundancia de los filos predominantes antes de la incubación fue muy similar (49% para Firmicutes y 51% para Proteobacteria), mientras que después de la incubación las OTUs correspondientes al filo Firmicutes (61%) fueron más abundantes (Figura IV.4.8 b).

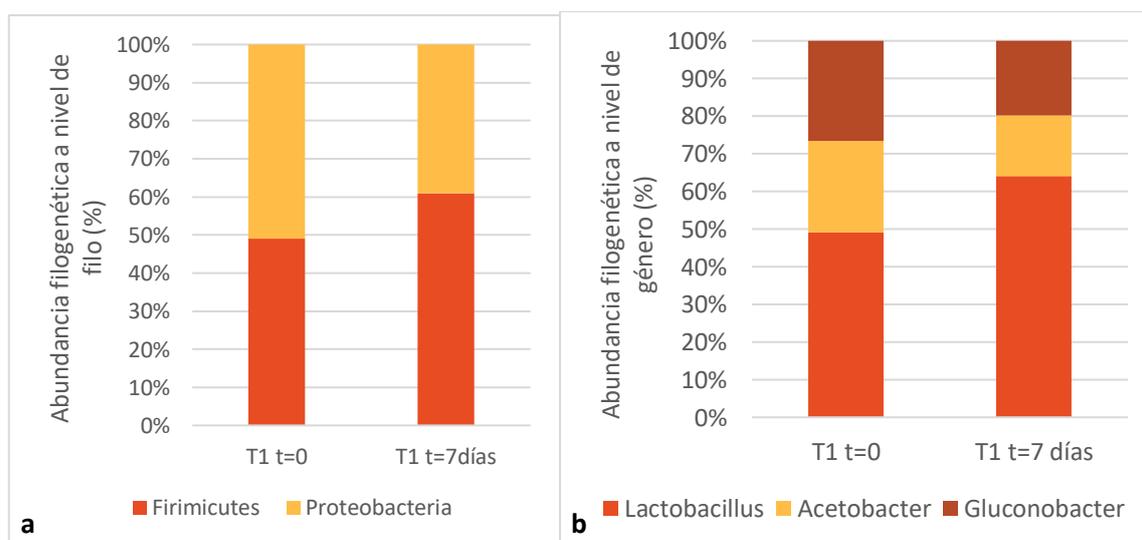


Figura IV.4.8. (a) Abundancia filogenética a nivel de filo para la comunidad bacteriana. (b) Abundancia filogenética a nivel de género para la comunidad bacteriana.

Alphaproteobacteria, representada por los géneros *Acetobacter* y *Gluconobacter*, fue la clase predominante dentro del filo Proteobacteria. Menos del 0,1% de las secuencias correspondieron a Beta y Gammaproteobacteria.

La mayoría de las secuencias asignadas al filo Firmicutes (más del 99%) correspondieron a la familia Lactobacillaceae. Sólo el 0,003% fueron asignadas a otras familias (Bacillaceae y Planococcaceae) y sólo se encontraron en las muestras pre-incubación. El género *Lactobacillus* fue

el predominante (más del 99%) dentro de los Firmicutes. Dieciséis OTUs correspondientes a este género fueron detectadas en ambas muestras. Se construyó un árbol filogenético incluyendo a las dieciséis secuencias de *Lactobacillus* junto con secuencias de cepas tipo de especies de *Lactobacillus* relacionadas, las cuales se obtuvieron por comparación de las secuencias de las OTUs en la base de datos del GenBank. En el árbol filogenético se evidencia que las OTUs se agrupan en diferentes clusters con secuencias de distintas especies de *Lactobacillus*. Por ejemplo, la OTU 18 se agrupa en el cluster del grupo *L. nagelii* y *L. satsumensi*, la OTU 9 se agrupa con la cepa tipo de *L. harbinensis*, mientras que la OTU 28 y la OTU 29 se ubican en el cluster del grupo *L. paracasei/L. casei* (Figura IV.4.9).

La frecuencia de las OTUs asignadas a *Lactobacillus* spp. fue variable en ambas muestras. En la figura IV.4.10 se observa el porcentaje de las secuencias, pre y post incubación, asignadas a las diferentes OTUs que pertenecen a las secuencias de *Lactobacillus*. La OTU 18 fue la secuencia predominante en ambas muestras (antes y después de la incubación), aumentando su proporción post-incubación. Pre-incubación la OTU 9 representó sólo el 1% de las secuencias de *Lactobacillus* en la muestra, en cambio su proporción aumentó a 7% después de la incubación. La proporción de la OTU 15 fue mayor (17%) antes de la incubación disminuyendo la misma después de la incubación (1%). En cambio, la abundancia de la OTU 29 fue prácticamente la misma antes y después de la incubación.

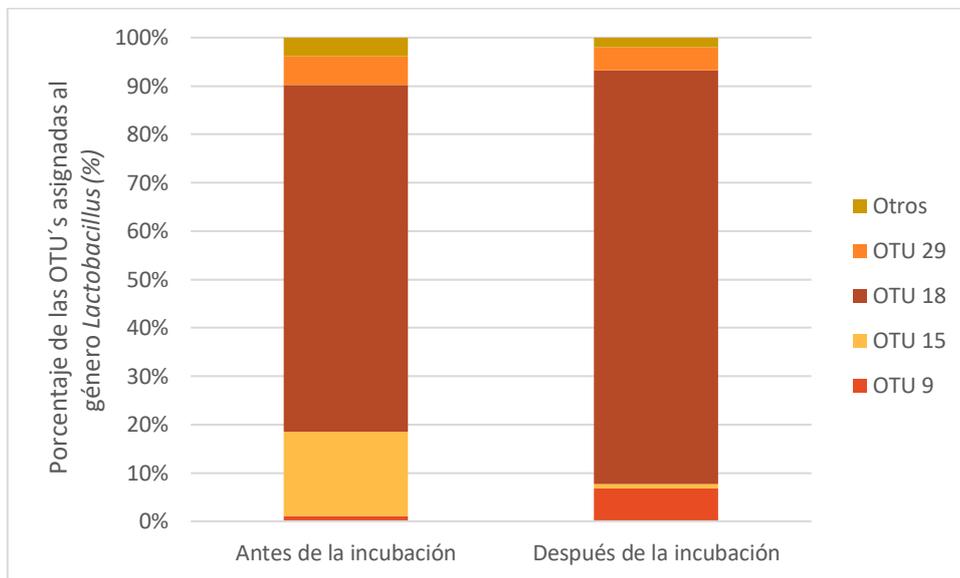


Figura IV.4.10. Porcentaje de secuencias asignadas a las diferentes OTUs en el total de las secuencias del género *Lactobacillus* obtenidas de los mini-silos T1 antes y después de la incubación.

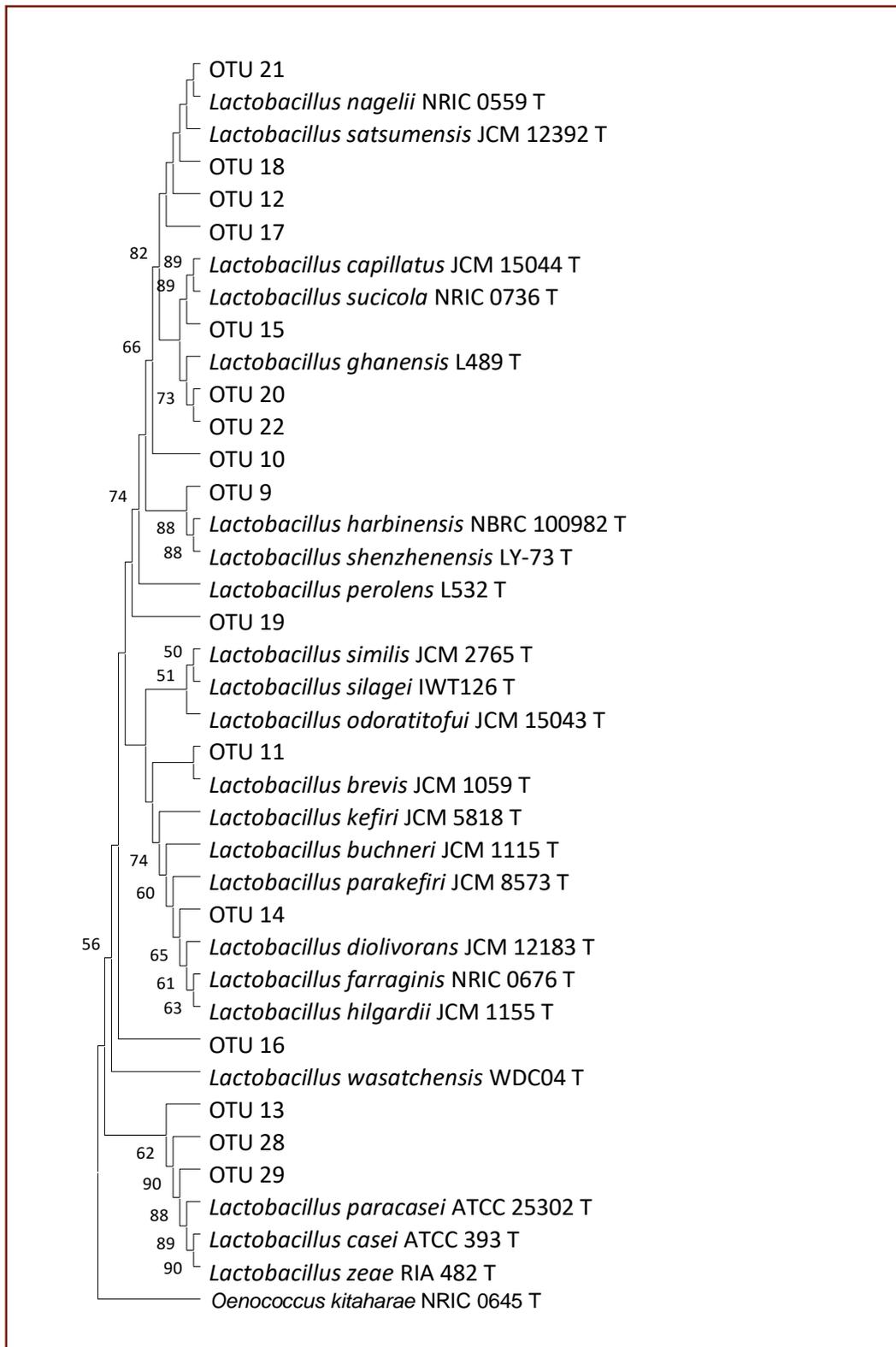


Figura IV.4.9. Árbol filogenético de las secuencias de OTUs del género *Lactobacillus*. El árbol se construyó utilizando el método de neighbor-joining. Los valores de Bootstrap (1000 iteraciones) están indicados en los nodos. T- significa cepa tipo.

IV.4.5. Análisis microbiológico de los mini-silos T1

La concentración de las bacterias ácido lácticas y acéticas y de levaduras obtenidas mediante cultivo aumentó significativamente en los mini-silos T1 incubados a 25 °C desde el día 0 al día 7. No se observaron diferencias significativas en los recuentos de bacterias y levaduras incubados en condiciones de aire y anaerobiosis (Figura IV.4.11 a y b).

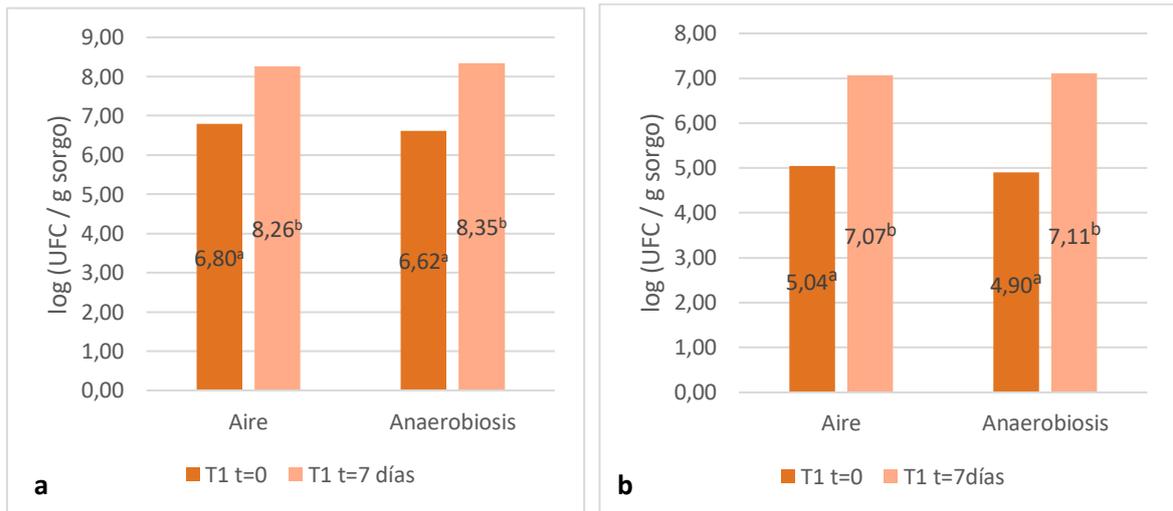


Figura IV.4.11. **a)** Recuento en placa de bacterias ácido-lácticas y acéticas por gramo de sorgo en condiciones aerobias y anaerobias. **b)** Recuento en placa de levaduras por gramo de sorgo en condiciones aerobias y anaerobias. Los valores con diferentes letras son significativamente diferentes, calculados por el Test LSD Fisher ($\alpha = 0.05$).

Tres colonias de bacterias con diferentes morfologías fueron aisladas de los mini-silos T1 antes (E1, ANRB1, AR2C1) y después (E2, ANRB2, AR2C2) de los 7 días de incubación. Cuatro de los aislamientos (E1, E2, ANRB1, ANRB2) correspondieron a bastones Gram positivos, catalasa negativa, observándose diferencias morfológicas macro y microscópica entre los aislamientos E1 y E2 con ANRB1 y ANRB2. Los otros dos aislamientos resultaron bastones Gram negativos. En el caso de las levaduras, antes de la incubación se obtuvieron dos aislamientos que presentaban claras diferencias macroscópicas y microscópicas (PM1, SC1) los cuales fueron recuperados después de la incubación (PM2, SC2). La proporción en la abundancia (número de colonias) de estos aislamientos fue 1:3 antes y después de la incubación.

IV.4.6. Identificación de bacterias ácido lácticas y levaduras provenientes de silobolsa y de kefir

IV.5.6.1. Identificación de bacterias lácticas

La identificación molecular de los aislamientos bacterianos realizada por análisis parcial del gen que codifica para el 16S ARNr mostró que todos los aislamientos de silobolsas correspondían al género *Lactobacillus*. El aislamiento C fue el único que pudo identificarse a nivel de especie ya que su secuencia presentó una homología mayor a 98,7% (99,83%) con la secuencia correspondiente a la cepa tipo de una única especie de *Lactobacillus*, *L. brevis*, siendo la segunda especie más cercana *L. yonginensis* con una homología del 96,93%.

Los aislamientos B y Da no se lograron identificar a nivel de especie mediante el análisis de la secuencia del 16S. En el análisis por BLAST se obtuvieron cinco y nueve secuencias de cepas tipo correspondiente a diferentes especies de *Lactobacillus* con una similitud mayor al 98,7% con las secuencias de B y Da respectivamente. En el árbol filogenético obtenido con las secuencias de las bacterias lácticas aisladas en esta tesis y las correspondientes a las cepas tipo de las especies más cercanas, se pueden ver los diferentes agrupamientos de los aislamientos con las cepas cuyas secuencias presentaron una homología mayor al 98,7% en BLAST (Figura IV.4.12.). Por lo mencionado anteriormente se necesitaron estudios complementarios para poder lograr la identificación a nivel de especie. Con el objetivo de aproximarse a la identificación correcta de las BAL obtenidas se estudió también la secuencia del gen que codifica para la subunidad alfa de la fenilalanil-tRNA sintetasa (*pheS*) (Naser et al., 2007). Mediante BLAST se realizó la búsqueda y comparación con secuencias de cepas tipo similares depositadas en el Genbank. A partir de los resultados se realizó un árbol filogenético con las secuencias de los aislamientos y las secuencias correspondientes a las especies más cercanas obtenidas en la comparación anterior (Figura IV.4.13).

Mediante estos análisis, la secuencia del aislamiento B se agrupó con la secuencia de la cepa tipo de *L. paracasei* LMG 9191 (Figura IV.4.13), presentando una homología de 97,50% con esta secuencia. La segunda secuencia con mayor homología fue la correspondiente a la cepa tipo de *L. acetotolerans* CIP 103180 con una homología del 72,49%. La combinación de los análisis de la secuencia parcial del gen que codifica para el 16S ARNr y del gen *pheS* sugiere que el aislamiento B se podría identificar como *L. paracasei*.

La secuencia del gen *pheS* del aislamiento Da mostró en el análisis por BLAST un 100% de homología con la secuencia de la cepa tipo *L. plantarum* LMG 6907, presentando una homología bastante menor (90,86%) con la cepa tipo *L. paraplantarum* LMG 16673. Estos resultados sugieren que el aislamiento Da podría ser identificado como *L. plantarum*.

La secuencia obtenida para el aislamiento C presentó la mayor homología con la cepa tipo *L. brevis* LMG 6906, lo cual confirmó su identificación.

Los aislamientos bacterianos del kefir de agua fueron identificados como *Lactobacillus* sp. (E1, E2, ANRB1, ANRB2) y *Gluconacetobacter* sp. (AR2C1 y AR2C2), basado en las secuencias obtenidas para el ADNr 16S. Las secuencias de E1 y E2, en el análisis por BLAST, obtuvieron una homología de 99,89% y un 98,94% con las secuencias de las cepas tipo *Lactobacillus ghanensis* L489 y *Lactobacillus nagelii* JCM 12492 respectivamente. Las secuencias de los aislamientos ANRB1 y ANRB2 presentaron 99,89% de homología con la cepa tipo *L. paracasei* ATCC 25302.

En el árbol filogenético realizado para los aislamientos bacterianos identificados por análisis parcial de la región del ADNr 16S, los aislamientos E1 y E2 se agruparon en el cluster con las cepas tipo *Lactobacillus ghanensis* L489. Los aislamientos ANRB1 y ANRB2 se agruparon con especies del grupo *L. paracasei/L. casei*, siendo la especie más cercana la cepa tipo *L. paracasei* ATCC 25302, lo cual sugiere que estos aislamientos podrían pertenecer a esta especie (Figura IV.4.12).

En el árbol filogenético realizado para los aislamientos bacterianos identificados por análisis del gen *pheS* las secuencias de los aislamientos ANRB1 y ANRB2 se agruparon con la secuencia de la cepa tipo de *L. paracasei* LMG 9191 (IV.4.13). A su vez en el análisis por BLAST mostraron una homología de 99,23% con esta secuencia, siendo la segunda especie tipo más cercana *L. acetotolerans* CIP 103180 con una homología del 74,79%. La combinación de los análisis de la secuencia parcial del gen que codifica para el 16S ARNr y de *pheS* sugiere que los aislamientos ANRB1 Y ANRB2 podrían identificarse como *L. paracasei*.

Las secuencias *pheS* de los aislamientos E1 y E2 no se agrupan con ninguna secuencia correspondiente a cepas tipo, siendo la secuencia más cercana la cepa tipo *L. nagelii* LMG 21593 (IV.4.13). Según el análisis de la secuencia de la región del ARNr 16S, estas secuencias podrían identificarse como *L. nagelii* o *L. ghanensis*. En este caso, para identificar a nivel de especie, tuvo que realizarse una identificación fenotípica dado que la secuencia de la región *pheS* de *L. ghanensis* no se encuentra depositada en la base de datos del GenBank en el momento de realizado el análisis. En la identificación fenotípica se evaluó el crecimiento en presencia de 6,5% de NaCl. Como estos aislamientos no crecieron en estas condiciones se sugiere que los mismos se identifican como *L. ghanensis*. Además, es importante mencionar que se obtuvo en este trabajo la secuencia de *L. ghanensis* para la región *pheS*, que hasta el momento no se encuentra disponible en la base de datos.

Los aislamientos AR2C1 y AR2C2 basado en las secuencias obtenidas para el ADNr 16S fueron identificados *Gluconacetobacter* sp. El análisis por BLAST mostró que estas secuencias presentaban una homología mayor al 98,7% con las secuencias de cepas tipo de las especies de *G. liquefaciens* JCM 17840, *G. dulcium* LMG 1728, *G. sacchari* DSM 12717, *G. takamatsuzukensis*

T61213-20-1a y *G. tumulicola* K5929-2-1b. Para la diferenciación entre estas especies se realizaron pruebas fenotípicas cuyo resultado mostró que ambos aislamientos pertenecían a la especie *G. dulcium* (Tabla IV.4.2) (Sombolestani et al., 2021).

Tabla IV.4.2. Pruebas fenotípicas para la identificación a nivel de especie de *Gluconacetobacter* sp.

Prueba fenotípica	AR2C1	AR2C2
Crecimiento a 37 °C en LMG Agar	+	+
Crecimiento con 10% (v/v) etanol	-	-
Crecimiento con 1% (m/v) NaCl	+	+

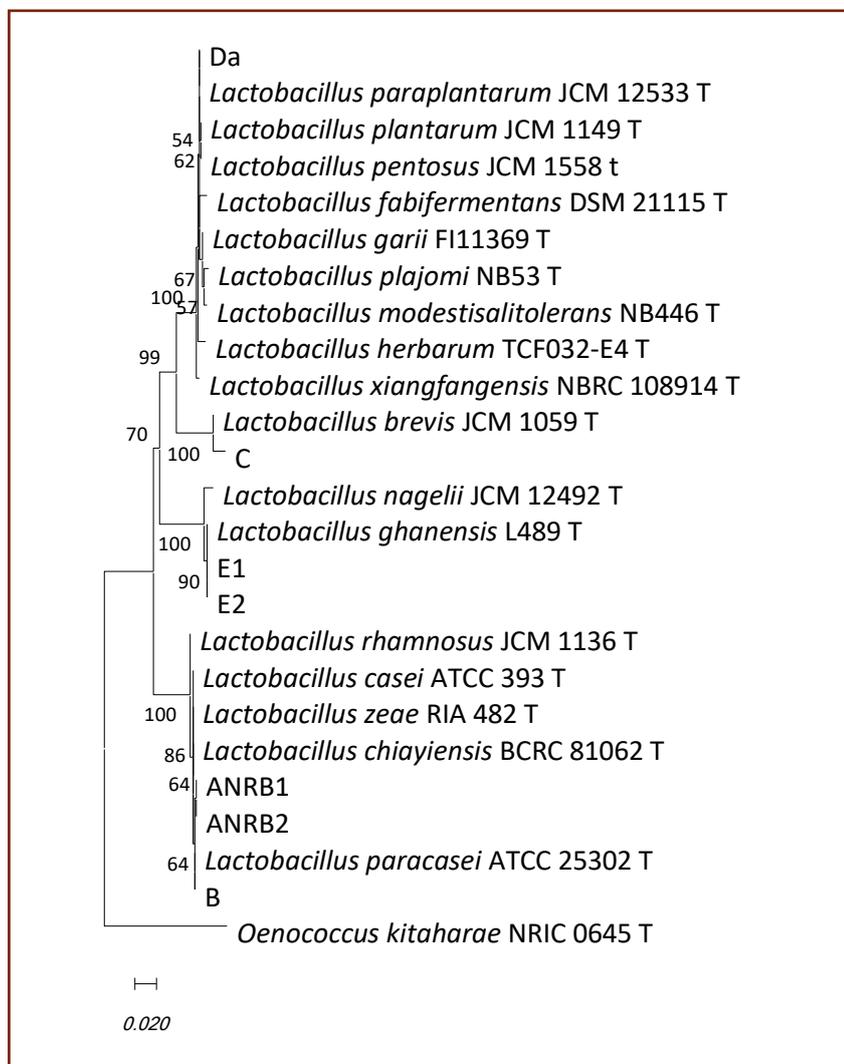


Figura IV.4.12. Árbol filogenético basado en la secuencia parcial del ADNr 16S de los aislamientos de silobolsas de sorgo (B, C, Da) y de KA (E1, E2, ANRB1, ANRB2) para el género *Lactobacillus* spp. Los árboles se construyeron utilizando el método de Neighbor-Joining. Los valores de Bootstrap (1000 iteraciones) se indican en los nodos. T-significa cepa tipo.

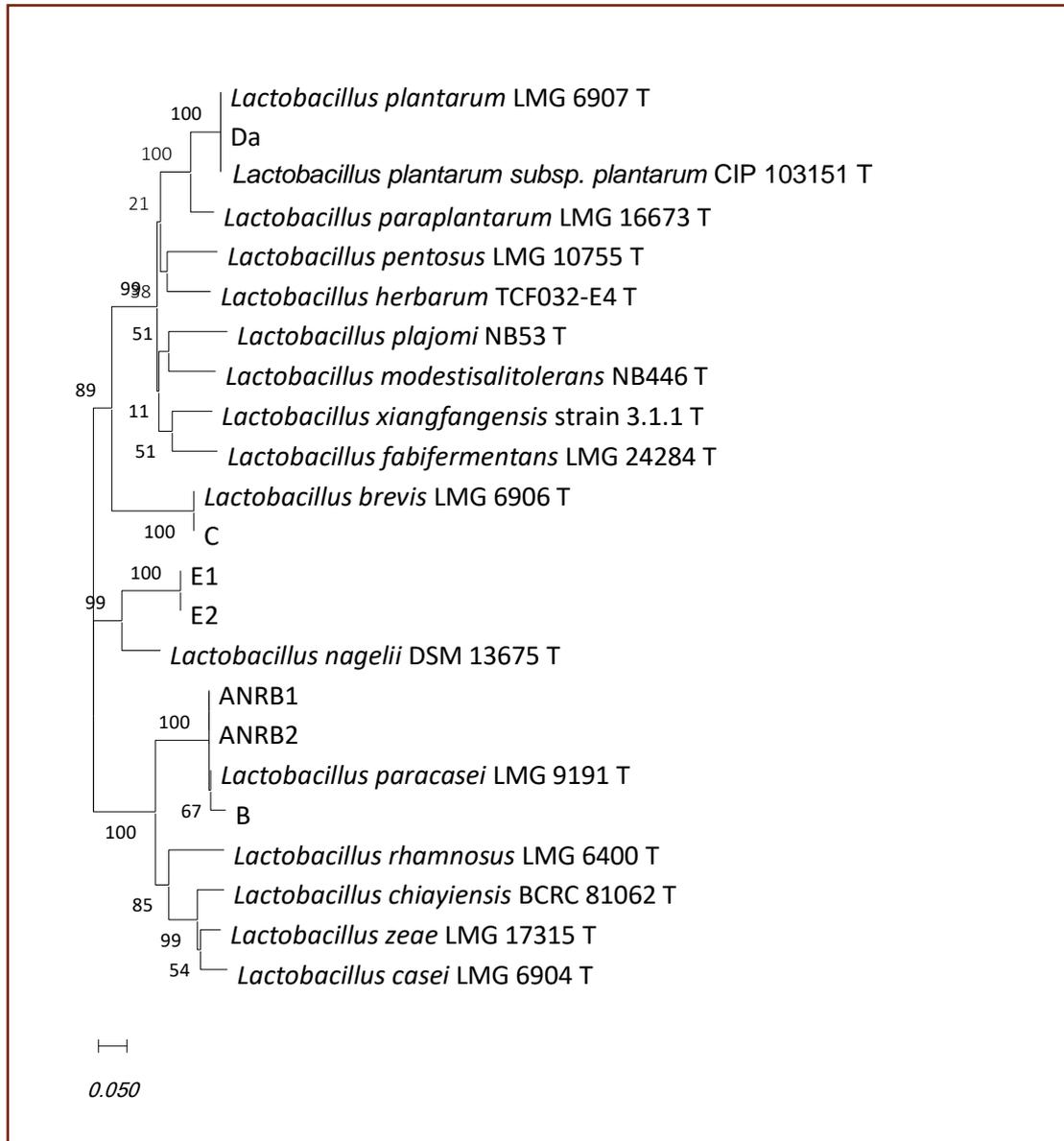


Figura IV.4.13. Árbol filogenético basado en la secuencia de la región que codifica para la subunidad alfa de la fenilalanil-tRNA sintetasa (*pheS*) de los aislamientos de silobolsas de sorgo (B, C, Da) y del KA (E1, E2, ANRB1, ANRB2) de *Lactobacillus* spp. Los árboles se construyeron utilizando el método de Neighbor-Joining. Los valores de Bootstrap (1000 iteraciones) se indican en los nodos. T-significa cepa tipo.

IV.4.6.2. Identificación de levaduras

Los 5 aislamientos de levaduras obtenidos de silobolsas de grano húmedo de sorgo se lograron identificar a nivel de especie a través del análisis de la región D1/D2, cuyas secuencias presentaron en el análisis por BLAST una similitud mayor al 99% (Kurtzman, 2011a) con secuencias de cepas tipo depositadas en el GenBank correspondientes en cada caso a una única especie. Las secuencias de los aislamientos Lev1, Lev2 y Lev3 presentaron en el análisis por BLAST una homología del 100% con la secuencia de la cepa tipo *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 18824, siendo la secuencia de la cepa tipo *S. cariocanus* NRRL Y-27337, la siguiente con mayor homología (99%). En el árbol filogenético obtenido en base a las secuencias de la región D1/D2 de todos los aislamientos del género *Saccharomyces* obtenidos en esta tesis, se constató que Lev1, Lev2 y Lev3 se agrupaban con la cepa *S. cerevisiae* ATCC 18824 (Figura IV.4.14)

Las secuencias de los aislamientos Lev4 y Lev5 presentaron un 100% de homología con la secuencia de la cepa tipo de *Wickerhamomyces anomalus* CBS 5759. La segunda secuencia más cercana correspondió a la cepa tipo *Wickerhamomyces lynferdii* NRRL Y-7723 con la cual presentó un 98,83% de homología. Estos resultados coinciden con lo que se observa en el árbol filogenético basado en secuencias D1/D2 para esta especie (Figura IV.4.15).

Las levaduras aisladas del KA también se lograron identificar a nivel de especie a través del análisis de la región D1/D2. Las secuencias D1/D2 de los aislamientos PM1 y PM2 presentaron ambas 99,53% de homología con la cepa tipo de *Pichia membranifaciens* NRRL Y-2026. La segunda especie más cercana fue *Pichia garciniae* con un 96,98% de homología. Las secuencias D1/D2 de los aislamientos SC1 y SC2 mostraron un 100% de homología con la cepa tipo *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 18824 en el GenBank. La segunda especie más cercana a los aislamientos SC1 y SC2 fue *Saccharomyces cariocanus* con un 99% de similitud. Se realizaron árboles filogenéticos para cada grupo de cepas a partir del análisis del dominio D1/D2 del 26S ADNr (Figura IV.4.14 y IV.4.15). Los aislamientos PM1 y PM2 se agruparon en un cluster con la cepa tipo *Pichia membranifaciens* NRRL Y-2026, mientras que los aislamientos SC1 y SC2 formaron un cluster con la cepa tipo *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 18824, confirmando en cada caso su identificación.

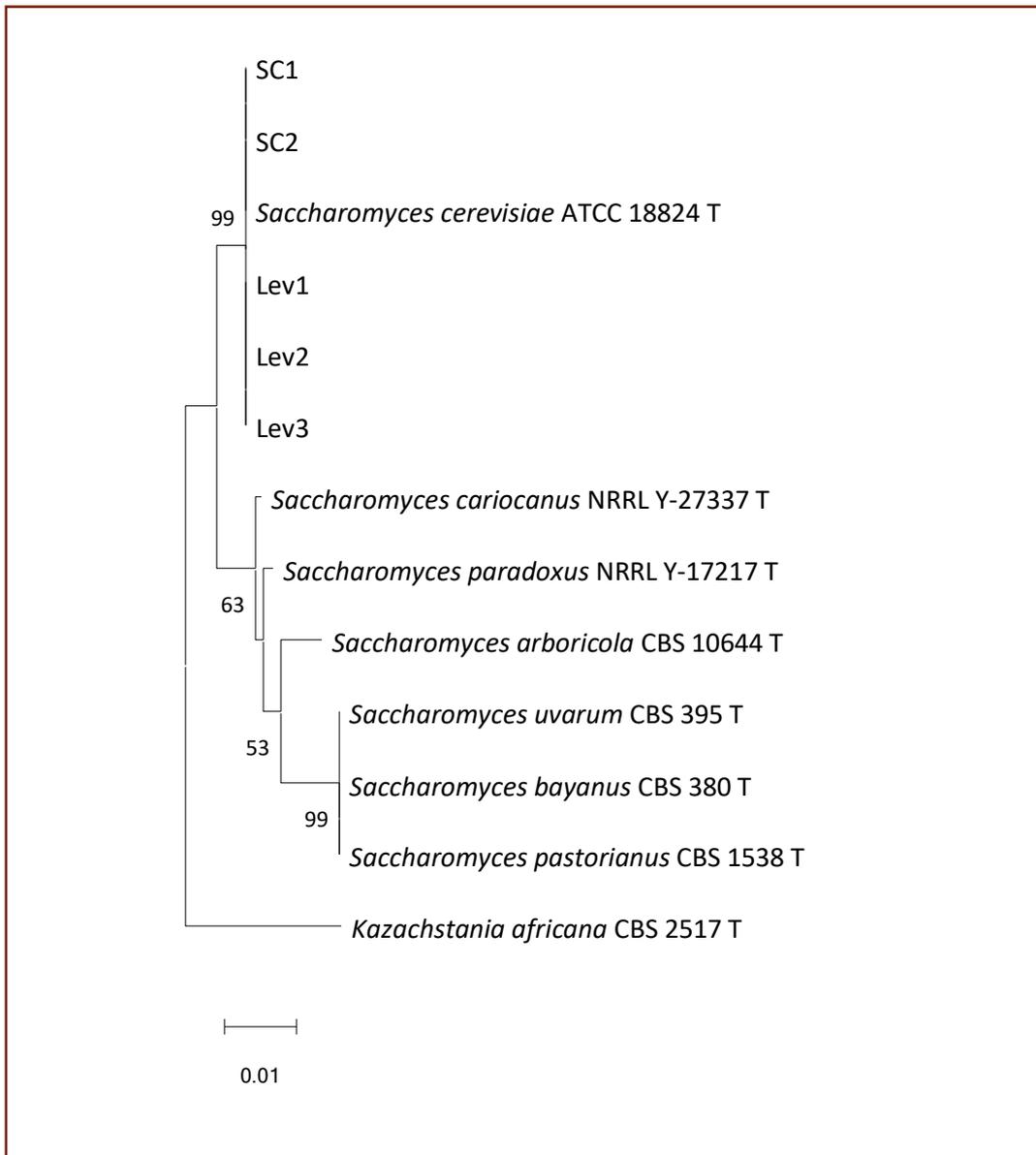


Figura IV.4.14. Árbol filogenético basado en secuencias D1/D2 de los aislamientos de silo-bolsas de sorgo (Lev1, Lev2, Lev3) y del KA (SC1, SC2) para el género *Saccharomyces* spp. Los árboles se construyeron utilizando el método de Neighbor-Joining. Los valores de Bootstrap (1000 iteraciones) se indican en los nodos. T-significa cepa tipo.

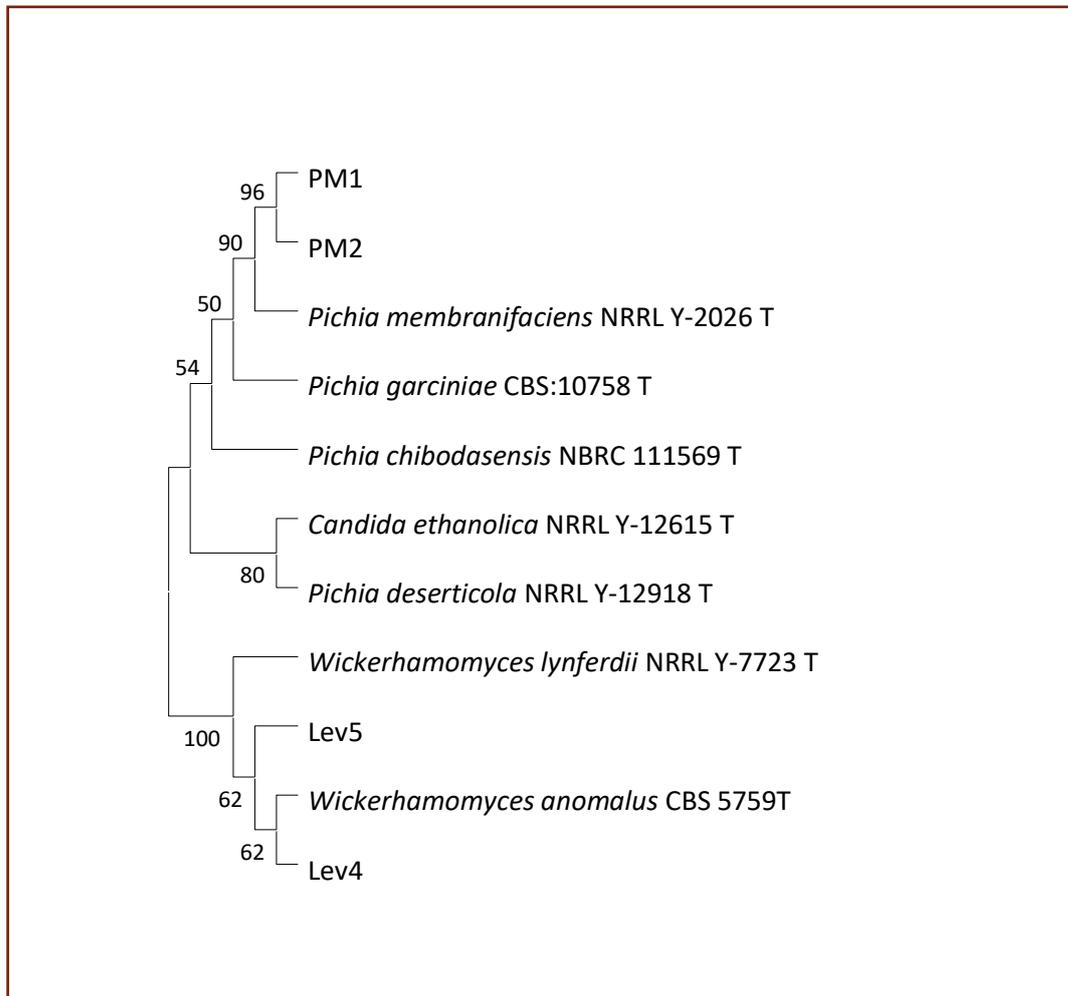


Figura IV.4.15. Árbol filogenético basado en secuencias D1/D2 de los aislamientos de los de silo-bolsas de sorgo (Lev4 y Lev5) y del KA (PM1, PM2) para el género *Pichia* spp. y *Wickerhamomyces* spp. Los árboles se construyeron utilizando el método de Neighbor-Joining. Los valores de Bootstrap (1000 iteraciones) se indican en los nodos. T-significa cepa tipo.

En la Tabla IV.4.3 se resumen las bacterias lácticas y levaduras aisladas en esta tesis tanto del KA como de silobolsas de grano húmedo de sorgo

Tabla IV.4.3. Bacterias lácticas y levaduras aisladas del KA y de silobolsas de grano húmedo de sorgo

Código	Identificación	Lugar de aislamiento
E1	<i>Lactobacillus ghanensis</i>	Aislamientos obtenidos del KA
E2	<i>Lactobacillus ghanensis</i>	
ANRB1	<i>Lactobacillus paracasei</i>	
ANRB2	<i>Lactobacillus paracasei</i>	
AR2C1	<i>Gluconacetobacter dulcium</i>	
AR2C2	<i>Gluconacetobacter dulcium</i>	
PM1	<i>Pichia membranifaciens</i>	
PM2	<i>Pichia membranifaciens</i>	
SC1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
SC2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
B	<i>Lactobacillus paracasei</i>	Aislamientos obtenidos de silobolsas de grano húmedo de sorgo
C	<i>Lactobacillus brevis</i>	
Da	<i>Lactobacillus plantarum</i>	
Lev 1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
Lev 2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
Lev 3	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
Lev 4	<i>Wickerhamomyces anomalus</i> (<i>Pichia anomala</i>)	
Lev 5	<i>Wickerhamomyces anomalus</i> (<i>Pichia anomala</i>)	

IV.4.7. Estudio de la capacidad de crecimiento a partir de lactato como fuente de carbono

Se estudió la asimilación de lactato de los diferentes aislamientos de levaduras obtenidos en la presente tesis, de forma de conocer si las mismas eran capaces de crecer a partir del ácido láctico presente en el silo. Los resultados mostraron que los aislamientos PM1 y PM2 identificados como *Pichia membranifaciens* no crecen asimilando lactato, mientras que el resto de los aislamientos presentaron crecimiento a partir de esta fuente de carbono (Tabla IV.4.4).

Tabla IV.4.4. Crecimiento de los diferentes aislamientos a partir de lactato como única fuente de carbono. (+) Crecimiento; (-) No hay crecimiento

<i>Aislamiento</i>	<i>Crecimiento por consumo de lactato</i>
<i>P. membranifaciens PM1</i>	-
<i>P. membranifaciens PM2</i>	-
<i>S. cerevisiae SC1</i>	+
<i>S. cerevisiae SC2</i>	+
<i>S. cerevisiae Lev1</i>	+
<i>S. cerevisiae Lev2</i>	+
<i>S. cerevisiae Lev3</i>	+
<i>W. anomalus Lev4</i>	+
<i>W. anomalus Lev5</i>	+

Se realizó un control de crecimiento de cada aislamiento en el mismo medio reemplazando la fuente de carbono por glucosa. Todos los aislamientos fueron capaces de crecer a partir de la glucosa por lo cual los mismos se encontraban viables. Estos resultados sugieren que los aislamientos PM1 y PM2 no serían capaces de crecer consumiendo el ácido láctico presente en el silo, lo cual es relevante ya que una de las características deseadas para las levaduras que se adicionan a los silos es la incapacidad para consumir lactato.

IV.4.8. Ensayos de control biológico en mini-silos a partir de inóculos seleccionados utilizando los aislamientos obtenidos del KA

Con el objetivo de obtener un inóculo mínimo que logre controlar el crecimiento de *A. flavus* en los mini-silos de grano húmedo de sorgo se ensayaron diferentes combinaciones de microorganismos.

En la Tabla IV.4.5 se muestran los diferentes tratamientos realizados según los inóculos estudiados.

Tabla IV.4.5. Diferentes tratamientos realizados con los microorganismos aislados del KA

Tratamiento	Microorganismos
3	<i>S. cerevisiae</i> SC1
4	<i>P. membranifaciens</i> PM1
5	<i>S. cerevisiae</i> SC1 y <i>P. membranifaciens</i> PM1
6	<i>L. ghanensis</i> E1, <i>L. paracasei</i> ANRB1
7	<i>L. ghanensis</i> E1, <i>L. paracasei</i> ANRB1, <i>G. dulcium</i> AR2C1
8	<i>L. ghanensis</i> E1, <i>L. paracasei</i> ANRB1, <i>S. cerevisiae</i> SC1
9	<i>L. ghanensis</i> E1, <i>L. paracasei</i> ANRB1, <i>S. cerevisiae</i> SC1, <i>P. membranifaciens</i> PM1
10	<i>L. ghanensis</i> E1, <i>L. paracasei</i> ANRB1, <i>G. dulcium</i> AR2C1, <i>S. cerevisiae</i> SC1
11	Microorganismos KA
12	<i>L. ghanensis</i> E1, <i>L. paracasei</i> ANRB1, <i>G. dulcium</i> AR2C1, <i>S. cerevisiae</i> SC1, <i>P. membranifaciens</i> PM1, resuspendido en solución de kefir de agua liofilizado
13	<i>L. ghanensis</i> E1, <i>L. paracasei</i> ANRB1, <i>G. dulcium</i> AR2C1, <i>S. cerevisiae</i> SC1, <i>P. membranifaciens</i> PM1, resuspendido en agua

Los ensayos de control biológico con los tratamientos 3, 4 y 5 (Figura IV.4.16) mostraron que la cepa de *S. cerevisiae* SC1 fue capaz de inhibir significativamente el crecimiento de *A. flavus* con respecto al control realizado inoculado con agua. El crecimiento del hongo con el tratamiento 3 fue de 18%. Esta reducción significativa del crecimiento de *A. flavus* también se logró al inocular los mini-silos con una mezcla de las levaduras *S. cerevisiae* SC1 y *P. membranifaciens* PM1 (tratamiento 5). La inhibición del crecimiento fue mayor en el tratamiento 3 que en el tratamiento 5. En cambio, en el tratamiento 4 realizado inoculando *P. membranifaciens* PM1 no hubo una reducción significativa del crecimiento con respecto al control. Estos resultados podrían sugerir

que la inhibición del crecimiento está dada por el aislamiento SC1 más que por la presencia del aislamiento PM1. Para todos los tratamientos el pH del sorgo al final de la incubación fue de 5.

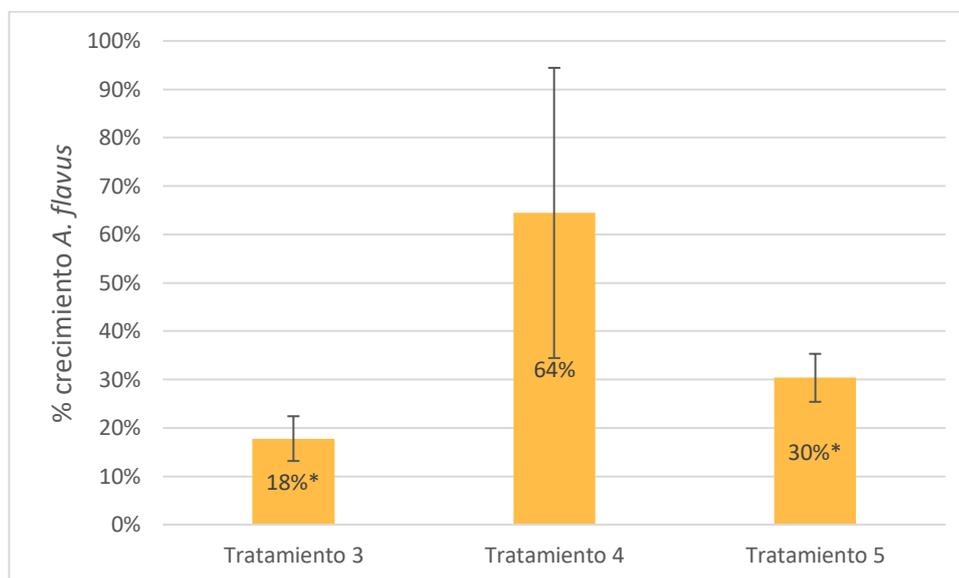


Figura IV.4.16. % de crecimiento de *A. flavus* en los mini silos tratados con respecto al control para los tratamientos 3, 4 y 5

*Valores de concentración de *A. flavus* significativamente diferentes al control calculados mediante el test de Dunnett con un 95% de confianza. Las barras de error representan el desvío estándar.

Los ensayos realizados con una combinación de los dos *Lactobacillus* *L. ghanensis* E1, *L. paracasei* ANRB1 (tratamiento 6), y la adición de la bacteria acética *G. dulcium* AR2C1 (tratamiento 7) o de la levadura *S. cerevisiae* SC1 (tratamiento 8) mostraron que el crecimiento de *A. flavus* en cada uno de los tratamientos no presentaba diferencias significativas con respecto al control (Figura IV.4.17). De estos resultados se observa que los diferentes tratamientos no fueron capaces de inhibir el crecimiento del *A. flavus* en los mini-silos de sorgo. Este mismo resultado se obtuvo para el tratamiento 9 donde se combinaron los dos *Lactobacillus*, *L. ghanensis* E1, *L. paracasei* ANRB1, con las dos levaduras *S. cerevisiae* SC1, *P. membranifaciens* PM1. En todos los tratamientos el pH del sorgo en los mini-silos al finalizar la incubación fue de 4, mientras que el valor de pH para el control fue de 5. Para el tratamiento 8 y 9 se observó que *S. cerevisiae* SC1 integrando el inóculo mixto perdía su capacidad de inhibición de crecimiento de *A. flavus*, la cual había sido demostrada en los tratamientos 3 y 5.

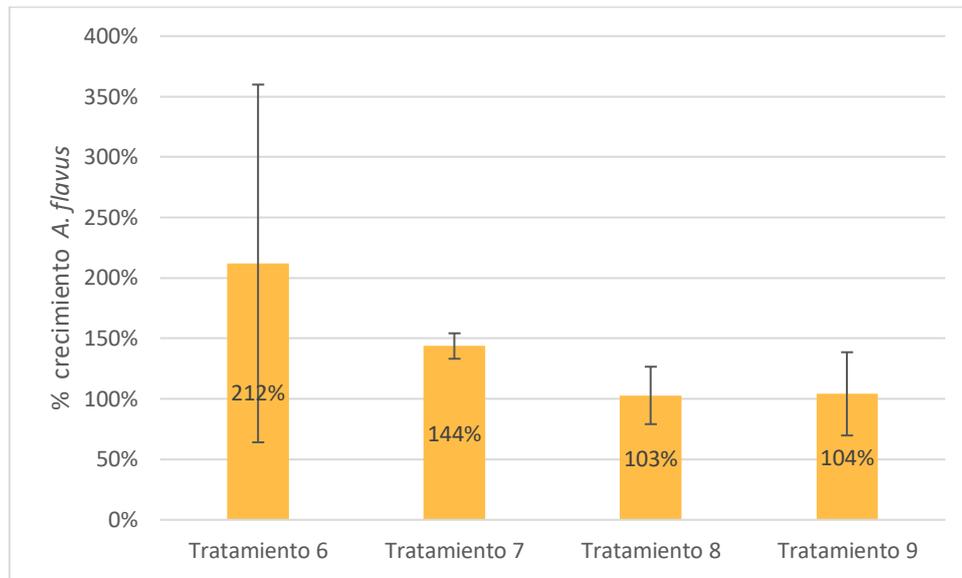


Figura IV.4.17. % de crecimiento de *A. flavus* en los mini silos tratados con respecto al control para los tratamientos 6, 7, 8 y 9.

En ninguno de los casos se observaron diferencias significativas respecto al control según el test de Dunnett con un 95% de confianza. Las barras de error representan el desvío estándar.

Se prepararon mini-silos para realizar recuentos a tiempo 0 y a los 7 días de incubación de los microorganismos inoculados en los tratamientos 7 y 9. Los resultados mostraron que todos los microorganismos utilizados, *L. ghanensis* E1, *L. paracasei* ANRB1, *G. dulcium* AR2C1, *S. cerevisiae* SC1, *P. membranifaciens* PM1 podían crecer en este sistema (Figura IV.4.18 a y b).

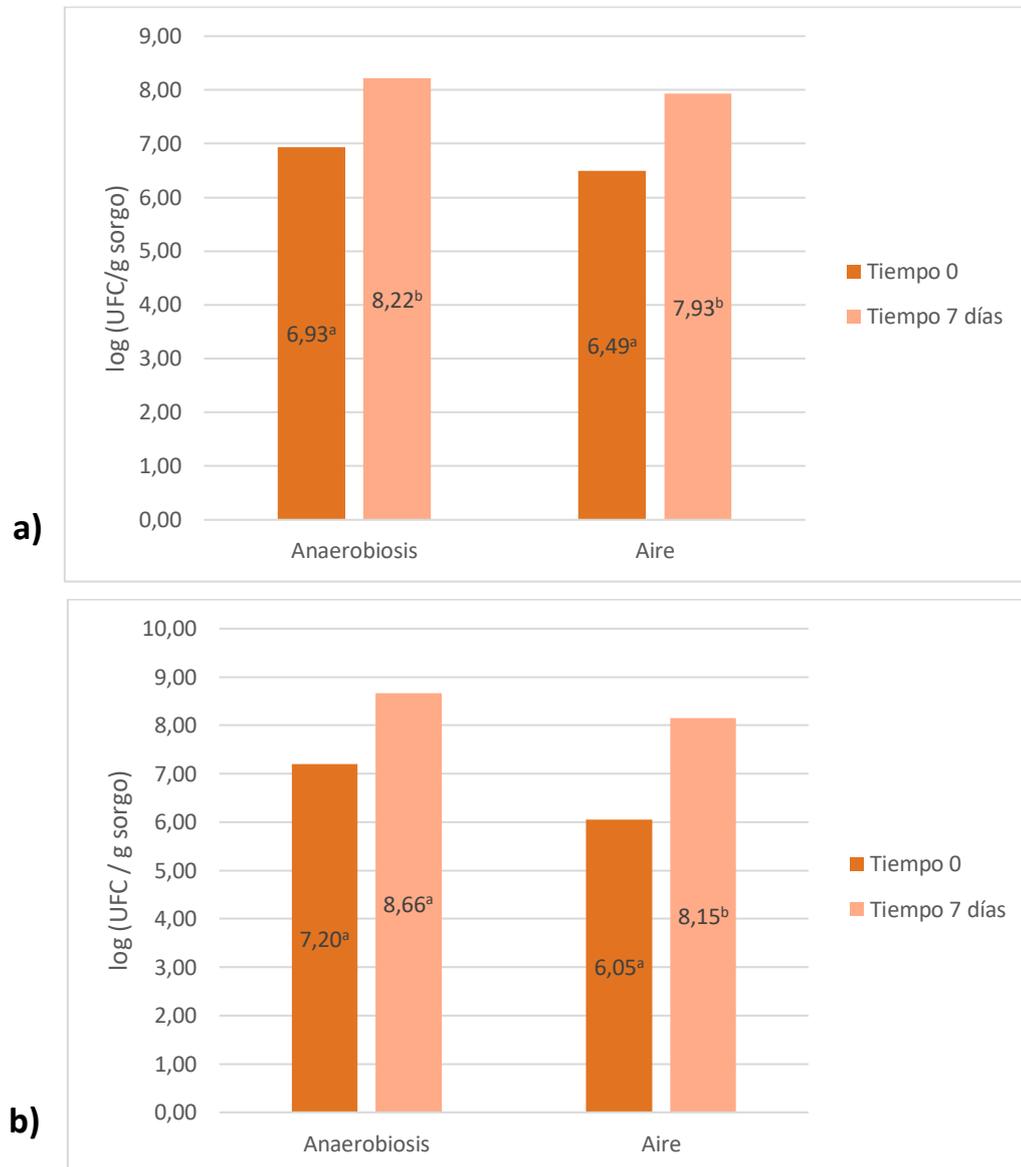


Figura IV.4.18. Recuentos a tiempo 0 y a los 7 días de incubación del tratamiento con **a)** inóculo 2, Bacterias anaerobias: *L. ghanensis* E, *L. paracasei* ANRB; bacterias aerobias: *L. paracasei* ANRB, *G. dulcium* AR2C. **b)** inóculo 4 Bacterias anaerobias: *L. ghanensis* E, *L. paracasei* ANRB; levaduras *S. cerevisiae*, *P. membranifaciens*. Los valores con diferentes letras son significativamente diferentes, calculados por el Test LSD Fisher ($\alpha = 0.05$).

Dado que las diferentes combinaciones ensayadas en los tratamientos anteriores no lograron inhibir el crecimiento del hongo en este sistema se decidió realizar los tratamientos 10 y 11 (Figura IV.4.19). El tratamiento 10 estudia un inóculo compuesto por una combinación de dos *Lactobacillus* (E1 y ANRB1), una bacteria acética (AR2C1) y una levadura (SC1), representando así los diferentes tipos de microorganismos aislados del KA. Por otra parte, el tratamiento 11 estudia los microorganismos del KA, los cuales se obtuvieron mediante centrifugación del KA y posterior re suspensión en agua.

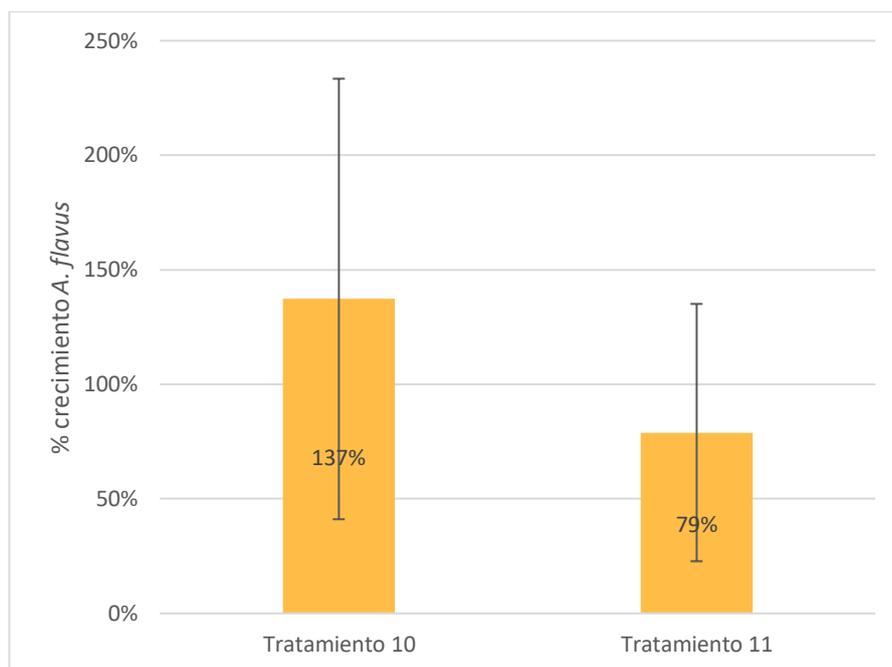


Figura IV.4.19. % de crecimiento de *A. flavus* en los mini silos tratados con respecto al control para los tratamientos 10 y 11.

En ninguno de los casos se observaron diferencias significativas respecto al control según el test de Dunnett con un 95% de confianza. Las barras de error representan el desvío estándar.

El pH de los mini-silos post incubación para ambos tratamientos fue de 4. Los microorganismos presentes en los inóculos de los tratamientos 10 y 11 no fueron capaces de inhibir el crecimiento de *A. flavus* en este sistema, ya que el crecimiento de este hongo no presentó diferencias significativas con el control (Figura IV.4.19). Dado los resultados obtenidos, se decidió incluir en el inóculo al sobrenadante del KA estéril (KAS) liofilizado.

Con el objetivo de recrear el KA en el laboratorio para lograr el control de *A. flavus* en los mini-silos se estudió un inóculo formado por todos los microorganismos que fueron aislados del mismo, *L. ghanensis* E1, *L. paracasei* ANRB1, *G. dulcium* AR2C1, *S. cerevisiae* SC1, *P. membranifaciens* PM1, resuspendidos en KAS liofilizado y en agua (tratamiento 12 y 13 respectivamente).

Los resultados obtenidos para tratamiento 13 mostraron que el mismo no fue capaz de inhibir el crecimiento de *A. flavus*, ya que el crecimiento en presencia de este inóculo es significativamente mayor al control (Figura IV.4.20). Sin embargo, la misma composición de inóculo que en el tratamiento 13 pero resuspendido en solución de KAS liofilizado logró controlar significativamente el crecimiento de *A. flavus* con respecto al control (Figura IV.4.20), reduciendo su crecimiento a 1%. Estos resultados muestran claramente la importancia de algunos compuestos que componen el sobrenadante del KA, los cuales colaborarían con los

microorganismos presentes en el mismo para lograr el control del crecimiento del hongo en estudio. El pH del sorgo en los mini-silos post incubación fue de 5 y 4 para los tratamientos 12 y 13 respectivamente.

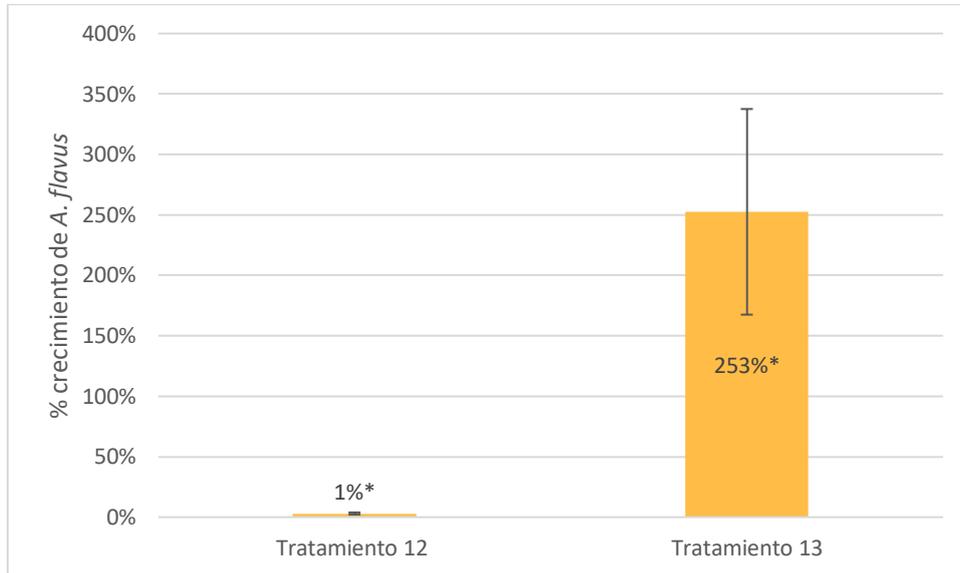


Figura IV.4.20. % de crecimiento de *A. flavus* en los mini silos tratados con respecto al control para los tratamientos 12 Y 13.

*Valores de concentración de *A. flavus* significativamente diferentes al control calculados mediante el test de Dunnett con un 95% de confianza. Las barras de error representan el desvío estándar.

Estos últimos resultados en combinación con los obtenidos en los mini-silos T2 (sección IV.4.3), en donde se estudió el biocontrol del KAS, muestran que el éxito en la inhibición del crecimiento de *A. flavus* se logra con una combinación de los microorganismos presentes en el KA con determinados componentes solubles del sobrenadante de KA.

IV.5. DISCUSIÓN

IV.5.1. Biocontrol de *A. flavus* en minisilos de sorgo con microorganismos epífitos

El uso del control biológico ha funcionado exitosamente limitando el crecimiento de hongos micotoxigénicos en diversos sistemas. Los silos de grano húmedo son un ejemplo de esos sistemas, en los cuales el desarrollo de bacterias lácticas y la concomitante disminución del pH causada por la producción de ácido láctico permiten mantener la calidad del material ensilado una vez que se alcanzan las condiciones de anaerobiosis. Este tipo de biocontrol puede ocurrir naturalmente a partir de bacterias lácticas normalmente presentes en el material a ensilar (Pahlow et al., 2003). Sin embargo, para lograr una rápida disminución del pH y estabilidad del silo se pueden utilizar inoculantes comerciales constituidos por bacterias lácticas seleccionadas (Fabiszewska et al., 2019; Muck et al., 2018). Es importante destacar que los inoculantes de este tipo a la venta en Uruguay son importados. El desarrollo de un inoculante nacional constituiría un nuevo insumo para la industria nacional y disminuiría la dependencia tecnológica con el extranjero.

Además de las bacterias lácticas ciertas levaduras han demostrado potencial para ser utilizadas en el biocontrol de microorganismos aerobios en etapas en las cuales el oxígeno está presente, como la fase aerobia inicial (Owens & Smiley, 2018; Passoth et al., 2006).

Para que ocurra el biocontrol en un determinado sistema los microorganismos antagonistas deben ser capaces de desarrollarse en ese sistema para poder ejercer su acción. Es por ello que en la mayoría de los casos los agentes de biocontrol se seleccionan de sistemas en donde se espera que ejerzan su acción (Carvalho et al., 2021). Por esta razón, con el objetivo de buscar microorganismos biocontroladores del desarrollo de *A. flavus* en la fase aerobia de silos de grano húmedo de sorgo, en este trabajo se aislaron bacterias lácticas y levaduras de silos no deteriorados que se estaban utilizando para alimentación.

El análisis realizado determinó la presencia de bacterias lácticas y levaduras en concentraciones elevadas en las zonas no expuestas al oxígeno, mientras que en las zonas expuestas predominó un tipo de levadura identificada como *Wickerhamomyces anomalus*. Esta especie fue conocida anteriormente como *Pichia anomala*, *Hansenula anomala* o *Candida pelliculosa* y asignada finalmente al género *Wickerhamomyces* por Kurtzman (2011). Esta levadura se ha encontrado en ambientes diversos, la misma es anaerobia facultativa y es muy versátil por su capacidad para tolerar condiciones ambientales extremas como ambientes oxidativos, salinos, estrés osmótico, bajos pHs y temperaturas de shock (Padilla et al., 2018). Su presencia en silos de sorgo como población predominante fue reportada por Agarussi (2019) al analizar el microbioma fúngico de silos de granos rehidratados. Una cepa de esta especie (*W. anomalus* J121) fue seleccionada como

controlador biológico del hongo *Penicillium roqueforti* en silos de avena, trigo y cebada y en condiciones de entrada de aire en los silos y ha dado lugar a numerosos estudios acerca de su biología, ecología y capacidad de biocontrol (Bjornberg & Schnurer, 1993; Druvefors & Schnürer, 2005; Olstorpe et al., 2010; Passoth et al., 2006; Passoth & Schnürer, 2003; Petersson & Schnurer, 1995; Petersson et al., 1999; Petersson & Schnürer, 1998). *W. anomalous*, también fue estudiada por Nybogård (2016) como inoculante en silos de granos de sorgo. En esas condiciones los recuentos de hongos luego de 2 meses fueron menores que en los silos control. Sin embargo, su presencia no impidió el desarrollo de *A. flavus*.

Se determinó que la actividad biocontroladora de *W. anomalous* en silos de trigo estaba dada por una combinación de factores que incluían la competencia por oxígeno con el hongo a controlar y la formación de compuestos como etil acetato y etanol (Druvefors et al., 2005). La presencia de etanol en un silo es una característica no deseada en el sistema de producción ganadero. El mismo puede ser producido por varios tipos de microorganismos presentes en los silos (bacterias heterolácticas, enterobacterias y levaduras). Sin embargo, altas concentraciones de etanol (3-4%) se asocian a la presencia de un alto número de levaduras y se asocian a la pérdida de materia seca en este sistema y a problemas en el sabor de la leche (Kung et al., 2018). Por ello, elevadas concentraciones de este metabolito deben evitarse.

Se demostró además, que la cepa *W. anomalous* J121 era capaz de consumir ácido láctico generando un aumento en el pH del silo (Walker, 2011). Esta característica también fue demostrada para los aislamientos Lev4 y Lev5 obtenidos en el presente trabajo de tesis y pertenecientes a la misma especie. El consumo de lactato por parte de las levaduras representa un problema para la estabilidad aeróbica del material luego de la apertura del silo (Tabacco et al., 2011), por lo cual sería preferible utilizar microorganismos no consumidores de lactato como inoculantes.

Las restantes levaduras aisladas de silo bolsas de grano húmedo de sorgo (Lev1, Lev2 y Lev3) fueron identificados como *Saccharomyces cerevisiae*. Trabajos como los de Sanderson (1993) informan que este especie es la predominante al finalizar el proceso de ensilado en silos de maíz y sorgo. La presencia de levaduras de esta especie se considera un defecto en los silos ya que en anaerobiosis producen etanol como producto de fermentación. Se demostró también que los aislamientos Lev1, Lev2 y Lev3 eran capaces de asimilar lactato en presencia de oxígeno. Autores como Jonsson & Pahlow (1984) informaron que si en el silo se lograban y se mantenían las condiciones de anaerobiosis predominaban cepas de *S. cerevisiae* las cuales no asimilaban lactato en esas condiciones, mientras que si entraba aire durante el almacenamiento predominaban levaduras del género *Candida* o *Wickerhamomyces* capaces de consumir lactato. Estas observaciones son concordantes con los resultados obtenidos en esta tesis, ya que las levaduras

predominantes en las muestras tomadas del centro del silo bolsa fueron identificadas como *S. cerevisiae*, mientras que los tomados de la cara expuesta del silo correspondieron a *W. anomalus*. Los aislamientos de bacterias lácticas obtenidos de silobolsas de grano húmedo de sorgo correspondieron en todos los casos al género *Lactobacillus*, identificándose como *L. paracasei* (B), *L. plantarum* (Da) y *L. brevis* (C). Estos microorganismos fueron aislados de las muestras que se tomaron de la mitad del silo, correspondiente a una zona de anaerobiosis, encontrándose en órdenes de 10^7 ufc/g. En cambio, en las muestras tomadas de la cara frontal del silo, expuesta al oxígeno, los recuentos descendieron, siendo menores que 10^4 ufc/g.

Especies de *Lactobacillus* como las aisladas en este trabajo, *L. paracasei*, *L. plantarum* y *L. brevis* también fueron encontradas en silos de diferentes granos como alfalfa, maíz rehidratado, sorgo rehidratado, planta entera de maíz (Ávila & Carvalho, 2020; Puntillo et al., 2020). *L. plantarum* y *L. brevis* se consideran que integran el grupo de las especies de *Lactobacillus* dominantes en los procesos de fermentación del ensilado (Fabiszewska et al., 2019). La mayoría de los inoculantes comerciales contienen especies de bacterias lácticas homofermentativas, *L. plantarum* es una de las especies conocidas por integrar estos productos (Fabiszewska et al., 2019).

Los aislamientos *L. paracasei* (B), *L. plantarum* (Da) presentan un metabolismo homofermentativo mientras que *L. brevis* (C) presenta un metabolismo heterofermentativo (Zheng et al., 2020). Las bacterias ácido lácticas homofermentativas se caracterizan por ser rápidas y eficientes productoras de ácido láctico, lo cual es favorable para disminuir el pH del ensilaje. En cambio, las bacterias ácido lácticas heterofermentativas están asociadas a la mejora de la estabilidad aeróbica por la producción de ácido acético y propiónico que tienen efectos antifúngicos (Muck et al., 2018).

En el presente trabajo se estudió la capacidad biocontroladora de los tres aislamientos de *Lactobacillus* obtenidos, los cuales presentaron diferentes metabolismos fermentativos como se explico anteriormente. Los resultados mostraron que estos microorganismos no fueron capaces de controlar el crecimiento de *A. flavus* en mini-silos de grano húmedo de sorgo en la fase aerobia. En los mini-silos inoculados con los aislamientos homofermentativos (B y Da) la biomasa de *A. flavus* duplicó a la del control. Para los mini-silos inoculados con *L. brevis* C hubo una disminución no significativa de biomasa en el mini-silo con respecto al control. Se realizaron recuentos para los 3 aislamientos en forma paralela a los ensayos de control biológico los cuales mostraron la capacidad de los mismos de crecer en los mini-silos en esas condiciones. Los aislamientos homofermentativos *L. paracasei* B y *L. plantarum* Da aumentaron en 4 órdenes su número al final de la incubación, descendiendo el pH del ensilado a 4,5. El aislamiento heterofermentativo *L. brevis* C aumentó su número en 3 órdenes logarítmicos al final de la

incubación manteniendo el pH inicial del ensilado (pH 5). Estos resultados muestran que la falta de biocontrol no se debió a la incapacidad de los aislamientos de crecer en este sistema.

Los mini-silos para recuento estaban inoculados con la misma concentración de *L. paracasei* B, *L. plantarum* Da y *L. brevis* C que los mini-silos tratamiento. La concentración de inóculo fue 2×10^4 ufc/g. Esta concentración fue establecida en base a lo que recomienda el inoculante comercial LactoSilo Gold®(BASF). Sin embargo hay trabajos que recomiendan utilizar un inóculo mayor a 10^5 ufc/g para reducir las pérdidas de materia seca en el silo y evitar la fermentación de clostridios (Zielinska et al., 2015).

Los mecanismos de acción postulados para explicar la inhibición de microorganismos indeseables en el silo causada por las bacterias lácticas involucran competencia de nutrientes, disminución del pH por producción de ácido láctico y síntesis de otros compuestos con actividad antifúngica y antimicrobiana. Diferentes especies de bacterias ácido lácticas sintetizan metabolitos como bacteriocinas, ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno, lactato peroxidasa o 1,2-propanodiol, los cuales inhiben bacterias levaduras y hongos que generan deterioro (Magnusson & Schnürer, 2005). Además se ha estudiado su capacidad de disminuir la concentración de micotoxinas por adsorción a la pared celular o por hidrólisis mediante enzimas proteolíticas extracelulares (Luz et al., 2018; Ma et al., 2017).

En este trabajo no se observó la capacidad de inhibición de crecimiento de *A. flavus* por ninguno de los aislamientos en las condiciones ensayadas en los mini-silos. Estos resultados podrían deberse a que la capacidad de inhibición depende de la cepa, del sistema y de los microorganismos que se pretenden inhibir. Carvalho et al. (2021) mencionan que el efecto de los inoculantes es cepa dependiente, observando que cepas de la misma especie tienen comportamientos diferentes cuando son inoculados en el mismo sustrato. Magnusson & Schnürer (2005) observaron en silos de forraje inoculados con *L. plantarum* una disminución en los recuentos de hongos y levaduras y una mejora en la estabilidad aeróbica. Ma et al. (2017) estudiaron el inóculo de *L. plantarum* en silos de maíz observando que el mismo podía reducir la concentración de aflatoxina B1 en el sistema. Sin embargo trabajos como los de Guan et al. (2020) mostraron que al estudiar tres cepas de *L. plantarum* como inoculante de silos de maíz se obtuvo mala estabilidad aeróbica y hubo un aumento de la aflatoxina B1 durante el ensilaje y en la fase de deterioro aeróbico.

El criterio para evaluar los aislamientos obtenidos fue la capacidad de inhibición del crecimiento de *A. flavus* en fase aerobia en mini-silos de sorgo. Dada la falta de inhibición lograda con los aislamientos de bacterias lácticas se decidió avanzar con los ensayos de biocontrol del kefir de agua que se estaban realizando de forma paralela, los cuales mostraban resultados prometedores.

IV.5.2. Biocontrol con KA en mini-silos

En este trabajo se demostró por primera vez la capacidad del kefir de agua de inhibir el crecimiento de *A. flavus* en mini-silos de grano húmedo de sorgo en la fase aerobia (Gonda et al., 2019). Este estudio también muestra la utilización de un consorcio de microorganismos en lugar de un solo antagonista como controlador biológico poscosecha, enfoque que se ha venido utilizando desde hace unos años (Droby & Wisniewski, 2018).

Los microorganismos presentes en el KA varían según el origen de los gránulos utilizados para producirlo, pero siempre predominan las bacterias lácticas, acéticas y levaduras entre las que se destacan *S. cerevisiae* y diferentes especies del género *Pichia* (Gamba et al., 2019; Lynch et al., 2021). Estos consorcios microbianos han demostrado no producir efectos adversos sobre los consumidores y han sido caracterizados como fuente de microorganismos probióticos (Zanirati et al., 2015). Teniendo en cuenta estas características y la similitud con la microbiota encontrada en los silos de grano húmedo de sorgo, se decidió ensayar la capacidad de estos consorcios de desarrollarse en los silos y de controlar el crecimiento de *A. flavus* en los mismos.

El desarrollo de *A. flavus* en los mini-silos de sorgo tratados con KA, incubados a 25 °C por 7 días, fue significativamente menor al encontrado en los silos control, alcanzado una inhibición del 99%. Sin embargo, este crecimiento fue significativamente mayor cuando los mini-silos fueron tratados con kefir de agua estéril (KAS) (T2), es decir sin microorganismos. El crecimiento de *A. flavus* en estos mini-silos fue de 201% comparado con el control. Estos resultados indican que la actividad antifúngica obtenida con KA se debe a la acción de los microorganismos presentes y no exclusivamente a compuestos solubles presentes en el sobrenadante, ya que no se observó inhibición cuando se utilizó como tratamiento al KAS.

Estos resultados aportan una nueva visión a lo observado en los estudios de Silva et al. (2009) donde se estudió la actividad antimicrobiana de diferentes soluciones azucaradas fermentadas con gránulos de kefir de agua. Los autores demostraron la mayor actividad antimicrobiana en medio de cultivo al utilizar el KA obtenido a partir de la fermentación de una solución preparada con 15 g/L de azúcar rubia. Se observó actividad antimicrobiana contra *Candida albicans*, *Salmonella typhi*, *Shigella sonnei*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. Los autores no hacen mención al rol de los microorganismos presentes en la solución fermentada sobre la acción inhibitoria sino que lo atribuyen a metabolitos producidos por ellos. Los autores sugieren que la acción inhibitoria no sólo se debe a los bajos pH alcanzados en la fermentación sino a otras sustancias producidas durante la fermentación por los microorganismos presentes como las bacteriocinas.

El aumento en el crecimiento de *A. flavus* en los silos tratados con KAS sugiere que el crecimiento fúngico en los granos de sorgo está limitado por los nutrientes, ya que el mismo se incrementa en

presencia de nutrientes adicionales aportados por el tratamiento con KAS. Estos resultados difieren con el trabajo de Caro Vélez & León Pelaez (2014) en donde se obtuvo reducción del crecimiento de *Aspergillus ochraceus* en medio de cultivo por sobrenadantes estériles de KA obtenidos en diferentes condiciones y adicionados al medio de cultivo en diferentes concentraciones. La mayor inhibición se logró con un sobrenadante obtenido por una fermentación de 32,5 horas a 37 °C, el cual disminuyó la tasa de crecimiento del hongo en estudio un 32 %. En ninguno de los casos hubo una inhibición completa del crecimiento. Los autores consideran que la reducción en el crecimiento fúngico se debió no sólo a la presencia de ácidos orgánicos sino también a otros metabolitos.

La diferencia con los resultados obtenidos en este trabajo, donde el tratamiento con KAS aumentó la biomasa de *A. flavus* con respecto al control sugiere la importancia de realizar los estudios de inhibición fúngica en el sustrato de estudio. El comportamiento de los contaminantes fúngicos frente a los compuestos presentes en el KAS podría cambiar dependiendo del contexto donde se produzca la interacción.

IV.5.3. Análisis de la comunidad microbiana del kefir de agua

Se realizó el análisis de la comunidad microbiana del KA mediante secuenciación masiva de las muestras de los mini-silos T1 antes y después de la incubación. Los resultados obtenidos mostraron que los filos predominantes en ambas muestras fueron Firmicutes y Proteobacteria. *Lactobacillus* y *Acetobacter* fueron los géneros más abundantes dentro de Firmicutes y Proteobacteria respectivamente. Lo mencionado anteriormente concuerda con lo obtenido por Fiorda et al. (2017) quienes analizaron y compararon la composición microbiana de los granos del kefir de agua y el de leche. *Lactobacillus* fue el género bacteriano más abundante en ambos tipos de granos mientras que *Acetobacter* fue encontrado en el kefir de agua y *Streptococcus* y *Pediococcus* en el kefir de leche. Estudios más recientes, analizaron por secuenciación masiva el KA obtenido por fermentación de diferentes soluciones azucaradas, y mostraron que los filos predominantes en todos los casos fueron Firmicutes y Proteobacteria (Gamba et al., 2021). Los autores encontraron que dentro del filo Firmicutes el género predominante fue *Lactobacillus*, siendo tres especies de *Lactobacillus*, *L. nagelii*, *L. hilgardii/diolivorans* y *L. casei/paracasei* las más abundantes en el sustrato fermentado. La abundancia de estas especies era diferente dependiendo el tipo de azúcar fermentado.

En el presente trabajo, 16 OTUs se asignaron al género *Lactobacillus*. Basándose en el árbol filogenético realizado las OTUs podrían asignarse a diferentes especies de *Lactobacillus*. La proporción de las OTUs predominantes difiere antes y después de la incubación. La OTU 18, que se agrupa con las especies de *L. nagelii* y *L. satsumensis*, fue la secuencia predominante en ambas

muestras, pre y post incubación, aumentando su proporción en las muestras post incubación. La OTU 9 cuya especie más cercana en el árbol filogenético es *L. harbinensis* también aumenta su proporción luego de la incubación, mientras que la OTU 15, la cual se relaciona con *L. capillatus* y *L. sucicola*, fue más abundante antes de la incubación. Finalmente, la proporción de la OTU 29, agrupada con el grupo de *L. casei/L. paracasei* mantiene su proporción estable en ambas muestras.

A pesar de que las OTUs más abundante se agruparon con las especies de *L. nagelii* y *L. satsumensis*, no se obtuvieron aislamientos de estas especies por métodos de cultivo.

Estudios como los de Zanirati et al. (2015) mostraron que *L. nagelii* y *L. hilgardii* se identificaron por métodos independientes de cultivo pero los mismos no pudieron identificarse por métodos dependientes de cultivo. Estos resultados son similares a los obtenidos en la presente tesis ya que las OTUs agrupadas con *L. nagelii* fueron las predominantes y sin embargo no fueron aisladas por métodos dependientes de cultivo. En el caso de *L. hilgardii* se agrupó con las OTU 14, siendo una OTU minoritaria, la cual tampoco se recuperó en medio de cultivo. Estas especies, *L. nagelii* y *L. hilgardii* se han descrito como especies claves en las comunidades de los gránulos de kefir de agua por su producción de exopolisacáridos (Fels et al., 2018).

La dificultad en la detección de diferencias morfológicas en las colonias correspondientes a diferentes especies de *Lactobacillus* puede haber sido la causa de no haber logrado el aislamiento de *L. nagelii*. De cualquier modo las discrepancias entre la detección lograda por métodos de secuenciación masiva y métodos de cultivo son frecuentes (Dissanayake et al., 2018; Garmendia et al., 2021; Kisand & Wikner, 2003; Stefani et al., 2015) y por ello se recomienda el uso de ambos métodos para poder aproximarse al conocimiento de la composición real de una comunidad microbiana (Gupta et al., 2019; Johnston et al., 2017).

En este trabajo se aislaron de los mini-silos T1 por métodos de cultivo las especies de *Lactobacillus L. ghanensis* y *L. paracasei*, aislamientos E1, ANRB1 y E2, ANRB2 antes y después de la incubación respectivamente. Estas especies también han sido aisladas previamente del kefir de agua en trabajos como los de Martínez-Torres et al. (2017) utilizando métodos dependientes de cultivo.

Por estos métodos se obtuvieron 4 aislamientos correspondientes a 2 especies, mientras que por secuenciación masiva se obtuvieron 16 OTUs asignadas al género *Lactobacillus*, las cuales se agruparon con secuencias correspondientes a aproximadamente 10 especies conocidas. Los resultados obtenidos por análisis de la secuenciación masiva muestran una comunidad microbiana mucho más compleja que lo que se obtiene por métodos de cultivo. Debe tenerse en cuenta que la región analizada por secuenciación masiva es pequeña y que las diferencias encontradas quizás no reflejen diferencias a nivel de especie. De cualquier modo, el agrupamiento

realizado da idea de la diversidad de la comunidad, por lo cual conociendo las posibles especies que pueden estar presentes se podrían extremar esfuerzos por obtener los aislamientos correspondientes.

La comunidad fúngica se vio representada por OTUs correspondientes a los géneros *Saccharomyces*. y *Pichia*, lo cual es concordante con los aislamientos obtenidos por métodos de cultivo (*S. cerevisiae* SC1, SC2 y *P. membranifaciens* PM1, PM2). Otras secuencias fúngicas también fueron identificadas por el análisis de secuenciación masiva, pero representaron una menor proporción del total de número de OTUs (2%) presentes antes de la incubación. OTUs asignadas a secuencias de *Aspergillus* no se encontraron en las muestras de los mini silos T1 analizados después de la incubación, lo que sugiere que la biomasa de *A. flavus* representaba una proporción muy pequeña de la biomasa fúngica en las muestras post incubación tratadas con el KA. Estos resultados no son sorprendentes ya que la concentración de levaduras en el sorgo después de la incubación aumentó tres órdenes mientras que la biomasa de *A. flavus* detectada por PCR en tiempo real fue muy baja.

Como se ha mencionado anteriormente, determinadas bacterias y levaduras del KA fueron capaces de crecer en silos de grano húmedo de sorgo en la fase aerobia. A excepción de *Gluconoacetobacter dulcium*, todos los microorganismos que se recuperaron mediante métodos dependientes de cultivo fueron anaerobios facultativos por lo cual su participación sería activa en la fase de fermentación del proceso de ensilado. Esta característica puede ser muy importante ya que los mismos podrían tener la misma acción antifúngica que tienen en la primera fase aeróbica en momentos donde el almacenamiento anaeróbico se interrumpa cuando la silo bolsa se abra o sufra roturas por factores externos (Borreani et al., 2018).

Las especies de bacterias y levaduras aisladas de los mini-silos T1 (tratados con KA) fueron las mismas antes y después de la incubación. Las bacterias se identificaron como *Lactobacillus* spp. y *Gluconoacetobacter* spp. Como se mencionó anteriormente las especies de *Lactobacillus* identificadas fueron *L. ghanensis* (E1 y E2) y *L. paracasei* (ANRB1 y ANRB2), mientras que las bacterias acéticas se identificaron como *G. dulcium* (AR2C1 y AR2C2). Los *Lactobacillus* identificados presentan un metabolismo homofermentativo, que como ya se comentó se caracterizan por ser rápidas y eficientes productoras de ácido láctico, lo cual es favorable para disminuir el pH del ensilaje. Por esta razón son ampliamente utilizados como inoculantes de silos (Muck et al., 2018).

Gluconoacetobacter dulcium pertenece al grupo de las bacterias ácido acéticas (Sombolestani et al., 2021), la misma también fue aislada de granos de maíz. Las bacterias ácido acéticas producen ácido acético como producto de su metabolismo el cual podría tener acción antifúngica y mejorar la estabilidad aeróbica (Ávila & Carvalho, 2020).

Solamente dos especies de levaduras fueron recuperadas en medios de cultivo de los mini silos T1 antes y después de la incubación, *Picha membranifaciens* y *Saccharomyces cerevisiae*. Ambas especies habían sido previamente aisladas de gránulos de kefir de agua (Gamba et al., 2019). *S. cerevisiae* se utiliza comúnmente como probiótico (Fernandez-Pacheco et al., 2018), mientras que *P. membranifaciens* ha sido seleccionada como un agente de control biológico para enfermedades fúngicas en varias matrices alimentarias. En particular, ha sido utilizada contra hongos patógenos poscosecha en frutas almacenadas en frío (Lutz et al., 2013; Santos et al., 2004).

Como se explicó en los aislamientos de silobolsas de grano húmedo de sorgo, las levaduras han sido consideradas un defecto en los silos dado que contribuyen al deterioro aeróbico por la asimilación del ácido láctico y consecuente aumento del pH. Sin embargo, en este trabajo se evidenció que los aislamientos de *P. membranifaciens* PM1 y PM2 no consumían lactato. Estos resultados sumados a los efectos benéficos de *S. cerevisiae* considerado como probiótico, y estudios que han mostrado que no afecta la estabilidad aeróbica en silos durante la fase de deterioro aeróbico, ni impacta en la población de *Lactobacillus* spp., ni en la calidad del silo (Duniere et al., 2015), sugieren que estas especies tienen características promisorias para integrar un inóculo mixto.

IV.5.4. Ensayos de control biológico en mini-silos a partir de inóculos seleccionados utilizando los aislamientos obtenidos del KA

Se estudiaron diferentes combinaciones de los microorganismos aislados del kefir de agua con el fin de obtener un inóculo mínimo capaz de inhibir el crecimiento de *A. flavus* en mini-silos de sorgo.

En este trabajo la selección del inóculo se realizó según la capacidad de inhibir el crecimiento del *A. flavus* en silos de grano húmedo de sorgo en la fase aerobia. Sin embargo, no hay que olvidar que el rol principal de adicionar un inoculante es para mejorar la fermentación y ayudar a alcanzar el éxito en la técnica del ensilaje. Por este motivo, la elección y la selección de la cepa o del conjunto de cepas que integran el inóculo es importante por el hecho de que el inoculante microbiano puede reducir la calidad del ensilado si el mismo no es adecuado para el proceso de fermentación (Carvalho et al., 2021). Por este motivo es importante que los aislamientos del KA sean similares a los aislados de silo bolsas de grano húmedo de sorgo, de forma de no alterar a la comunidad de microorganismos cuyos roles son importantes en este sistema.

Se realizaron diez tratamientos (T3-T13) con bacterias y/o levaduras aisladas del KA. Sólo tres tratamientos lograron disminuir significativamente el crecimiento de *A. flavus* en los mini-silos (T3, T5 y T12), siendo el T12 el que logró una inhibición del crecimiento igual a la obtenida con el KA en el tratamiento T1 (99%).

El crecimiento de *A. flavus* fue de 18% con respecto al control en presencia del inóculo de *S. cerevisiae* SC1 (T3). Esta inhibición podría deberse a una competencia por nutrientes o por espacio o a la producción de etanol (Duniere et al., 2015). La inhibición obtenida en el tratamiento 5, al inocular ambas levaduras aisladas del KA (*S. cerevisiae* SC1 y *Pichia membranifaciens* PM1), fue menor a la obtenida en el T3 (*S. cerevisiae* SC1) y no se observó una inhibición significativa del crecimiento en el T4 (*P. membranifaciens* T4). Estos resultados sugieren que la inhibición del crecimiento del hongo en estudio está dada por la cepa *S. cerevisiae* SC1, no viéndose favorecida la misma al agregar la cepa PM1. Una posible explicación podría ser que la levadura PM1 compita también por nutrientes con SC1, evitando que esta última pueda crecer de forma óptima inhibiendo al hongo contaminante. Sin embargo, los recuentos obtenidos mostraron que ambas levaduras crecían y aumentaban su número en un inóculo mixto con *Lactobacillus* sp. En otras palabras, ambas levaduras crecieron y se multiplicaron en mini-silos de grano húmedo de sorgo al inocularse juntas, por lo que la disminución en el biocontrol de *A. flavus* por *S. cerevisiae* SC1 no se debió a la imposibilidad de crecer en presencia de PM1.

Los tratamientos realizados combinando a las bacterias aisladas del KA (T6 y T7) no controlaron el crecimiento del hongo. A su vez, tampoco se logró biocontrol del crecimiento combinando las levaduras con las bacterias aisladas del KA (T8, T9, T10). En todos los casos el análisis de los recuentos mostró que estos aislamientos podían crecer en los mini-silos cuando se inoculaban en conjunto. Estos resultados mostraron que la falta de inhibición de *A. flavus* en este sistema no fue por la imposibilidad de crecer en el mismo. En estos inóculos mixtos, en donde *S. cerevisiae* SC1 estaba presente, tampoco hubo biocontrol por parte de este aislamiento. Esto podría explicarse por lo que postulan Stadie et al. (2013) quienes sugieren que en el co-cultivo de bacterias lácticas y levaduras se induciría la autólisis de las levaduras por acción de moléculas señal producidas por las bacterias. Estas señales modificarían la permeabilidad de la membrana de las levaduras provocando liberación del contenido celular el cual se utilizaría para el crecimiento de las bacterias lácticas. En su trabajo los autores reportaron que *Zygorhynchus florentina* y *S. cerevisiae* podían proveer a *L. nagelii* con aminácidos esenciales y a *L. hordei* con vitamina B6.

Dado que no se logró obtener el control del crecimiento de *A. flavus* con inóculos compuestos por los diferentes aislamientos del KA, se decidió estudiar la totalidad de los microorganismos que estaban presentes en el KA (T11). El ensayo mostró que no había diferencias en el crecimiento de *A. flavus* con el control realizado en agua. Estos resultados mostraron que no sólo los microorganismos presentes en el KA eran los responsables de la inhibición del crecimiento del hongo en estudio, sino que algún componente soluble del sobrenadante estaba involucrado. La hipótesis mencionada anteriormente surge de los resultados obtenidos del T11 y del T1, éste último

tratamiento fue utilizando kefir de agua, en donde *A. flavus* creció 1% con respecto al control en los mini-silos en fase aerobia.

Para poder estudiar la hipótesis propuesta se realizó el tratamiento T12 y T13. En estos tratamientos se combinaron todos los microorganismos aislados del KA antes de la incubación, los cuales fueron resuspendidos en solución de KA estéril liofilizado (T12) y en agua (T13). Efectivamente en el T12 se logró controlar el crecimiento de *A. flavus*, obteniendo un crecimiento de 1% como en los mini-silos T1. Sin embargo, este control no se observó para el T13.

Los resultados obtenidos con el T12 son relevantes ya que se logró recrear las propiedades inhibitorias del KA, con un inóculo definido. Es importante aclarar que en los ensayos de control biológico del presente trabajo las concentraciones utilizadas de los diferentes microorganismos en los inóculos fueron las encontradas en los mini-silos T1.

En la presente tesis se pudo recrear las propiedades inhibitorias del KA a partir de las cepas *L. ghanensis* E, *L. paracasei* ANRB, *G. dulcium* AR2C, *S. cerevisiae* SC1 y *P. membranifaciens* PM1 y compuestos solubles presentes en el sobrenadante del KA. Estos resultados son comparables a los obtenidos por Druvefors et al. (2005) en donde observaron que la adición de glucosa (10 g/L) aumentaba el biocontrol generado por *W. anomalus* J121 sobre *Penicillium roqueforti* en mini silos de grano húmedo de trigo incubados a 25 °C por 7 días. En los tratamientos que contenían *W. anomalus* J121 sin adición de glucosa, se observó un crecimiento débil de *P. roqueforti* que comenzó en el día cuatro y continuó hasta el final de la incubación. Sin embargo, los tratamientos que contenían *W. anomalus* J121 con adición de 10 g/L de glucosa no mostraron un aumento significativo en el crecimiento de este hongo. Los autores señalan con firmeza que el incremento en el efecto antifúngico se debe a los productos obtenidos del metabolismo del azúcar. Algunos de los candidatos que sugieren pueden estar involucrados son acetato de etilo, etanol, acetato, arabitol, glicerol o varias combinaciones de estos productos (Druvefors et al., 2005).

En esta tesis se lograron obtener las propiedades inhibitorias del kefir a partir de compuestos solubles en el KAS y microorganismos aislados con concentración definida. Se necesitan más estudios para conocer los compuestos solubles del kefir de agua que están involucrados en el biocontrol. Además, se deberán realizar futuros estudios para conocer si en presencia del kefir de agua liofilizado se puede reducir el consorcio microbiano de forma de obtener un inóculo mínimo que logre inhibir con la misma eficiencia el crecimiento del *A. flavus* en los mini-silos de sorgo. De todas formas, es poco probable reducir el inóculo mínimo a un microorganismo ya que es difícil que el mismo tenga todas las características deseadas para aumentar la calidad del silo (Ávila & Carvalho, 2020). Según los resultados obtenidos en la presente tesis se sugiere por lo menos un inóculo mínimo integrado por una especie de *Lactobacillus* y una levadura. *Lactobacillus* sp. generaría un rápido descenso de pH y podría producir diferentes compuestos antifúngicos como

ácido feniláctico (Yoo et al., 2016), peróxido de hidrógeno, reuterina (Gerez et al., 2013; Magnusson & Schnürer, 2001), ácidos grasos, dipéptidos cíclicos (Ryu et al., 2014); mientras que la levaduras competiría por el oxígeno y podría producir compuestos antifúngicos solubles y volátiles (Arrarte et al., 2017; Druvefors & Schnürer, 2005; Passoth et al., 2006).

Los resultados obtenidos en el presente trabajo son de relevancia ya que en Uruguay no hay desarrollado un inoculante de silos de grano húmedo de sorgo nacional. De hecho el mercado que lidera los aditivos para ensilaje es el mercado Europeo (Fabiszewska et al., 2019). Los resultados obtenidos en esta tesis son promisorios para el desarrollo de un inoculante de silos de grano húmedo de sorgo nacional.

V. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

V. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

En el presente trabajo se evidenció la necesidad de controlar al *Aspergillus flavus* en la fase aerobia del ensilado de grano húmedo de sorgo. Esta fase puede durar hasta 72 horas y en este tiempo la producción de AFB1 puede exceder el límite permitido por la reglamentación si las condiciones de temperatura son adecuadas. A su vez, se destaca la necesidad de partir de buenas condiciones de higiene del material a ensilar ya que si *A. flavus* está presente en el mismo, es alta la probabilidad de presencia de AFB1 en el silo.

Aunque la técnica de ensilaje se realizara correctamente es necesario adicionar aditivos para inhibir el desarrollo de *A. flavus* en la fase aerobia y la concomitante producción de AFB1.

Los inoculantes microbianos de cuarta generación se presentan como una opción promisoriosa para el control de *A. flavus* en este sistema. En la presente tesis se logró definir un inóculo mixto con microorganismos y compuestos solubles presentes en el kefir de agua que inhibieron el crecimiento de *A. flavus* en presencia de oxígeno en mini-silos de grano húmedo de sorgo.

Como perspectivas del trabajo se deberá estudiar al kefir de agua estéril para conocer los compuestos que están implicados en el biocontrol de este hongo y sus concentraciones, de forma de adicionarlos al inóculo. A su vez se deberá optimizar el inóculo definido y sus concentraciones de forma de generar un inóculo mínimo. Esta composición (microorganismos y compuestos solubles) deberá ser ensayada en condiciones de entrada de aire y en condiciones de anaerobiosis en el mini-silo para comparar su efectividad en ambos casos. Es importante que la inhibición se realice en las condiciones de un correcto ensilaje pero también en condiciones de presencia de oxígeno, ya que esta composición de microorganismos y compuestos solubles también podría ser útil para inhibir el crecimiento del hongo ante la posible rotura del silobolsa.

Finalmente, una vez optimizada la composición de inóculo y compuestos solubles del kefir de agua, se estudiarán las propiedades del ensilado para determinar si el mismo cumple con los parámetros de calidad establecidos. Si se obtienen buenos parámetros de calidad se debería pensar en escalar a un modelo de mayor tamaño en el campo para seguir comprobando las propiedades de los microorganismos junto a los compuestos solubles seleccionados.

Dado que los inoculantes de silos de grano húmedo que se utilizan en nuestro país son importados, es importante destacar que en la presente tesis se realizaron los primeros estudios para poder desarrollar un inoculante nacional de silos de grano húmedo de sorgo.

VI. BIBLIOGRAFÍA

VI. BIBLIOGRAFÍA

- Abarenkov, K., Henrik Nilsson, R., Larsson, K.H., Alexander, I. J., Eberhardt, U., Erland, S., Høiland, K., Kjølner, R., Larsson, E., Pennanen, T., Sen, R., Taylor, A. F. S., Tedersoo, L., Ursing, B. M., Vrålstad, T., Liimatainen, K., Peintner, U., & Kõljalg, U. (2010). The UNITE database for molecular identification of fungi - recent updates and future perspectives. *New Phytologist*, *186*(2), 281–285.
- Abdolshahi, A., Marvdashti, L. M., Salehi, B., Sharifi-Rad, M., Ghobakhloo, S., Iriti, M., & Sharifi-Rad, J. (2019). Antifungal activities of coating incorporated with *Saccharomyces cerevisiae* cell wall mannoprotein on *Aspergillus flavus* growth and aflatoxin production in pistachio (*Pistacia vera* L.). *Journal of Food Safety*, *39*(2), e12608.
- Addah, W., Baah, J., Okine, E. K., & McAllister, T. A. (2012). A third-generation esterase inoculant alters fermentation pattern and improves aerobic stability of barley silage and the efficiency of body weight gain of growing feedlot cattle. *Journal of Animal Science*, *90*(5), 1541–1552.
- Agarussi, M. C. N. (2019). *Novel lactic acid bacteria strains as inoculant for alfalfa and corn silages and microbiome of rehydrated corn and sorghum grain silages* [Universidade Federal de Viçosa]. <https://locus.ufv.br/handle/123456789/26151>
- Aldars-García, L., Ramos, A. J., Sanchis, V., & Marín, S. (2016). Modeling postharvest mycotoxins in foods: recent research. In *Current Opinion in Food Science*, *11*, 46-50.
- Alonso, V. A., Pereyra, C. M., Keller, L. A. M., Dalcerro, A. M., Rosa, C. A. R., Chiacchiera, S. M., & Cavaglieri, L. R. (2013). Fungi and mycotoxins in silage: an overview. *Journal of Applied Microbiology*, *115*(3), 637–643.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, *215*(3), 403–410.
- AOAC International. (2005). *Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL* (W. Horwitz & G. Latimer (eds.); 18th ed.
- Arrarte, E., Garmendia, G., Rossini, C., Wisniewski, M., & Vero, S. (2017). Volatile organic compounds produced by Antarctic strains of *Candida sake* play a role in the control of postharvest pathogens of apples. *Biological Control*, *109*, 14–20.
- Arrarte, E., Garmendia, G., Wisniewski, M., & Vero, S. (2021). Biocontrol activity of *Debaryomyces hansenii* against blue mold on apple and pear during cold storage. *Agrociencia Uruguay*, (*in press*).
- Arroyo, F. N., Durán Quintana, M. C., & Garrido Fernández, A. (2005). Evaluation of primary models to describe the growth of *Pichia anomala* and study of temperature, NaCl, and pH effects on its biological parameters by response surface methodology. *Journal of Food Protection*, *68*(3), 562–570.
- Astoreca, A., Vaamonde, G., Dalcerro, A., Marin, S., & Ramos, A. (2014). Abiotic factors and their interactions influence on the co-production of aflatoxin B(1) and cyclopiazonic acid by *Aspergillus flavus* isolated from corn. *Food Microbiology*, *38*, 276–283.
- Auerbach, H., Oldenburg, E., & Weissbach, F. (1998). Incidence of *Penicillium roqueforti* and *roquefortine C* in silages. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *76*(4), 565–572.
- Ávila, C. L. S., & Carvalho, B. F. (2020). Silage fermentation-updates focusing on the performance of micro-organisms. *Journal of Applied Microbiology*, *128*(4), 966–984.

- Bartaburu, D. (2003). Ensilaje de grano húmedo. Fundamentos básicos y aspectos prácticos a tener en cuenta. *Revista Plan Agropecuario*, N° 105, 36–39.
- Bartosik, R. (2012). An inside look at the silo-bag system. In *Proc 9th. Int. Conf. on Controlled Atmosphere and Fumigation in Stored Products*.
- Basilio, D., & Orihuela, J. J. (2012). *DINÁMICA DE LOS TANINOS CONDESADOS EN CUATRO GENOTIPOS DE SORGO Y SU EFECTO EN EL TIEMPO Y EL DESARROLLO FÚNGICO*. Facultad de Veterinaria, UdelaR.
- Battilani, P., Rossi, V., Giorni, P., Pietri, A., Gualla, A., Fels-Klerx, H. J. van der, Booij, C. J. H., Moretti, A., Logrieco, A., Miglietta, F., Toscano, P., Miraglia, M., Santis, B. De, & Brera, C. (2012). Modelling, predicting and mapping the emergence of aflatoxins in cereals in the EU due to climate change. *EFSA Supporting Publications*, 9(1), 1–172.
- Bernardes, T. F., Daniel, J. L. P., Adesogan, A. T., McAllister, T. A., Drouin, P., Nussio, L. G., Huhtanen, P., Tremblay, G. F., Bélanger, G., & Cai, Y. (2018). Silage review: Unique challenges of silages made in hot and cold regions. *Journal of Dairy Science*, 101(5), 4001–4019.
- Bhatnagar-Mathur, P., Sunkara, S., Bhatnagar-Panwar, M., Waliyar, F., & Sharma, K. K. (2015). Biotechnological advances for combating *Aspergillus flavus* and aflatoxin contamination in crops. *Plant Science*, 234, 119–132.
- Bjornberg, A., & Schnurer, J. (1993). Inhibition of the growth of grain-storage molds in vitro by the yeast *Pichia anomala* (Hansen) Kurtzman. *Canadian Journal of Microbiology*, 39(6), 623–628.
- Borreani, G., Tabacco, E., Schmidt, R. J., Holmes, B. J., & Muck, R. E. (2018). Silage review: Factors affecting dry matter and quality losses in silages. *Journal of Dairy Science*, 101(5), 3952–3979.
- Cankar, K., Stebih, D., Dreo, T., Zel, J., & Gruden, K. (2006). Critical points of DNA quantification by real-time PCR--effects of DNA extraction method and sample matrix on quantification of genetically modified organisms. In *BMC Biotechnol* (Vol. 6).
- Capelli, A., Suárez, G., García y Santos, C., Capelli, A., Suárez, G., & García y Santos, C. (2019). Aflatoxinas en alimentos y leche de vacas de 18 establecimientos comerciales de las regiones centro-sur y este de Uruguay. *Veterinaria (Montevideo)*, 55(212), 52–56.
- Caporaso, J. G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F. D., Costello, E. K., Fierer, N., Peña, A. G., Goodrich, J. K., Gordon, J. I., Huttley, G. A., Kelley, S. T., Knights, D., Koenig, J. E., Ley, R. E., Lozupone, C. A., McDonald, D., Muegge, B. D., Pirrung, M., Knight, R. (2010). QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature Methods*, 7(5), 335–336.
- Caro Vélez, C. A., & León Pelaez, Á. M. (2014). Inhibición del crecimiento de *Aspergillus ochraceus* mediante “panela” fermentada con gránulos de kefir de agua. *Vitae*, 21(3), 191–200.
- Carr, F. J., Chill, D., & Maida, N. (2002). The Lactic Acid Bacteria: A Literature Survey. *Critical Reviews in Microbiology*, 28(4), 281–370.
- Carvalho, B. F., Sales, G. F. C., Schwan, R. F., & Ávila, C. L. S. (2021). Criteria for lactic acid bacteria screening to enhance silage quality. *Journal of Applied Microbiology*, 130(2), 341–355.
- Cavallarin, L., Tabacco, E., Antoniazzi, S., & Borreani, G. (2011). Aflatoxin accumulation in whole crop maize silage as a result of aerobic exposure. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91(13), 2419–2425.
- Chalkling, D. (2004). *Problemática del almacenaje de granos con humedades intermedias*. INIA. <http://www.inia.uy/Publicaciones/Paginas/publicacion-1603.aspx>
- Chalkling, D. (2016). *Ensilaje De Grano Húmedo*. INIA.

- http://www.inia.org.uy/estaciones/la_estanzuela/actividades/silos/g_humedos_08.pdf
- Chalking, D., & Brasesco, R. (2003). *ENSILAJE DE GRANO HÚMEDO: UNA ALTERNATIVA PROMISORIA*. Plan Agropecuario. <https://www.produccion-animal.com.ar/>
- Char, C., Guerrero, S., & Alzamora, S. (2005). Growth Response of *Eurotium chevalieri*, *Aspergillus fumigatus* and *Penicillium brevicompactum* in Argentine Milk Jam. *Food Science and Technology International - FOOD SCI TECHNOL INT*, 11, 297–305.
- Cheli, F., Campagnoli, A., & Dell’Orto, V. (2013). Fungal populations and mycotoxins in silages: From occurrence to analysis. *Animal Feed Science and Technology*, 183(1–2), 1–16.
- Chiossone, J., Vicini, R., & Ondo, S. (2011). *Silaje de Sorgo*. INTA-EEA Saenz Peña-Extension Ganadera. https://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-inta-silaje_de_sorgo.pdf
- CRL-GMFF. (2008). *Report on the Validation of a DNA Extraction Method for Maize Seeds and Grains* (Issue October). Community Reference Laboratory for GM Food and Feed European Commission.
- Dagnas, S., Onno, B., Membré, J.M. (2014). Modeling growth of three bakery product spoilage molds as a function of water activity, temperature and pH. *International Journal of Food Microbiology*, 1(186), 95-104.
- De la Roza, B. (2005). El ensilado en zonas húmedas y sus indicadores de calidad. *IV Jornadas de Alimentación Animal.*, 1–120.
- De María, Pablo; Mauris, V. S. J. (2017). *Manual Práctico Micotoxinas en ganado lechero*. Sitio Argentino de Producción Animal. https://www.produccion-animal.com.ar/sanidad_intoxicaciones_metabolicos/Micotoxicosis/57-Manual_Practico.pdf
- del Palacio, A., Mionetto, A., Bettucci, L., & Pan, D. (2016). Evolution of fungal population and mycotoxins in sorghum silage. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 33(12), 1864–1872.
- del Palacio, A., & Pan, D. (2020). Occurrence and toxigenic potential of *Aspergillus* section *Flavi* on wheat and sorghum silages in Uruguay. *Mycology*, 11(2), 147–157.
- Di Rienzo, J. A., Casanoves, F., Balzarini, M. G., Gonzalez, L., Tablada, M., & Robledo, C. W. (2008). *InfoStat, versión 2008*. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Dissanayake, A. J., Purahong, W., Wubet, T., Hyde, K. D., Zhang, W., Xu, H., Zhang, G., Fu, C., Liu, M., Xing, Q., Li, X., & Yan, J. (2018). Direct comparison of culture-dependent and culture-independent molecular approaches reveal the diversity of fungal endophytic communities in stems of grapevine (*Vitis vinifera*). *Fungal Diversity*, 90(1), 85–107.
- Dogi, C. A., Armando, R., Ludueña, R., de Moreno de LeBlanc, A., Rosa, C. A. R., Dalcerro, A., & Cavaglieri, L. (2011). *Saccharomyces cerevisiae* strains retain their viability and aflatoxin B1 binding ability under gastrointestinal conditions and improve ruminal fermentation. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 28(12), 1705–1711.
- Dong-Hyeon, K., Jung-Whan, C., Hyunsook, K., & Kun-Ho, S. (2015). Modulation of intestinal microbiota in mice by kefir administration. *Food Science and Biotechnology*, 24(4), 1397–1403.
- Droby, S., & Wisniewski, M. (2018). The fruit microbiome: A new frontier for postharvest biocontrol and postharvest biology. *Postharvest Biology and Technology*, 140, 107–112.
- Druvefors, U., Passoth, V., & Schnürer, J. (2005). Nutrient effects on biocontrol of *Penicillium roqueforti* by *Pichia anomala* J121 during airtight storage of wheat. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(4), 1865–1869.
- Druvefors, U., & Schnürer, J. (2005). Mold-inhibitory activity of different yeast species during airtight storage of wheat grain. *FEMS Yeast Research*, 5(4–5), 373–378.

- Duniere, L., Jin, L., Smiley, B., Qi, M., Rutherford, W., Wang, Y., & McAllister, T. (2015). Impact of adding *Saccharomyces* strains on fermentation, aerobic stability, nutritive value, and select lactobacilli populations in corn silage. *Journal of Animal Science*, *93*(5), 2322–2335.
- Dunière, L., Sindou, J., Chaucheyras-Durand, F., Chevallier, I., & Thévenot-Sergentet, D. (2013). Silage processing and strategies to prevent persistence of undesirable microorganisms. *Animal Feed Science and Technology*, *182*(1), 1–15.
- Edgar, R. C. (2010). Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics*, *26*(19), 2460–2461.
- Esser, D., Leveau, J., Meyer, K. (2015). Modeling microbial growth and dynamics. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *99*(21), 8831-8846.
- Eugui, E., Almquist, S., Muller, C., & Allison, A. (1991). Lymphocyte-Selective Cytostatic and Immunosuppressive Effects of Mycophenolic Acid in Vitro: Role of Deoxyguanosine Nucleotide Depletion. *Scandinavian Journal of Immunology*, *33*(2), 161–173.
- Fabiszewska, A. U., Zielińska, K. J., & Wróbel, B. (2019). Trends in designing microbial silage quality by biotechnological methods using lactic acid bacteria inoculants: a minireview. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *35*(5), 76.
- FAO. (2003). Reglamentosa nivel mundial para las micotoxinas en los alimentos y en las raciones en el año 2003. *ESTUDIO FAO ALIMENTACIÓN Y NUTRICIÓN. ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA AGRICULTURA Y LA ALIMENTACIÓN*, *81*.
- Fels, L., Jakob, F., Vogel, R. F., & Wefers, D. (2018). Structural characterization of the exopolysaccharides from water kefir. *Carbohydrate Polymers*, *189*, 296-303.
- Fernandez-Pacheco, P., Arévalo-Villena, M., Bevilacqua, A., Corbo, M. R., & Briones Pérez, A. (2018). Probiotic characteristics in *Saccharomyces cerevisiae* strains: Properties for application in food industries. *LWT*, *97*, 332-340.
- Ferrero, F., Prencipe, S., Spadaro, D., Gullino, M. L., Cavallarin, L., Piano, S., Tabacco, E., & Borreani, G. (2019). Increase in aflatoxins due to *Aspergillus* section Flavi multiplication during the aerobic deterioration of corn silage treated with different bacteria inocula. *Journal of Dairy Science*, *102*(2), 1176–1193.
- Fiorda, F. A., de Melo Pereira, G. V., Thomaz-Soccol, V., Rakshit, S. K., Pagnoncelli, M. G. B., Vandenberghe, L. P. de S., & Soccol, C. R. (2017). Microbiological, biochemical, and functional aspects of sugary kefir fermentation - A review. *Food Microbiology*, *66*, 86–95.
- Forsythe, S. J., & Hayes, P. R. (2000). Food spoilage. In *Food Hygiene, Microbiology and HACCP* (pp. 86–149). Springer US.
- Frisvad, J. C., Hubka, V., Ezekiel, C. N., Hong, S. B., Nováková, A., Chen, A. J., Arzanlou, M., Larsen, T. O., Sklenář, F., Mahakarnchanakul, W., Samson, R. A., & Houbraken, J. (2019). Taxonomy of *Aspergillus* section Flavi and their production of aflatoxins, ochratoxins and other mycotoxins. *Studies in Mycology*, *93*, 1–63.
- Gamba, R. R., Koyanagi, T., Peláez, A. L., De Antoni, G., & Enomoto, T. (2021). Changes in Microbiota During Multiple Fermentation of Kefir in Different Sugar Solutions Revealed by High-Throughput Sequencing. *Current Microbiology*, *78*(6), 2406–2413.
- Gamba, R. R., Yamamoto, S., Sasaki, T., Michihata, T., Mahmoud, A.-H., Koyanagi, T., & Enomoto, T. (2019). Microbiological and Functional Characterization of Kefir Grown in Different Sugar Solutions. *Food Science and Technology Research*, *25*(2), 303–312.
- Garcia, D., Ramos, A. J., Sanchis, V., & Marín, S. (2013). Modeling kinetics of aflatoxin production by *Aspergillus flavus* in maize-based medium and maize grain. *International Journal of Food*

- Microbiology*, 162(2), 182–189.
- Garmendia, G., Alvarez, A., Villarreal, R., Martínez-Silveira, A., Wisniewski, M., & Vero, S. (2021). Fungal diversity in the coastal waters of King George Island (maritime Antarctica). *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 37(8), 142.
- Gerez, C., J. Torres, M., Valdez, G., & Rollán, G. (2013). Control of spoilage fungi by lactic acid bacteria. *Biological Control*, vol.64, 231–237.
- Ghali, R., Belouaer, I., Hdiri, S., Ghorbel, H., Maaroufi, K., & Hedilli, A. (2009). Simultaneous HPLC determination of aflatoxins B1, B2, G1 and G2 in Tunisian sorghum and pistachios. *Journal of Food Composition and Analysis*, 22(7–8), 751–755.
- Ghali, R., Hmaissia-khlifa, K., Ghorbel, H., Maaroufi, K., & Hedili, A. (2008). Incidence of aflatoxins, ochratoxin A and zearalenone in tunisian foods. *Food Control*, 19(9), 921–924.
- Giorni, P., Battilani, P., Pietri, A., & Magan, N. (2008). Effect of aw and CO2 level on *Aspergillus flavus* growth and aflatoxin production in high moisture maize post-harvest. *International Journal of Food Microbiology*, 122(1), 109–113.
- Gizachew, D., Chang, C.-H., Szonyi, B., De La Torre, S., & Ting, W. E. (2019). Aflatoxin B1 (AFB1) production by *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* on ground Nyjer seeds: The effect of water activity and temperature. *International Journal of Food Microbiology*, 296, 8–13.
- GMP. (2019). “Specific Feed Safety Limits” GMP+ BA 1. GMP+ Feed Certification scheme. *GMP+ International B.V., Version EN*, 1–87.
- Gonda, M., Garmendia, G., Rufo, C., Peláez, Á. L., Wisniewski, M., Droby, S., & Vero, S. (2019). Biocontrol of *Aspergillus flavus* in Ensiled Sorghum by Water Kefir Microorganisms. *Microorganisms*, 7(8), 253.
- González Pereyra, M. L., Alonso, V. A., Sager, R., Morlaco, M. B., Magnoli, C. E., Astoreca, A. L., Rosa, C. A. R., Chiacchiera, S. M., Dalcerro, A. M., & Cavaglieri, L. R. (2008). Fungi and selected mycotoxins from pre- and postfermented corn silage. *Journal of Applied Microbiology*, 104(4), 1034–1041.
- Gourama, H., & Bullerman, L. B. (1995). *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*: Aflatoxigenic Fungi of Concern in Foods and Feeds†: A Review. *Journal of Food Protection*, 58(12), 1395–1404.
- Guan, H., Ke, W., Yan, Y., Shuai, Y., Li, X., Ran, Q., Yang, Z., Wang, X., Cai, Y., & Zhang, X. (2020). Screening of natural lactic acid bacteria with potential effect on silage fermentation, aerobic stability and aflatoxin B1 in hot and humid area. *Journal of Applied Microbiology*, 128(5), 1301–1311.
- Gulitz, A., Stadie, J., Wenning, M., Ehrmann, M. A., & Vogel, R. F. (2011). The microbial diversity of water kefir. *International Journal of Food Microbiology*, 151(3), 284–288.
- Gupta, J. K., Tyagi, B., Rathour, R., & Thakur, I. S. (2019). Microbial Treatment of Waste by Culture-Dependent and Culture-Independent Approaches: Opportunities and Challenges. *Microbial Diversity in Ecosystem Sustainability and Biotechnological Applications*.
- Guzel-Seydim, Z. B., Gökırmaklı, Ç., & Greene, A. K. (2021). A comparison of milk kefir and water kefir: Physical, chemical, microbiological and functional properties. *Trends in Food Science & Technology*, 113, 42–53.
- Guzel-Seydim, Z. B., Kok-Tas, T., Greene, A. K., & Seydim, A. C. (2011). Review: Functional Properties of Kefir. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51(3), 261–268.
- Hemmert, G. A. J., Schons, L. M., Wieseke, J., & Schimmelpfennig, H. (2016). Log-likelihood-based

- Pseudo-R² in Logistic Regression: Deriving Sample-sensitive Benchmarks. *Sociological Methods & Research*, 47(3), 507–531.
- Hogg, J. C., & Lehane, M. J. (1999). Identification of bacterial species associated with the sheep scab mite (*Psoroptes ovis*) by using amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(9), 4227–4229.
- IARC. (2002). *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*. WORLD HEALTH ORGANIZATION. INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol83/mono83-1.pdf>
- INUMET. (2019). *Climatología del otoño (mar-abr-may) en Uruguay 1981-2010*. <https://www.inumet.gub.uy/sites/default/files/2020-03/climatologia-otono-2019.pdf>
- Ioannidis, A., Kogkaki, E., Natskoulis, P., Nychas, G., Panagou, E. (2015). Modelling the influence of temperature, water activity and sodium metabisulphite on the growth and OTA production of *Aspergillus carbonarius* isolated from Greek wine grapes. *Food Microbiology*, 49, 12-22
- Irigoyen, A., & Perrachon, J. (2002). Sorgo granífero. *Revista Del Plan Agropecuario*, N 123, 52–55.
- Johnston, D., Earley, B., Cormican, P., Murray, G., Kenny, D. A., Waters, S. M., McGee, M., Kelly, A. K., & McCabe, M. S. (2017). Illumina MiSeq 16S amplicon sequence analysis of bovine respiratory disease associated bacteria in lung and mediastinal lymph node tissue. *BMC Veterinary Research*, 13(1), 118.
- Jonsson, A., & Pahlow, G. (1984). *Systematic classification and biochemical characterization of yeast growing in grass silage inoculated with lactobacillus cultures*.
- Keller, L. A. M., González Pereyra, M. L., Keller, K. M., Alonso, V. A., Oliveira, A. A., Almeida, T. X., Barbosa, T. S., Nunes, L. M. T., Cavaglieri, L. R., & Rosa, C. A. R. (2013). Fungal and mycotoxins contamination in corn silage: Monitoring risk before and after fermentation. *Journal of Stored Products Research*, 52, 42–47.
- Keller, L., PEREYRA, C. M., Cavaglieri, L., Keller, K., ALMEIDA, T. X., DEVEZA, M. V, ASSAD, R. Q., & Rocha ROSA, C. (2012). Fungi and aflatoxin B1 in pre and post fermented sorghum trench type silos destined to bovine intensive-rearing in Brazil. In *Revista Bio Ciencias Sistema Nacional de Investigadores (CONACyT-México ISSN 2007-3380)* (Vol. 2).
- Kisand, V., & Wikner, J. (2003). Combining Culture-Dependent and -Independent Methodologies for Estimation of Richness of Estuarine Bacterioplankton Consuming Riverine Dissolved Organic Matter. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(6), 3607–3616.
- Klich, M. A. (2007). *Aspergillus flavus*: the major producer of aflatoxin. *Molecular Plant Pathology*, 8(6), 713–722.
- Kung, L., Shaver, R. D., Grant, R. J., & Schmidt, R. J. (2018). Silage review: Interpretation of chemical, microbial, and organoleptic components of silages. *Journal of Dairy Science*, 101(5), 4020–4033.
- Kurtzman, C. P. (2011a). Recognition of yeast species from gene sequence comparisons. *The Open Applied Informatics Journal*, 5, 20-29.
- Kurtzman, C. P. (2011b). Phylogeny of the ascomycetous yeasts and the renaming of *Pichia anomala* to *Wickerhamomyces anomalus*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 99(1), 13–23.
- Kwok, L. (2014). Lactic Acid Bacteria and the Human Gastrointestinal Tract. In H. Zhang & Y. Cai (Eds.), *Lactic Acid Bacteria. Fundamentals and Practice* (pp. 375–442). Springer.
- Lahouar, A., Crespo-Sempere, A., Marín, S., Saïd, S., & Sanchis, V. (2015). Toxigenic molds in Tunisian and Egyptian sorghum for human consumption. In *Journal of Stored Products*

- Research*, 63, 57-62.
- Lahouar, A., Jedidi, I., Sanchis, V., & Saïd, S. (2018). Aflatoxin B1, ochratoxin A and zearalenone in sorghum grains marketed in Tunisia. *Food Additives & Contaminants: Part B*, 11(2), 103–110.
- Lahouar, A., Marin, S., Crespo-Sempere, A., Saïd, S., & Sanchis, V. (2016). Effects of temperature, water activity and incubation time on fungal growth and aflatoxin B1 production by toxinogenic *Aspergillus flavus* isolates on sorghum seeds. *Revista Argentina de Microbiología*, 48(1), 78–85.
- Laureys, D., Aerts, M., Vandamme, P., & De Vuyst, L. (2018). Oxygen and diverse nutrients influence the water kefir fermentation process. *Food Microbiology*, 73, 351–361.
- Laureys, D., Aerts, M., Vandamme, P., & De Vuyst, L. (2019). The Buffer Capacity and Calcium Concentration of Water Influence the Microbial Species Diversity, Grain Growth, and Metabolite Production During Water Kefir Fermentation. *Frontiers in Microbiology*, 10, 2876.
- Laureys, D., Cnockaert, M., De Vuyst, L., & Vandamme, P. (2016). Bifidobacterium aquikefiri sp. nov., isolated from water kefir. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66(3), 1281–1286.
- Laureys, D., & De Vuyst, L. (2014). Microbial species diversity, community dynamics, and metabolite kinetics of water Kefir fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(8), 2564–2572.
- Lee, S., Yoon, Y., Kim, D. M., Kim, D. S., Park, K. H., & Chun, H. S. (2014). Mathematical models to predict kinetic behavior and aflatoxin production of *Aspergillus flavus* under various temperature and water activity conditions. *Food Science and Biotechnology*, 23(3), 975–982.
- Lesins, K., & Schulz, F. H. (1968). Some effects of bacterial inoculation on silage making. *Canadian Journal of Animal Science*, 48, 15–25.
- Lundberg, D. S., Yourstone, S., Mieczkowski, P., Jones, C. D., & Dangl, J. L. (2013). Practical innovations for high-throughput amplicon sequencing. *Nature Methods*, 10(10), 999–1002.
- Lutz, M. C., Lopes, C. A., Rodriguez, M. E., Sosa, M. C., & Sangorrín, M. P. (2013). Efficacy and putative mode of action of native and commercial antagonistic yeasts against postharvest pathogens of pear. *International Journal of Food Microbiology*, 164(2), 166–172.
- Luz, C., Ferrer, J., Mañes, J., & Meca, G. (2018). Toxicity reduction of ochratoxin A by lactic acid bacteria. *Food and Chemical Toxicology*, 112, 60–66.
- Lynch, K. M., Wilkinson, S., Daenen, L., & Arendt, E. K. (2021). An update on water kefir: Microbiology, composition and production. *International Journal of Food Microbiology*, 345, 109128.
- Ma, Z. X., Amaro, F. X., Romero, J. J., Pereira, O. G., Jeong, K. C., & Adesogan, A. T. (2017). The capacity of silage inoculant bacteria to bind aflatoxin B1 in vitro and in artificially contaminated corn silage. *Journal of Dairy Science*, 100(9), 7198–7210.
- Madigan, Bender, Buckley, Sattley, & Stahl. (2019). *Brock Biology of Microorganisms* 15th Edition. Pearson Education.
- Magnusson, J., & Schnürer, J. (2001). *Lactobacillus coryniformis* subsp. coryniformis Strain Si3 Produces a Broad-Spectrum Proteinaceous Antifungal Compound. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(1), 1–5.
- Magnusson, J., & Schnürer, J. (2005). Antifungal lactic acid bacteria as biopreservatives. *Trends in Food Science & Technology*, 16(1), 70–78.
- Marchese, S., Polo, A., Ariano, A., Velotto, S., Costantini, S., & Severino, L. (2018). Aflatoxin B1 and M1: Biological Properties and Their Involvement in Cancer Development. *Toxins*, 10(6).

- Marín, S., Bellí, N., Lasram, S., Chebil, S., Ramos, A. J., Ghorbel, A., & Sanchis, V. (2006). Kinetics of Ochratoxin A Production and Accumulation by *Aspergillus carbonarius* on Synthetic Grape Medium at Different Temperature Levels. *Journal of Food Science*, 71(6), M196–M200.
- Marsh, A. J., O'Sullivan, O., Hill, C., Ross, R. P., & Cotter, P. D. (2013). Sequence-based analysis of the microbial composition of water kefir from multiple sources. *FEMS Microbiology Letters*, 348(1), 79–85.
- Martínez-Torres, A., Gutiérrez-Ambrocio, S., Heredia-del-Orbe, P., Villa-Tanaca, L., & Hernández-Rodríguez, C. (2017). Inferring the role of microorganisms in water kefir fermentations. *International Journal of Food Science & Technology*, 52(2), 559–571.
- Martinez, A., Cavello, I., Garmendia, G., Rufo, C., Cavalitto, S., & Vero, S. (2016). Yeasts from sub-Antarctic region: biodiversity, enzymatic activities and their potential as oleaginous microorganisms. *Extremophiles*, 20(5), 759–769.
- McAllister, T. A., Beauchemin, K. A., Alazzeh, A. Y., Baah, J., Teather, R. M., & Stanford, K. (2011). Review: The use of direct fed microbials to mitigate pathogens and enhance production in cattle. *Canadian Journal of Animal Science*, 91(2), 193–211.
- McDonald, P., Edwards, R. A., Greenhalgh, J. F. D., Morgan, C. A., Sinclair, L. A., & Wilkinson, R. G. (2011). *Animal Nutrition* 7th Edition. Pearson.
- McDonald, P., Henderson, A. ., & Heron, S. J. (1991). *The Biochemistry of Silage* 2nd Edition. Chalcombe Publications.
- Muck, R. E., Nadeau, E. M. G., McAllister, T. A., Contreras-Govea, F. E., Santos, M. C., & Kung, L. (2018). Silage review: Recent advances and future uses of silage additives. *Journal of Dairy Science*, 101(5), 3980–4000.
- Naser, S. M., Dawyndt, P., Hoste, B., Gevers, D., Vandemeulebroecke, K., Cleenwerck, I., Vancanneyt, M., & Swings, J. (2007). Identification of lactobacilli by pheS and rpoA gene sequence analyses. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57(12), 2777–2789.
- Naser, S. M., Thompson, F. L., Hoste, B., Gevers, D., Dawyndt, P., Vancanneyt, M., & Swings, J. (2005). Application of multilocus sequence analysis (MLSA) for rapid identification of *Enterococcus* species based on rpoA and pheS genes. *Microbiology (Reading, England)*, 151(Pt 7), 2141–2150.
- Nielsen, D. S., Schillinger, U., Franz, C. M. A. P., Bresciani, J., Amoa-Awua, W., Holzapfel, W. H., & Jakobsen, M. (2007). *Lactobacillus ghanensis* sp. nov., a motile lactic acid bacterium isolated from Ghanaian cocoa fermentations. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57(Pt 7), 1468–1472.
- Noble, A. G. (1980). The Evolution of American Farm Silos. *Journal of Cultural Geography*, 1(1), 138–148.
- Nybogård, L. (2016). *Biopreservation effects with Wickerhamomyces anomalus after 2 months moist airtight storage of sorghum*. <https://stud.epsilon.slu.se/9829/>
- Ochoa-Velasco, C. E., Navarro-Cruz, A. R., Vera-López, O., Palou, E., & Avila-Sosa, R. (2018). Growth modeling to control (in vitro) *Fusarium verticillioides* and *Rhizopus stolonifer* with thymol and carvacrol. *Revista Argentina de Microbiología*, 50(1), 70–74.
- Ogunade, I. M., Martinez-Tupia, C., Queiroz, O. C. M., Jiang, Y., Drouin, P., Wu, F., Vyas, D., & Adesogan, A. T. (2018). Silage review: Mycotoxins in silage: Occurrence, effects, prevention, and mitigation. *Journal of Dairy Science*, 101(5), 4034–4059. h
- Olstorpe, M., Borling, J., Schnürer, J., & Passoth, V. (2010). *Pichia anomala* yeast improves feed hygiene during storage of moist crimped barley grain under Swedish farm conditions. *Animal*

- Feed Science and Technology*, 156(1–2), 47–56.
- östling, C. E., & Lindgren, S. E. (1993). Inhibition of enterobacteria and *Listeria* growth by lactic, acetic and formic acids. *Journal of Applied Bacteriology*, 75(1), 18–24.
- Oude Elferink, S., Driehuis, F., Gottschal, J., & Spoelstra, S. F. (2000). Paper 2.0: Silage fermentation processes and their manipulation. In *FAO Electronic Conference on Tropical Silage* (Vol. 1, pp. 17–30).
- Oude Elferink, S., Krooneman, J., Jan, G., Sierk, S., Folkert, F., & Frank, D. (2001). Anaerobic Conversion of Lactic Acid to Acetic Acid and 1,2-Propanediol by *Lactobacillus buchneri*. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(1), 125–132.
- Owens, F., & Smiley, B. (2018). *Yeast containing silage inoculants for the enhancement of silage digestion and fermentation in the rumen*. (Patent No. 15/713,396).
- Padilla, B., Gil, J., & Manzanares, P. (2018). Challenges of the Non-Conventional Yeast *Wickerhamomyces anomalus* in Winemaking. *Fermentation*, 4(3), 68.
- Pahlow, G., Muck, R. E. ., Driehuis, F. ., & Oude Elferink, S.J.W.H.; Spoelstra, S. F. (2003). Microbiology of ensiling. In J. Buxton, DR, Muck, RE, Harrison (Ed.), *Silage Science and Technology* (pp. 31–93). American Society of Agronomy.
- Paradhipta, D., Joo, Y., Lee, H., Lee, S., Noh, H. , Choi, J., Kim, J., Min, H., & Kim, S. C. (2021). Effects of Inoculants Producing Antifungal and Carboxylesterase Activities on Corn Silage and Its Shelf Life against Mold Contamination at Feed-Out Phase. *Microorganisms*, 9(3), 558.
- Passoth, V., Fredlund, E., Druvefors, U. Ä., & Schnürer, J. (2006). Biotechnology, physiology and genetics of the yeast *Pichia anomala*. *FEMS Yeast Research*, 6(1), 3–13.
- Passoth, V., & Schnürer, J. (2003). Non-conventional yeasts in antifungal application. In J. H. de Winde (Ed.), *Functional Genetics of Industrial Yeasts. Topics in Current Genetics*, vol 2. (pp. 297–329). Springer Berlin Heidelberg.
- Peterson, S. W., & Horn, B. W. (2009). *Penicillium parvulum* and *Penicillium georgiense*, sp. nov., isolated from the conidial heads of *Aspergillus* species. *Mycologia*, 101(1), 71–83.
- Petersson, S., & Schnurer, J. (1995a). Biocontrol of mold growth in high-moisture wheat stored under airtight conditions by *Pichia anomala*, *Pichia guilliermondii*, and *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(3), 1027–1032.
- Petersson, S., & Schnurer, J. (1995b). Erratum: Biocontrol of mold growth in high-moisture wheat stored under airtight conditions by *Pichia anomala*, *Pichia guilliermondii*, and *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(4), 1677.
- Petersson, Stina, Jonsson, N., & Schnürer, J. (1999). *Pichia anomala* as a biocontrol agent during storage of high-moisture feed grain under airtight conditions. *Postharvest Biology and Technology*, 15(2), 175–184.
- Petersson, Stina, & Schnürer, J. (1998). *Pichia anomala* as a biocontrol agent of *Penicillium roqueforti* in high-moisture wheat, rye, barley, and oats stored under airtight conditions. *Canadian Journal of Microbiology*, 44(5), 471–476.
- Pidoux, M., Brillouet, J. M., & Quemener, B. (1988). Characterization of the polysaccharides from *Lactobacillus brevis* and from sugary kefir grains. *Biotechnology Letters*, 10(6), 415–420.
- Piltz, J. W., & Kaiser, A. G. (2004). Principles of silage preservation. In A. Kaiser, J. Piltz, H. Burns, & N. Griffiths (Eds.), *Successful silage* 2nd Edition. Dairy Australia and new South Wales Department of Primary Industries (pp. 25–56).

- Pimenta, R., Morais, P., Rosa, C., Correa, J. (2009). Utilization of yeasts in biological control programs. In T. Satyanarayana & G. Kunze (Eds), *Yeast Biotechnology: Diversity and Applications*. Springer, Berlin (pp. 199–214).
- Pitt, J., & Hocking, A. (2009). *Fungi and Food Spoilage* 3rd Edition. Springer.
- 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*, 3091.
- Raju, M. V. L. N., & Devegowda, G. (2001). Influence of esterified-glucomannan on performance and organ morphology, serum biochemistry and haematology in broilers exposed to individual and combined mycotoxicosis (aflatoxin, ochratoxin and T-2 toxin). *British Poultry Science*, *41*, 640–650.
- RBN. (2020). *Reglamento Bromatológico Nacional Decreto N°315/994*. IMPO. <https://www.impo.com.uy/bases/decretos-reglamento/315-1994>
- Reglamento (EU) N° 165/2010. (2010). *de la comisión de 26 de febrero de 2010 que modifica, en lo que respecta a las aflatoxinas, el Reglamento (CE) no 1881/2006 por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios. (2010, 27 de febrero)*. Diario Oficial De La Unión Europea.
- Reich, L. J., & Kung, L. (2010). Effects of combining *Lactobacillus buchneri* 40788 with various lactic acid bacteria on the fermentation and aerobic stability of corn silage. *Animal Feed Science and Technology*, *159*(3), 105–109.
- Ritter, A., Muñoz-Carpena, R., & Regalado, C. M. (2011). Capacidad de predicción de modelos aplicados a la ZNS: Herramienta informática para la adecuada evaluación de la bondad-de-ajuste con significancia estadística. In J. M. Fernández & N. Sánchez Martín (Eds.), *Estudios de la Zona no Saturada del Suelo: Vols.11*. Actas de las X Jornadas de Investigación de la Zona no Saturada del Suelo.
- Rodrigues, P. H. M., Pinedo, L. A., Meyer, P. M., da Silva, T. H., & Guimarães, I. C. da S. B. (2020). Sorghum silage quality as determined by chemical–nutritional factors. *Grass and Forage Science*, *75*(4), 462–473.
- Rognes, T., Mahé, F., Flouri, T., McDonald, D., & Schloss, P. (2015). *vsearch: VSEARCH 1.4.0*.
- Rosa, D. D., Dias, M. M. S., Grzeškowiak, Ł. M., Reis, S. A., Conceição, L. L., & Peluzio, M. do C. G. (2017). Milk kefir: nutritional, microbiological and health benefits. *Nutrition Research Reviews*, *30*(1), 82–96.
- Rovira, P., & Velazco, J. (2012). ENSILAJE DE GRANO HÚMEDO DE SORGO : Guía práctica para su uso en la alimentación de ganado en regiones ganaderas. *Boletín de Divulgación, INIA, N° 101*.
- RStudio Team. (2021). *RStudio: Integrated Development Environment for R*. RStudio, PBC. <http://www.rstudio.com/>
- Ryan, P. D., Hammer, Ø., Harper, D. A., & Paul Ryan, D. D. (2001). PAST: PALEONTOLOGICAL STATISTICS SOFTWARE PACKAGE FOR EDUCATION AND DATA ANALYSIS. *Palaeontologia Electronica* 178kb. T. Harper. *Geological Museum*, *4*(4), 5–7. <http://palaeo-electronica.org>
- Ryu, E. H., Yang, E. J., Woo, E. R., & Chang, H. C. (2014). Purification and characterization of antifungal compounds from *Lactobacillus plantarum* HD1 isolated from kimchi. *Food Microbiology*, *41*, 19–26.
- Salgado, L., María, M., & Rava, C. (2021). *Seminario de cultivos de verano 2021*. Oficina de Programación y Política Agropecuaria (OPYPA). Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca.

- <https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/comunicacion/publicaciones/seminario-cultivos-verano-2021>
- Salveti, E., Torriani, S., & Felis, G. E. (2012). The Genus *Lactobacillus*: A Taxonomic Update. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 4(4), 217–226.
- Sanderson, M. A. (1993). Aerobic stability and in vitro fiber digestibility of microbially inoculated corn and sorghum silages. *Journal of Animal Science*, 71(2), 505–514.
- Santos, R., Buisson, N., Knight, S. A. B., Dancis, A., Camadro, J.-M., & Lesuisse, E. (2004). *Candida albicans* lacking the frataxin homologue: a relevant yeast model for studying the role of frataxin. *Molecular Microbiology*, 54(2), 507–519.
- Sassahara, M., Pontes Netto, D., & Yanaka, E. K. (2005). Aflatoxin occurrence in foodstuff supplied to dairy cattle and aflatoxin M1 in raw milk in the North of Paraná state. *Food and Chemical Toxicology*, 43(6), 981–984.
- Scarpitta, N. (2008). ¿Que necesitamos conocer sobre silos de grano húmedo de sorgo? *Revista Plan Agropecuario*, 126, 48–54.
- Schena, L., Ippolito, A., Zahavi, T., Cohen, L., Nigro, F., & Droby, S. (1999). Genetic diversity and biocontrol activity of *Aureobasidium pullulans* isolates against postharvest rots. *Postharvest Biology and Technology*, 17(3), 189–199.
- Shweta, S., Madhavan, S., Paranidharan, V., & Velazhahan, R. (2013). Detection of *Aspergillus flavus* in maize kernels by conventional and real-time PCR assays. *International Food Research Journal*, 20(6), 3329–3335.
- Silva, K. R., Rodrigues, S. A., Filho, L. X., & Lima, Á. S. (2009). Antimicrobial Activity of Broth Fermented with Kefir Grains. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 152(2), 316–325.
- Sombolestani, A. S., Cleenwerck, I., Cnockaert, M., Borremans, W., Wieme, A. D., Moutia, Y., Spaepen, S., De Vuyst, L., & Vandamme, P. (2021). *Gluconacetobacter dulcium* sp. nov., a novel *Gluconacetobacter* species from sugar-rich environments. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 71(1), 004569.
- Stadie, J., Gulitz, A., Ehrmann, M. A., & Vogel, R. F. (2013). Metabolic activity and symbiotic interactions of lactic acid bacteria and yeasts isolated from water kefir. *Food Microbiology*, 35(2), 92–98.
- Stefani, F. O. P., Bell, T. H., Marchand, C., de la Providencia, I. E., El Yassimi, A., St-Arnaud, M., & Hijri, M. (2015). Culture-Dependent and -Independent Methods Capture Different Microbial Community Fractions in Hydrocarbon-Contaminated Soils. *PLOS ONE*, 10(6), e0128272.
- Tabacco, E., Piano, S., Cavallarin, L., Bernardes, T. F., & Borreani, G. (2009). Clostridia spore formation during aerobic deterioration of maize and sorghum silages as influenced by *Lactobacillus buchneri* and *Lactobacillus plantarum* inoculants. *Journal of Applied Microbiology*, 107(5), 1632–1641.
- Tabacco, E., Righi, F., Quarantelli, A., & Borreani, G. (2011). Dry matter and nutritional losses during aerobic deterioration of corn and sorghum silages as influenced by different lactic acid bacteria inocula. *Journal of Dairy Science*, 94(3), 1409–1419.
- Tamura, K., Stecher, G., & Sudhir, K. (2021). MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 11. *Molecular Biology and Evolution*, 38.
- Toju, H., Tanabe, A. S., Yamamoto, S., Sato, H., Larsson, K., & Gilles, A. (2012). High-Coverage ITS Primers for the DNA-Based Identification of Ascomycetes and Basidiomycetes in Environmental Samples. *PLoS ONE*, 7(7).
- Trucksess, M., Weaver, C., Oles, C., D'Ovidio, K., & Rader, J. (2006). Determination of aflatoxins

- and ochratoxin a in ginseng and other botanical roots by immunoaffinity column cleanup and liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of AOAC International*, 89(3), 624–630.
- Varga, J., Frisvad, J. C., & Samson, R. A. (2011). Two new aflatoxin producing species, and an overview of *Aspergillus* section *Flavi*. *Studies in Mycology*, 69, 57–80.
- Vinderola, C. G., Duarte, J., Thangavel, D., Perdigón, G., Farnworth, E., & Matar, C. (2005). Immunomodulating capacity of kefir. *Journal of Dairy Research*, 72(2), 195–202.
- Wacoo, A. P., Wendi, D., Vuzi, P. C., & Hawumba, J. F. (2014). Methods for Detection of Aflatoxins in Agricultural Food Crops. *Journal of Applied Chemistry*, 2014, 706291.
- Walker, G. M. (2011). *Pichia anomala*: cell physiology and biotechnology relative to other yeasts. *Antonie van Leeuwenhoek*, 99(1), 25–34.
- Wambacq, E., Vanhoutte, I., Audenaert, K., De Gelder, L., & Haesaert, G. (2016). Occurrence, prevention and remediation of toxigenic fungi and mycotoxins in silage: A review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96(7), 2284–2302.
- Wawrzyniak, J. (2021). Model of Fungal Development in Stored Barley Ecosystems as a Prognostic Auxiliary Tool for Postharvest Preservation Systems. *Food and Bioprocess Technology*, 14(2), 298–309.
- Weinberg, Z. G., & Muck, R. E. (1996). New trends and opportunities in the development and use of inoculants for silage. *FEMS Microbiology Reviews*, 19(1), 53–68.
- Weinberg, Z. G., Muck, R. E., & Weimer, P. J. (2003). The survival of silage inoculant lactic acid bacteria in rumen fluid. *Journal of Applied Microbiology*, 94(6), 1066–1071.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J. (1990). *38 - AMPLIFICATION AND DIRECT SEQUENCING OF FUNGAL RIBOSOMAL RNA GENES FOR PHYLOGENETICS BT - PCR Protocols* (pp. 315–322). Academic Press.
- Whittenbury, R. (1961) An investigation of the lactic acid bacteria. PhD. Thesis. Edinburgh University, UK. <https://era.ed.ac.uk/handle/1842/27654>
- Wilson, C., & Pusey, P. (1985). Potential for biological control of postharvest plant disease. *Plant Disease*, 69, 375–378.
- Wisniewski, M., Wilson, C., Droby, S., Chalutz, E., Ghaouth, A., & Stevens, C. (2007). Postharvest biocontrol: New concepts and applications. In Vincent, C., Goettel, M.S., Lazarovit, G. (Eds), *Biological Control: A Global Perspective*. Cabi International.
- Xu, S., Yang, J., Qi, M., Smiley, B., Rutherford, W., Wang, Y., & McAllister, T. A. (2019). Impact of *Saccharomyces cerevisiae* and *Lactobacillus buchneri* on microbial communities during ensiling and aerobic spoilage of corn silage1. *Journal of Animal Science*, 97(3), 1273–1285.
- Yarza, P., Yilmaz, P., Pruesse, E., Glöckner, F. O., Ludwig, W., Schleifer, K.-H., Whitman, W. B., Euzéby, J., Amann, R., & Rosselló-Móra, R. (2014). Uniting the classification of cultured and uncultured bacteria and archaea using 16S rRNA gene sequences. *Nature Reviews Microbiology*, 12(9), 635–645.
- Yoo, J. A., Lim, Y. M., & Yoon, M. H. (2016). Production and antifungal effect of 3-phenyllactic acid (PLA) by lactic acid bacteria. *Journal of Applied Biological Chemistry*, 59(3), 173–178.
- Zain, M. E. (2011). Impact of mycotoxins on humans and animals. *Journal of Saudi Chemical Society*, 15(2), 129–144.
- Zanirati, D. F., Abatemarco, M., de Cicco Sandes, S. H., Nicoli, J. R., Nunes, Á. C., & Neumann, E. (2015). Selection of lactic acid bacteria from Brazilian kefir grains for potential use as starter or probiotic cultures. *Anaerobe*, 32, 70–76. h

- Zhang, J., Kobert, K., Flouri, T., & Stamatakis, A. (2014). PEAR: a fast and accurate Illumina Paired-End reAd mergeR. *Bioinformatics*, *30*(5), 614–620.
- Zheng, J., Wittouck, S., Salvetti, E., Franz, C. M. A. P., Harris, H. M. B., Mattarelli, P., O'toole, P. W., Pot, B., Vandamme, P., Walter, J., Watanabe, K., Wuyts, S., Felis, G. E., Gänzle, M. G., & Lebeer, S. (2020). 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*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *70*(4), 2782–2858.
- Zielinska, K., Fabiszewska, A., & Stefanska, I. (2015). Different aspects of *Lactobacillus* inoculants on the improvement of quality and safety of alfalfa silage. *Chilean Journal of Agricultural Research*, *75*(3), 298–306.

VI. ANEXOS

ANEXO I. Matriz del Diseño Central Compuesto

Ensayo	Humedad (%)	Temperatura (°C)	Tiempo (días)	Inóculo inicial 10^x (conidias/g)
1	40,0	10,0	8,0	3,0
2	40,0	10,0	4,0	3,0
3	40,0	10,0	4,0	5,0
4	30,0	36,8	6,0	4,0
5	46,8	20,0	6,0	4,0
6	40,0	30,0	4,0	5,0
7	30,0	20,0	9,4	4,0
8	30,0	20,0	6,0	4,0
9	20,0	30,0	4,0	5,0
10	30,0	20,0	2,6	4,0
11	20,0	10,0	4,0	5,0
12	13,2	20,0	6,0	4,0
13	20,0	10,0	8,0	5,0
14	40,0	30,0	4,0	3,0
15	20,0	10,0	8,0	3,0
16	40,0	30,0	8,0	3,0
17	20,0	30,0	8,0	3,0
18	30,0	20,0	6,0	5,7
19	20,0	30,0	4,0	3,0
20	20,0	30,0	8,0	5,0
21	20,0	10,0	4,0	3,0
22	40,0	10,0	8,0	5,0
23	30,0	3,2	6,0	4,0
24	30,0	20,0	6,0	4,0
25	40,0	30,0	8,0	5,0
26	30,0	20,0	6,0	4,0
27	30,0	20,0	6,0	2,3

ANEXO 2. Medios de cultivo

LMG Agar (Sombolestani et al., 2021)

D-glucosa.....	50 g
Extracto de levadura.....	10 g
Agar.....	15 g
Agua.....	1 L

SM (Sombolestani et al., 2021).

D-glucosa.....	50 g
Extracto de levadura.....	5 g
Agua.....	1 L

ANEXO 3. PUBLICACIÓN



Article

Biocontrol of *Aspergillus flavus* in Ensiled Sorghum by Water Kefir Microorganisms

Mariana Gonda ¹, Gabriela Garmendia ¹, Caterina Rufo ², Ángela León Peláez ³, Michael Wisniewski ⁴, Samir Droby ⁵ and Silvana Vero ^{1,*}

¹ Área Microbiología, Departamento de Biociencias, Facultad de Química, Universidad de la República, Gral Flores 2124, Montevideo 11800, Uruguay

² Instituto Polo Tecnológico, Facultad de Química, Universidad de la República, By Pass Ruta 8 s/n, Pando, 8 Canelones 90000, Uruguay

³ Cátedra de Microbiología, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, Calle 47 y 115, La Plata 1900, Argentina

⁴ Appalachian Fruit Research Station, Agricultural Research Service, United States Department of Agriculture, Wiltshire Road Kearneysville, WV 25443, USA

⁵ Agricultural Research Organization (ARO), Department of Postharvest Science, The Volcani Center, Rishon LeZion 7505101, Israel

* Correspondence: svero@fq.edu.uy

Received: 1 July 2019; Accepted: 7 August 2019; Published: 10 August 2019

Abstract: The capacity of microorganisms from water kefir (WK) to control *Aspergillus flavus* growth during the aerobic phase of ensiled sorghum grains was determined. Sorghum inoculated with *A. flavus* was treated with filter-sterilized and non-sterilized water kefir, ensiled, and incubated 7 days at 25 °C. *A. flavus* growth was quantified by qPCR after incubation. Mold growth was inhibited in the presence of water kefir while no inhibition was observed when filter-sterilized water kefir was applied, demonstrating the relevant role of the microorganisms in the kefir water in the biocontrol process. Fungal and bacterial diversity in treated sorghum mini-silos was analyzed by high-throughput sequencing. Firmicutes was the predominant bacterial phyla and *Lactobacillus* represented the most abundant genus, while Ascomycota was the predominant fungal phyla with *Saccharomyces* and *Pichia* as the major genera. Bacterial and yeast counts before and after incubation indicated that the microbial community obtained from WK was able to grow in the sorghum mini-silos in the presence of *A. flavus*. Results of the present work indicate that the use of a mixed inoculum of microorganisms present in WK may represent an alternative management practice to avoid the growth of *A. flavus* in ensiled sorghum grains and the concomitant contamination with aflatoxins.

Keywords: water kefir; high moisture sorghum silage; *Aspergillus flavus*; high-throughput sequencing

1. Introduction

Silage plays a significant role as a source of animal feed, especially in areas where the demand for feed is year-round. It is an essential component of the diet of ruminants when fresh dietary crops are unavailable, as in winter [1]. High-moisture grain silage in Uruguay is an important food resource for livestock and dairy animals. It represents a higher quality energy source than dry grain, is economically cheaper, and its production is less dependent on weather conditions [2]. The process of producing silage involves several stages that require a total of 30–40 days, depending on the ensiling material [3]. The silage process can be divided into four phases; an initial aerobic phase immediately after harvest; a fermentation phase; a stable storage phase, and lastly, a feed-out phase when the silo feed face is open and the material is exposed to air [4]. The exposure of silage to oxygen during

storage and feed-out phases has a negative impact on silage quality as it allows fungi to proliferate. Fungal growth in silage results in a loss of nutrients and dry matter, and reduced palatability resulting in a reduction in silage consumption, both of which cause a loss in animal performance [5]. Some spoilage molds can also produce mycotoxins that can cause the animals to become intoxicated. Genera associated with silage deterioration are *Aspergillus*, *Penicillium*, and *Fusarium* [6]. Previous work of García y Santos (2012) [7] performed in Uruguay, indicated that *Aspergillus flavus* was the main contaminant species in sorghum silage. These results are in agreement with Keller et al. (2012) [8], who identified *Aspergillus flavus* as the main spoiler of sorghum silage in the south of Brazil. *A. flavus* produces aflatoxins that are carcinogenic and mutagenic mycotoxins [9]. Consumption of aflatoxin-contaminated feed is associated with reduced animal performance.

Different strategies, including biological control, have been used to prevent fungal growth in silages [6]. Bacteria and yeast have been described as good biocontrol agents to prevent mold growth in high moisture grain silage. *Lactobacillus* spp. are commonly used as a silage inoculant due their ability to produce lactic acid, which causes a quick decrease in the pH of the silage substrate, limiting the growth of many microbial contaminants. Lactic acid bacteria also compete with spoilage microorganisms and minimize gas losses and proteolysis [10]. They have antibacterial and antifungal activity and the capacity to adsorb mycotoxins [11]. The use of yeast as biocontrol agents for the control of mycotoxigenic molds in ensiled grains has also been studied and yeast has been shown to inhibit fungal growth and decrease the risk of mycotoxin contamination in silage [12,13]. Yeast also improve the nutritional value of silage by increasing vitamin and protein content. [14,15]. *Saccharomyces* spp. are used as a direct-fed microbial (DFM), to improve feeding efficiency, decrease ruminal acidosis, and mitigate methane emissions [16].

Schnürer and Jonsson (2011) [17] suggested that an excellent starter culture for grain silage should include a combination of microorganisms, in particular yeast and lactic acid bacteria. Yeasts may control mold growth, especially in the first step of the ensiling process, by contributing to oxygen depletion, then when oxygen is low or absent, lactic acid bacteria can inhibit mold growth by decreasing pH through the secretion of organic acids and by the production of antimicrobial compounds. The use of natural and synthetic microbial consortia represents an emerging field in the biocontrol of plant pathogens or microbial spoilage of food and feed [18–20]. Microbial consortia often have the ability to complete tasks that could not be accomplished by a single strain. Therefore, their use can result in a more efficient and robust process that is less affected by environmental stress [21].

The object of the present study was to examine the potential of microorganisms from water kefir grains as potential biocontrol agents. Kefir grains consist of a complex association of bacteria and yeast, bound within a dextran matrix. This association involves many different yeast species, lactic acid bacteria, and some species of acetic acid bacteria [22]. Water kefir is produced by the fermentation of a sugary solution by microorganisms present in kefir grains, referred to as a starter culture [22,23]. Kefir is recognized as an excellent source of probiotics with potential health benefits [24–26]. Antioxidant, anti-inflammatory, antifungal, and antibacterial activity are among the many health benefits that have been demonstrated [19,27,28]. A variety of pharmaceutical attributes have been associated with specific strains of yeast and bacteria isolated from kefir [29,30]. This suggests that water kefir may represent an excellent source of single strains or microbial consortia to be used in managing the silage process and preventing the establishment of microorganisms that diminish the quality and safety of silage. The specific aim of the present work was to study the ability of the microorganisms present in water kefir to act as biocontrol agents against *Aspergillus flavus* during the aerobic phase of the silage process in sorghum silages.

2. Results

2.1. Quantification of *A. flavus* DNA by qPCR

The standard curve generated revealed a strong linear relationship ($R^2 = 0.99$) between the logarithm of *A. flavus* DNA concentration (ng/ μ L) in the reaction tube and the corresponding CT values (Figure 1). Linearity was observed over the range between 53 ng to 5.3×10^{-3} ng of DNA per

reaction, which constituted the dynamic range of the method. Based on this calculation and the treatment of samples prior to performing qPCR, the quantification limit of the method expressed in terms of sample weight was 3.2 ng DNA/g. Efficiency calculated from the slope of the curve was 102%, indicating that the qPCR assay was highly efficient.

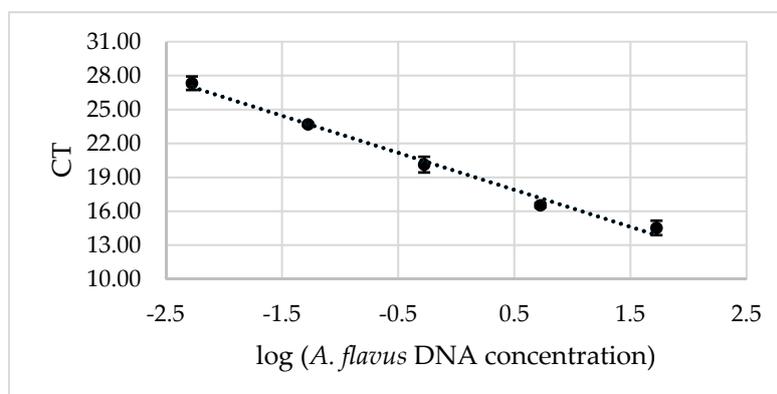


Figure 1. Standard curve for the real time PCR assay of *A. flavus* DNA. Bars represent confidence intervals ($\alpha = 0.05$).

2.2. *A. flavus* Growth in Mini-Silos

A. flavus PJA readily grew in both the control and T2 mini-silos under the assayed conditions. In control mini-silos, which were prepared with sorghum and sterile water, *A. flavus* DNA concentration after incubation was 93.9 ng of DNA/g sorghum while, in T2 mini-silos, a significantly higher concentration (189.1 ng of DNA/g sorghum) was detected (Figure 2). In both treatments, fungal growth was easily visible when the mini-silos were opened (Figure 3).

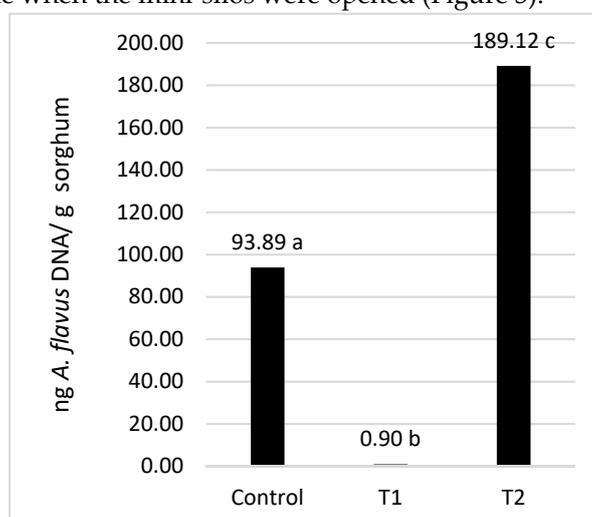


Figure 2. Nanograms (ng) of *A. flavus* DNA per sorghum weight obtained from the control (sterile water), T1 (water kefir), and T2 (filter-sterilized water kefir) treatments. Values labeled with different letters are significantly different, as calculated by a LSD Fisher Test $\alpha = 0.05$.

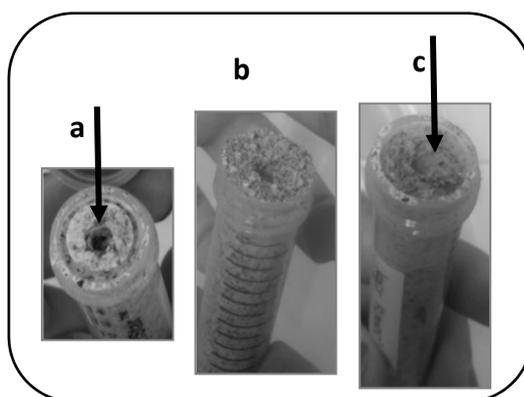


Figure 3. Experimental high moisture sorghum grain mini-silos opened after 7 days of incubation at 25°C. (a) Control (sterile water); (b) T1 (water kefir consortium); (c) T2 (filter-sterilized water kefir). Arrows indicate *A. flavus* growth.

Visible symptoms of *A. flavus* growth were not observed in T1 mini-silos (Figures 2 and 3). The estimated DNA concentration of the mold as quantified by qPCR was also lower than the quantification limit of the method established for 3.2 ng of DNA/g sorghum. An estimated value of 0.9 ng of DNA/g sorghum was obtained by extrapolation. That concentration was significantly lower ($\alpha = 0.05$) than was obtained in the control and T2 mini-silos (Figure 2), indicating that the microorganisms present in the WK mixture played a significant role in inhibiting the growth of *A. flavus*.

2.3. Microbiological Analysis of T1 Mini-Silos

As illustrated in Figure 4a,b, the concentration of lactic and acetic acid bacteria and yeast increased significantly in T1 mini-silos incubated at 25 °C from day 0 to day 7 (Figure 4a,b). No significant differences were observed, however, in bacterial and yeast counts obtained from mini-silos incubated under aerobic or anaerobic conditions (Figure 4a,b).

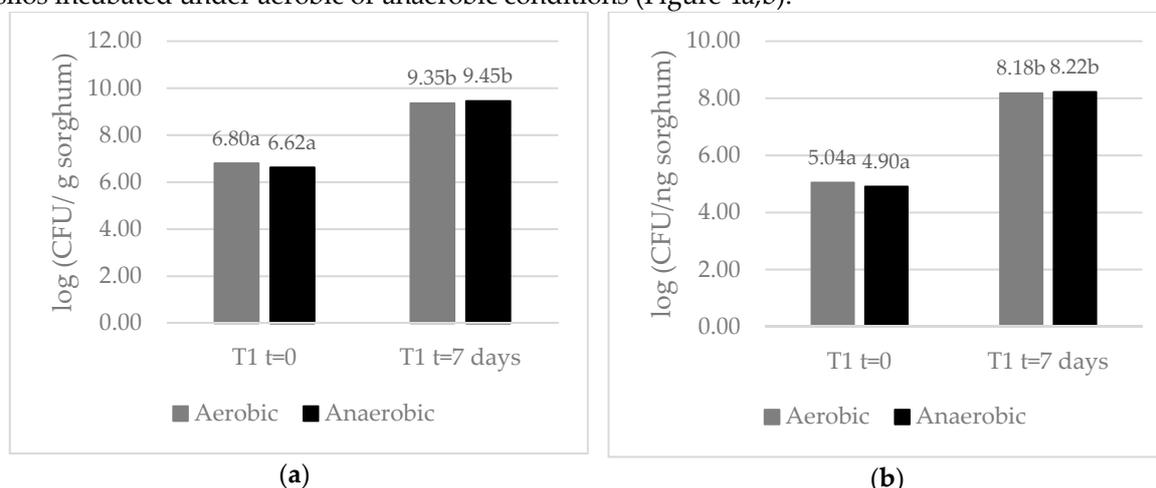


Figure 4. (a) Bacterial plate count per sorghum weight in aerobic and anaerobic condition. (b) Yeast plate count per sorghum weight in aerobic and anaerobic conditions. Values labeled with different letters are significantly different, as calculated by a LSD Fisher Test $\alpha = 0.05$.

Five bacterial colonies that differed in morphology were isolated from T1 mini-silos before (1AB, 2AB, 3AB, 4AB, 5AB) and after (1DB, 2DB, 3DB, 4DB, 5DB) the seven-day incubation period. Six of the isolates (1AB, 3AB, 5AB, 1DB, 3DB, 5DB) were Gram-positive rods with slight differences in their microscopic morphology. The other four isolates were Gram-negative rods. In the case of yeasts, two isolates with different colony types were obtained before (1AL, 2AL) and after (1DL, 2DL) incubation. The ratio of the abundance (number of colonies) of these isolates was 1:3 before and after incubation

The yeast isolates were identified based on the D1/D2 consensus sequence. The D1/D2 sequences from 1AL and 1AD isolates had a 99.58% and 99.61% homology, respectively, to *Pichia membranifaciens*, type strain NRRL Y-2026 in GenBank (EU057561.1). The second most-related species was *Pichia garciniae* with a 96% similarity. D1/D2 sequences of isolates 2AL and 2DL exhibited a 100% homology to *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 18824 type strain in GenBank (KC 881066.1). The second most related specie to 2AL and 2DL was *Saccharomyces cariocanus* with a 99% similarity. Phylogenetic trees derived from an analysis of the 26S rDNA domain D1/D2 of each group of strains are presented in Figure 5. Isolates 1AL and 1DL formed a separate cluster with *Pichia membranifaciens* type strain NRRL Y-2026, while isolates 1AL and 1DL formed a separate cluster with *Saccharomyces cerevisiae* type strain ATCC 18824, confirming in each case their identification.

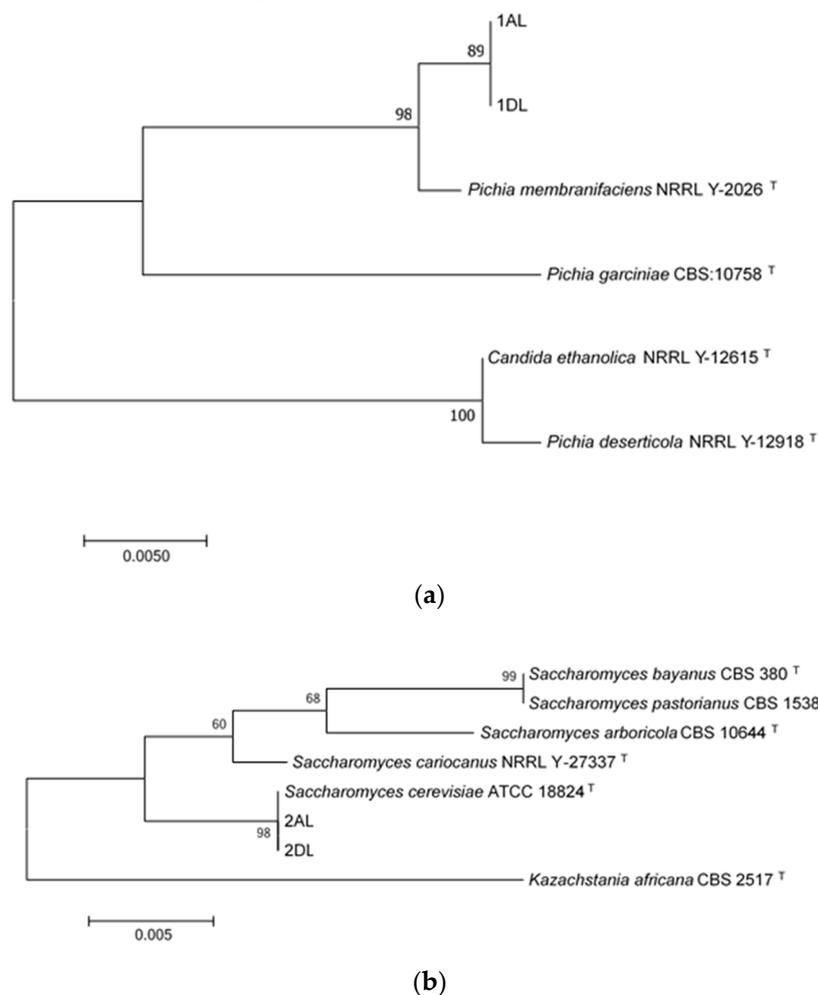


Figure 5. Phylogenetic trees based on D1/D2 sequences from (a) *Pichia membranifaciens*. (b) *Saccharomyces cerevisiae* isolates. Trees were constructed using the neighbor-joining method. Bootstrap values (1000 tree interactions) are indicated at the nodes. [†] means type strain.

Based on the obtained sequences of 16S rDNA, the bacterial isolates were identified as *Acetobacter sp.* (2AB and 2DB), *Gluconobacter sp.* (4AB and 4DB), and *Lactobacillus sp.* (1AB, 1DB, 3AB, 3DB, 5AB, 5DB). A phylogenetic tree was constructed based on the 16S rRNA sequences of strains identified as *Lactobacillus sp.* and type strain sequences from related species retrieved from GenBank. Isolates 3AB and 3DB formed a separate cluster with *Lactobacillus harbinensis* type strain NBRC 100982, suggesting that those isolates may belong to this species (Figure 6). Isolates 1AB and 1DB grouped with the type strain of *Lactobacillus nagelii* NRIC 0559, and isolates 5AB and 5DB formed a cluster with species belonging to *Lactobacillus casei* group [31] (Figure 6).

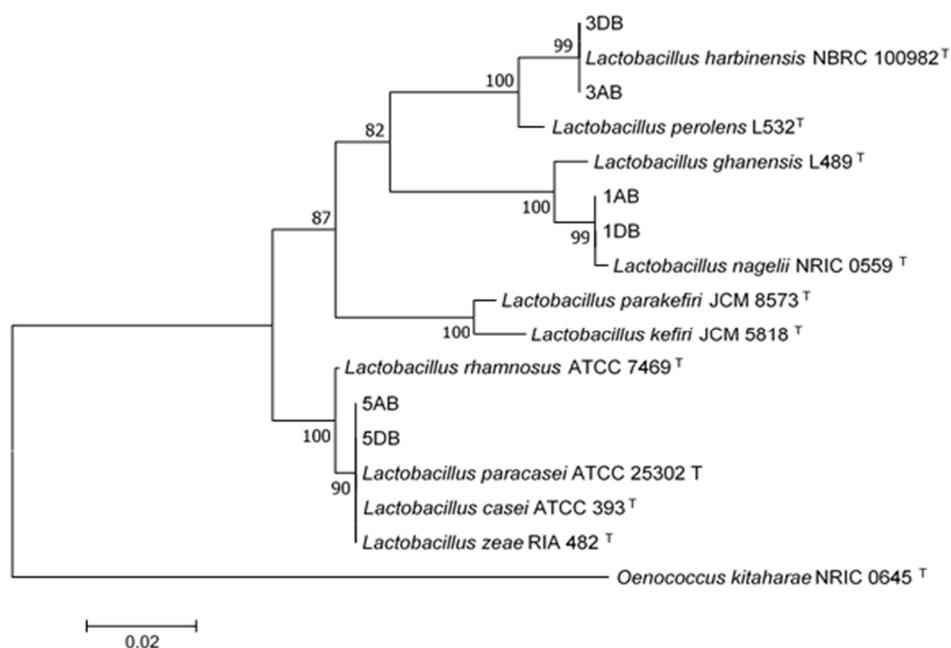


Figure 6. Phylogenetic tree based on the partial sequence of the 16S rRNA gene of *Lactobacillus* spp. isolates. The tree was constructed using the neighbor-joining method. Bootstrap values (1000 tree interactions) are indicated at the nodes. ^T means type strain.

2.4. Data Analysis of High-Throughput Amplicon Sequencing

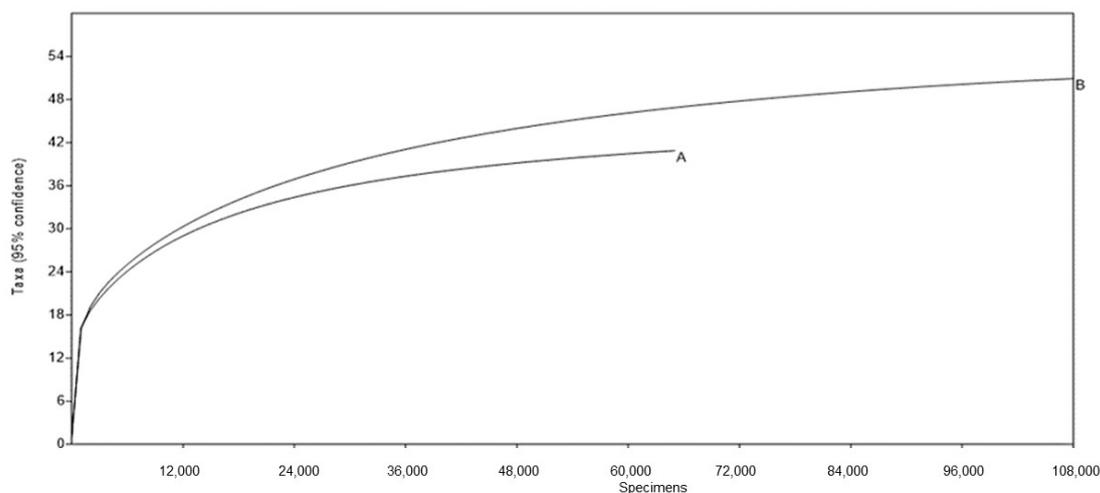
A total of 175,936 sequences of the V4 region of the 16S rRNA gene were obtained from T1 mini-silos before (66,571) and after (109,365) incubation. In addition, 153,509 ITS2 sequence reads were obtained for the fungal community.

The number of bacterial OTUs obtained before and after the incubation of T1 mini-silos was 41 and 51, respectively, while they were 21 and 13 in case of fungi. Chao1 and Shannon indexes were calculated for each data set (Table 1). The Chao1 estimator of richness for bacteria was 42.7 before and 52.5 after incubation, while for fungi they were 21.2 and 16.0, respectively. Shannon diversity indexes were practically the same before and after incubation for both bacterial and fungal communities. Based on the obtained values, it appears that the fungal community had a lower level of diversity than the bacterial community.

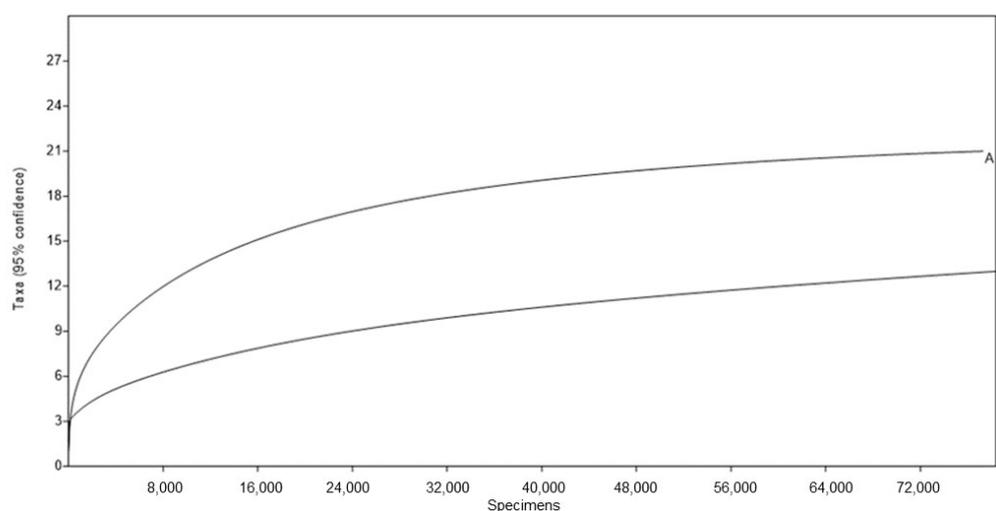
Table 1. Alpha diversity indices (Chao1 and Shannon) for bacterial and fungal communities, in T1(water kefir) mini-silos, before (A) and after (B) incubation

	Sample	Sequences	OTUs	Chao1	Shannon
Bacteria	A	66571	41	42.7	1.681
	B	109365	51	52.5	1.613
Fungi	A	77432	21	21.2	0.1383
	B	78539	13	16.0	0.2657

The rarefaction curves indicated that the overall bacterial and fungal diversity present in both samples was well represented in the obtained results (Figure 7).



(a)



(b)

Figure 7. (a) Rarefaction curves for the partial sequences for the gene that encodes 16S rDNA of bacteria before incubation (A) and after incubation (B). (b) Rarefaction curves for the partial sequences for the ITS 2 region of fungal rRNA before (A) and after (B) incubation.

Most of the bacterial and fungal OTUs could be assigned to the level of genus based on the homologous sequence alignment method and clustering with sequences obtained from taxonomic databases.

Ascomycota was the dominant fungal phylum comprising more than 99% of the sequences in both samples, with *Saccharomyces* and *Pichia* being the predominant genera. *Saccharomyces* represented 68% and 56% of the sequences from T1 mini-silos before and after incubation, respectively, while *Pichia* comprised 30% and 44%, respectively. Sequences corresponding to *Aspergillus*, *Dekkera*, *Candida*, *Malassezia*, *Mortierella*, *Rhodotorula*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Hypocreay*, and *Bionectria* were also found in samples obtained prior to incubation representing approximately 2% of the total sequences. These sequences (genera) were not found in samples obtained from T1 mini-silos after incubation. When comparing *Aspergillus* assigned sequences with sequences corresponding to type strains in GenBank, the closest related sequences (near 99% of similarity) corresponded to species from *Aspergillus* section *Flavi*, which includes *A. flavus*.

The taxonomic assignments of the predominant bacterial OTUs from both samples at the level of family and genus are shown in Figure 8. Two bacterial phyla, Firmicutes and Proteobacteria, were dominant (more than 99.9%) in both samples. Less than 0.05% of the sequences obtained before incubation corresponded to other phyla (Deinococcus-Thermus, Actinobacteria, and Cyanobacteria). The abundance of the predominant phyla prior to incubation were very similar (49% for Firmicutes and 51% for Proteobacteria) while after incubation, OTUs in the Firmicutes (61%) were more predominant (Figure 8).

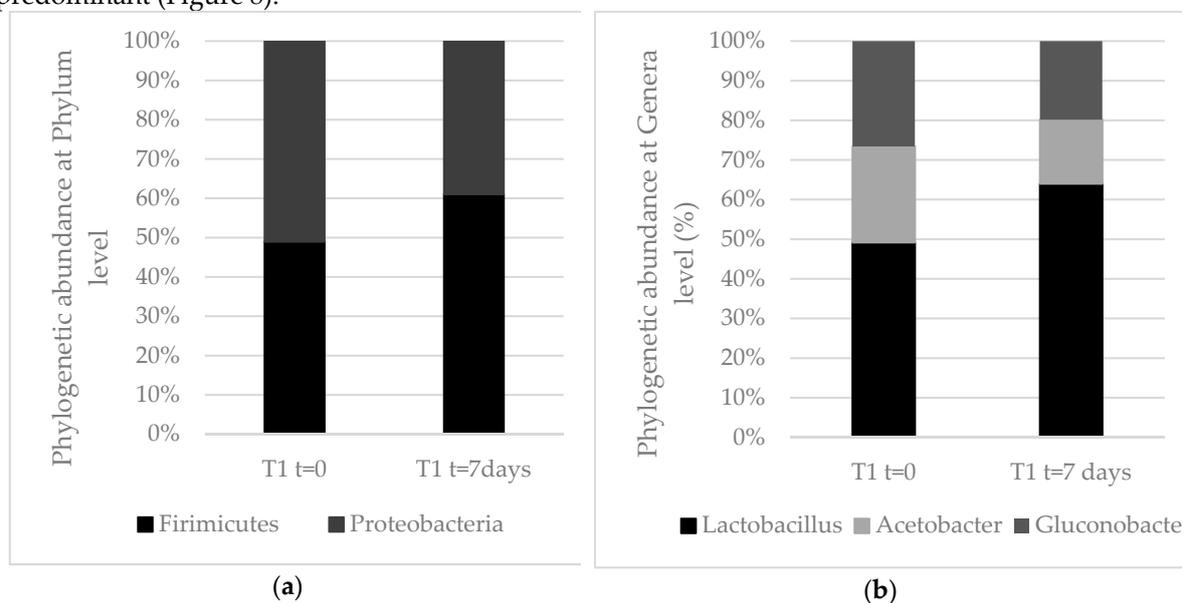


Figure 8. (a) Relative abundance of bacteria to Phylum level. (b) Relative abundance of bacteria to Genera level.

Alphaproteobacteria, represented by the genera *Acetobacter* and *Gluconobacter*, was the predominant class within Proteobacteria. Less than 0.1% of the sequences corresponded to Beta and Gammaproteobacteria.

The majority of sequences assigned to Firmicutes (more than 99%) belonged to the Lactobacillaceae family. Only 0.003% were assigned to other families (Bacillaceae and Planococcaceae) and were only present in samples obtained before incubation. *Lactobacillus* was the major genus within Firmicutes (more than 99%). Sixteen OTUs corresponding to this genus were detected in both samples. A phylogenetic tree was constructed utilizing the 16 *Lactobacillus* sequences along with sequences of type strains from related species retrieved from GenBank. Some distinct clusters were evident in the phylogenetic tree that were related to the OTUs with sequences corresponding to different species. For example, OTU 18 was affiliated with the *L. nagelii* and *L. satsumensis* group, OTU 9 formed a cluster with *L. harbinensis* type strain, while OTU 28 and OTU 29 were located within the *L. paracasei/L. casei* group (Figure 9).

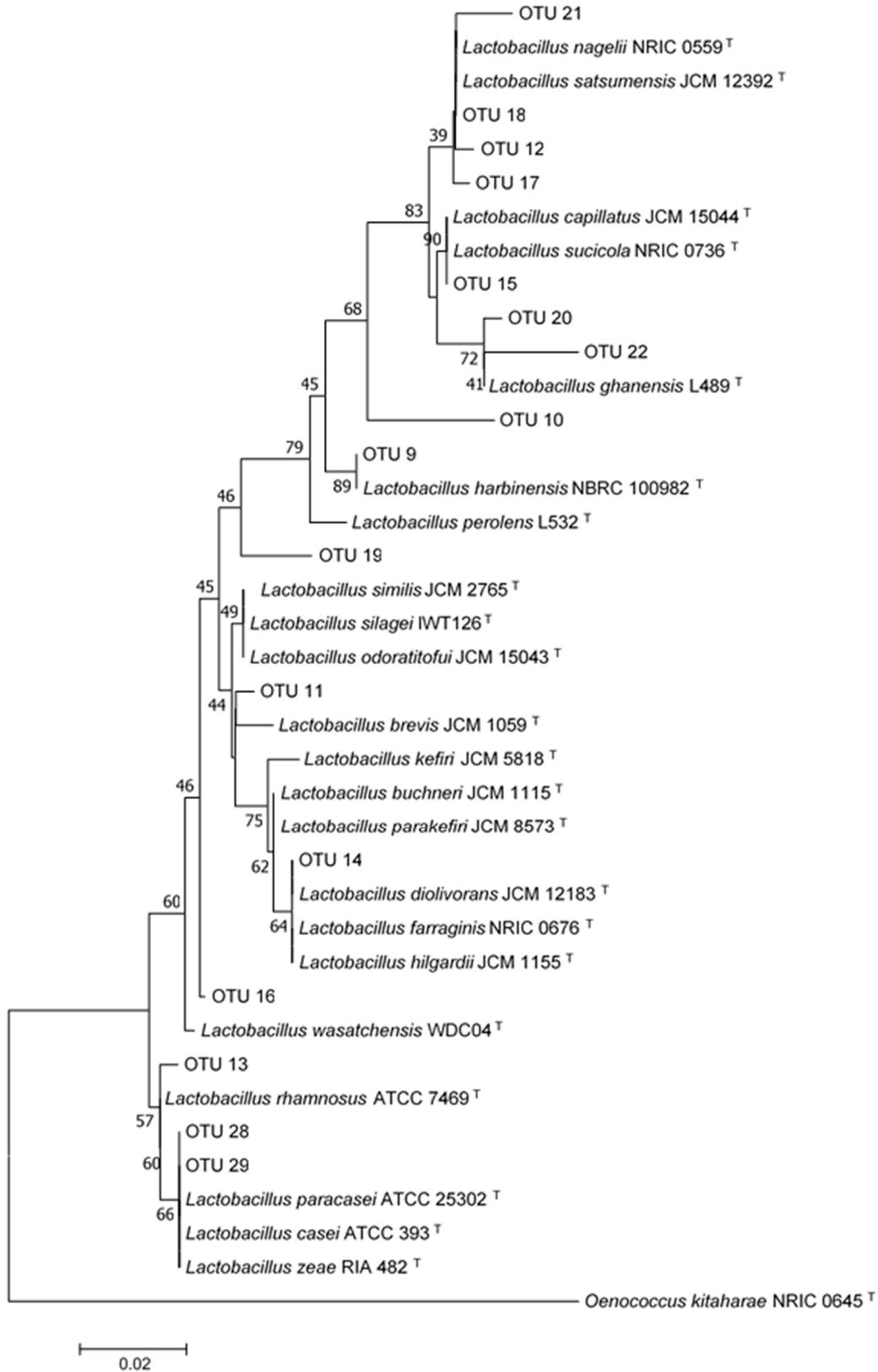


Figure 9. Phylogenetic tree based on OTUs sequences associated with *Lactobacillus* genus. The tree was constructed using the neighbor-joining method. Bootstrap values (1000 tree interactions) are indicated at the nodes. ^T means type strain

The frequency of OTUs assigned to *Lactobacillus* spp. was variable in the two samples. Figure 10 illustrates the percentage of sequences in the samples assigned to different OTUs belonging to *Lactobacillus* sequences. OTU 18 was the predominant sequence in both samples (before and after incubation), but its proportion was higher after incubation. Before incubation OTU 9 represented only 1% of the *Lactobacillus* sequences in that sample, but its proportion increased to 7% after incubation. The proportion of OTU 15 was high (17%) prior to incubation but much lower (1%) after incubation. In contrast, the abundance of OTU 29 was practically the same before and after incubation.

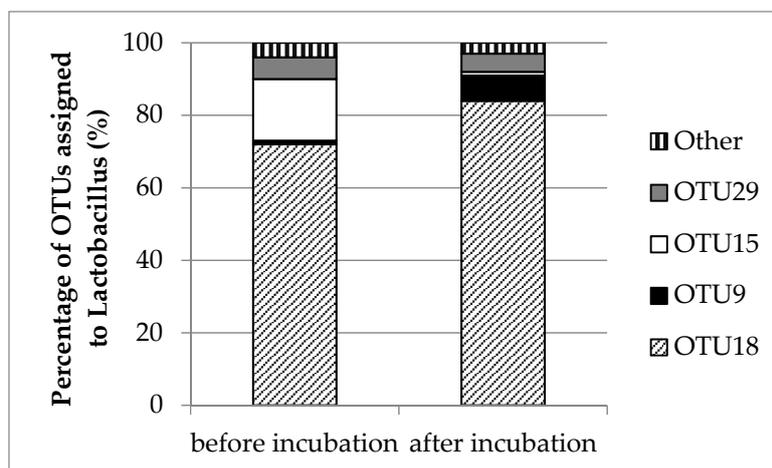


Figure 10. Percentage of sequences assigned to different OTUs in the total of *Lactobacillus* sequences in T1 mini-silos before and after incubation.

3. Discussion

In this work, the capacity of water kefir to prevent *A. flavus* growth in high-moisture sorghum grain mini-silos during the aerobic phase was demonstrated for the first time. This study also represents the first use of a consortium of organisms rather than a single antagonist as a postharvest biological control preparation, an approach that has been recently emphasized [20]. Antifungal assays were carried out in mini-silos containing ground sorghum grains amended with water, kefir water (WK), or kefir water filtered through a 0.045 μm filter (SWK) and artificially inoculated with a conidial suspension of *A. flavus*. Mini-silos had an open end covered by a sterile 0.45 μm membrane filter to simulate the aerobic phase of the process but not allow infiltration of microorganisms from the surrounding atmosphere. When WK was added to sorghum grains, *A. flavus* biomass after 7 days of incubation at 25 $^{\circ}\text{C}$ was 100 times lower than the level obtained in control mini-silos in which grains were mixed with water. When grains were amended with SWK, which contained no microorganisms, *A. flavus* growth after incubation was similar to the level observed in the control mini-silos. These results indicate that the antifungal activity exhibited in the WK treatment was entirely due to the action of microorganisms present in the kefir water and not to soluble metabolites present in the fermented solution, since no inhibition was observed when sterile kefir water (SWK) was used as a treatment. The enhancement of *A. flavus* growth in mini-silos receiving the SWK treatment suggests that fungal growth in sorghum grains is nutrient limited, since the biomass of *A. flavus* increased when extra nutrients were provided by the sterile kefir water (SWK) treatment.

Certain bacteria and yeast present in the kefir water (WK) were able to grow on ensiled sorghum grains under the assayed conditions. All the recovered microorganisms proved to be facultative anaerobic organisms that also remained active in the anaerobic phase of the ensiling process. This capacity could be very useful in extending the antifungal action beyond the first aerobic phase to cases where the anaerobic storage is interrupted when a silo bag is opened or breaks [4]. The same bacteria and yeast species were recovered from T1 (WK-treatment) mini-silos before and after incubation. Bacteria were identified as *Lactobacillus* spp., *Acetobacter* spp., and *Gluconobacter* spp. A phylogenetic tree was constructed based on the 16S rRNA sequences of the *Lactobacillus* spp. and type

strain sequences from related species. Two of the isolates formed a separate cluster with *Lactobacillus harbinensis* type strain NBRC 100982, suggesting that they could belong to this species. Two other isolates grouped with strains from *Lactobacillus casei* Group and the remaining two isolates formed a separate cluster with *Lactobacillus nagelii* type strain NRIC 0559. The mentioned *Lactobacillus* species could be classified in different groups based on the different pathways they utilize to ferment carbohydrates. *Lactobacillus nagelii* is an obligate homofermentative species, which produces only lactic acid, as a result of the fermentation of hexoses. The other species identified in our study can be classified as a facultative heterofermentative bacterium [32]. These types of bacteria can produce different end products depending on the type of sugars available for fermentation. In the presence of pentoses, they produce lactic and acetic acids but when fermenting hexoses they act as homofermentative bacteria. Homofermentative *Lactobacilli* rapidly decrease pH and increase the concentration of lactic acid in the substrate in which they are growing and have been extensively used as silage inoculants [33]. The antifungal activity of *Lactobacillus* spp. is well documented, and is not only due to the production of organic acids, but also attributed to the production of short chain fatty acids, hydrogen peroxide, reuterin, diacetyl, and bacteriocins [34].

Only two yeast species, *Pichia membranifaciens* and *Saccharomyces cerevisiae*, were recovered in culture from T1 mini-silos. Both species have been previously isolated from kefir grains. *Saccharomyces cerevisiae* is commonly used as probiotic [35] while *Pichia membranifaciens* has been selected as biological control agent of fungal diseases in several food matrices. Notably, it has been used as an antagonist against postharvest fungal pathogens during the cold storage of fruits [36,37]. It has been generally considered that yeasts contribute to the aerobic spoilage of silage since some of them can metabolize lactic acid increasing silage pH Duniere et al. (2015) [16], however, demonstrated that inoculation with three *Saccharomyces* strains did not affect aerobic stability of corn silage during the aerobic phase and had no impact on *Lactobacillus* populations or silage quality. Based on these results they proposed that the use of a combination of *Lactobacillus* spp. and *Saccharomyces* strains to produce a new type of inoculant in which yeasts act as probiotic microorganisms to benefit the health and production efficiency of ruminants. The inclusion of yeasts unable to degrade lactic acid in silage could also help to prevent mold growth by consuming oxygen and acting as a biocontrol agent. In this regard, many studies have demonstrated the active role of *Pichia anomala* in preventing *Penicillium roquefortii* growth in airtight stored grain in mini- and medium-scale silos [38].

The results obtained by culture-dependent methods were in accordance with the results obtained by high-throughput sequencing of both bacterial and fungal communities in ensiled sorghum grains amended with kefir water (WK). Firmicutes and Proteobacteria were the predominant bacteria phyla in both analyses. *Lactobacillus* and *Acetobacter* were the most abundant genera within the Firmicutes and Proteobacteria, respectively. This was in agreement with Fiorda et al. (2017) [39] who analyzed and compared the microbial composition of water and milk kefir grains. *Lactobacillus* was the most abundant bacterial genus in both types of grains but *Acetobacter* was mainly found in water kefir, while *Streptococcus* and *Pediococcus* were more abundant in milk kefir.

In the present study, *Lactobacillus* was comprised of 16 different OTUs. Based on the phylogenetic tree, the OTUs could be assigned to different *Lactobacillus* species. The proportion of the predominant OTUs differed prior to and after incubation. OTU 18, which clustered with *L. nagelii* and *L. satsumensis*, was the predominant sequence in both pre- and post-incubation samples, but its proportion was higher after incubation. OTU 9, which most closely matched *L. harbinensis*, also increased its proportion after incubation, while OTU 15, most closely matched to *L. capillatus* and *L. sucicola*, was more abundant prior to incubation. Finally, the proportion of OTU 29, affiliated with the *L. casei/paracasei* group, remained stable. The species matching the most abundant OTUs obtained after incubation, was also isolated in culture before and after incubation. Importantly, species related to OTU 15 and other less abundant OTUs were not present in culture.

More abundant OTUs corresponded to *Saccharomyces* spp. and *Pichia* spp. which is in agreement with the genera of yeast isolates obtained by culture methods (*S. cerevisiae* and *P. membranifaciens*). Other fungal sequences were also identified in the sequence-based analyses using metabarcoding but

they represented a minor proportion of the total number of OTUs. Sequences assigned to *Aspergillus* were not found in samples taken after incubation, which suggests that *A. flavus* biomass represented a very minor proportion of the total fungal biomass in post-incubation samples receiving the WK treatment. This result is not surprising since the yeast concentration in sorghum after incubation increased three-fold, while *A. flavus* biomass was very low, as demonstrated using qPCR.

The results obtained by high-throughput sequencing revealed a more complex microbial community than the obtained by culture methods. Those microorganisms present in low numbers could only be detected by high-throughput sequencing. Their role in biocontrol activity, however, should not be ignored and should be explored in further studies.

The present work demonstrated, for the first time, that *A. flavus* growth in ensiled sorghum grains can be inhibited by microorganisms from water kefir and that a consortium of microorganisms can be used as a postharvest biocontrol preparation. The water kefir derived microorganisms could grow in mini-silos containing sorghum grains after 7 days of incubation at 25 °C and were mainly represented by three *Lactobacillus* species (*L. harbinensis*, *L. nagelii*, and *L. casi/paracasei*) and two yeast species (*S. cerevisiae* and *P. membranifaciens*). Based on these results, the use of a mixed inoculum based on the consortium present in kefir water may represent a useful strategy to avoid the growth of *A. flavus* in ensiled sorghum grains, as well as the concomitant contamination with aflatoxins in ensiled sorghum grains. The development of inoculants that combined *Lactobacillus* and yeast has the goal of achieving the benefits of both types of inoculants in one product. In a combined inoculant, lactic or acetic acid produced as a result of *Lactobacillus* spp. primary metabolism would lower the pH of the grains causing inhibition of fungal growth. Moreover, different antifungal compounds produced by *Lactobacillus* spp.—such as phenyllactic acid [40], hydrogen peroxide, proteinaceous compounds [41,42], reuterin [43], fatty acids, and cyclic dipeptides [44]—could also have a role in fungal inhibition. The role of yeast could be related to a rapid oxygen depletion or to the production of soluble and volatile antifungal compounds [13,45,46] and mycocins [47]. In any case, the production of antifungal compounds depends on the matrix and environmental conditions in which microorganisms grow [48], so the presence and the role of such compounds in ensiled grain need to be demonstrated.

Further studies should be conducted to determine the role of each microorganism in order to generate an inoculant of known and stable composition that could inhibit the growth of undesirable microorganisms and provide additional beneficial effects to the animals fed with sorghum silage.

4. Materials and Methods

4.1. Pathogen

A native strain of *Aspergillus flavus* (PJA), belonging to the culture collection from Cátedra de Microbiología, Facultad de Química, UdelaR (Montevideo, Uruguay) was used in this study. The culture was maintained on Potato Dextrose Agar (PDA) at 4 °C.

4.2. Quantification of *A. flavus* Biomass by qPCR

Aspergillus flavus biomass was quantified by qPCR in a Rotor-Gene 6000™ (Corbett Life Science, Sydney, Australia) thermocycler according to the protocol described by Shweta et al. (2013) [49] with some modifications. qPCR Reactions were performed in duplicate using a total volume of 10 µL for each sample, consisting of 5µL of Rotor-Gene™ SYBR® Green PCR Master Mix (Quiagen, Venlo, Netherlands), 0.5 µL of primer omt-F (5'-GACCAATACGCCACACAG-3') and 0.5 µL primer omt-R (5'-CTTTGGTAGCTGTTTCTCGC-3') (10 µM each) (2013) [49], 1 µL of template DNA solution and 3 µL sterile miliQ water. The PCR thermal cycling consisted of an initial heating step of 5 min at 95 °C followed by 35 cycles of 95 °C for 30 s for template denaturation and 59 °C for 35 s for primer annealing and extension (during which the fluorescence was measured). After the final amplification cycle, the dissociation curve between 68 °C and 98 °C was obtained to confirm the specificity of the amplification.

A standard curve was generated by duplicate analysis of five different concentrations of DNA from *A. flavus* PJA. Fungal DNA was extracted using ZR Fungal/Bacterial DNA MiniPrep kit (ZymoResearch, California, CA USA) directly from mycelia obtained from a 48 h-old culture growing on PDA at 28 °C. The double stranded DNA concentration in the obtained solution was determined using Quant-iTdsDNA kit (Invitrogen, California, CA USA) in a Qubit Fluorometer (Invitrogen, California, CA USA). The mean cycle threshold (Ct) values were plotted against the log of the corresponding DNA concentration of each dilution. PCR efficiency was calculated from the slope of the standard curve with the formula $efficiency = [10^{(-1/slope)}] - 1$ [50]. Detection limit and dynamic range were set within the linear range. Data analysis was performed using the Rotor-Gene 6000 cycler software version 2.3.1 (Quiagen, Venlo, Netherlands).

4.3. Water Kefir Preparation

Water kefir grains (CMUNLP1) were provided by the Cátedra de Microbiología, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad de La Plata (La Plata, Argentina). A 4.5% w/v sugary solution prepared by dissolving unrefined cane sugar (Los Ceibos, Argentina) in distilled water was subsequently inoculated with 10% w/v kefir grains. The mixture was incubated at 28 °C for 24 h. Kefir grains were then removed by filtration through a plastic sieve to obtain a water kefir (WK) solution. The WK was centrifuged at 3500× g for 15 min and the supernatant was subsequently filtered through a 0.45 µm pore size membrane to obtain sterile water kefir (SWK) solution.

4.4. Sorghum Grain Preparation and Ensiling

Sorghum mini-silos were prepared as described by Petersson and Schnurer (1995) [51] with some modifications. High tannin sorghum grains (*Sorghum bicolor*) were ground in a blender (Philips Hr2109) at high speed for 30 s, sterilized by autoclaving (121 °C, 15 min) and then dried at 60 °C to a constant weight. Water (control), WK, or SWK was added to the sorghum, in a 1:1 proportion (*w/v*) and homogenized with a sterile spatula to obtain the following mixtures: control (sorghum and water), T1 (sorghum and WK) and T2 (sorghum and SWK). The mixtures were dried at 60 °C down to a humidity of 34%. Subsequently, 50 g of each mixture was inoculated with 1 mL of a conidial suspension of *Aspergillus flavus* PJA whose concentration was determined using a hemocytometer. The preparation was then diluted to obtain a final concentration of 5×10^5 conidia/mL. Mini-silos were prepared by compacting the inoculated mixtures in 15 mL sterile centrifuge tubes. A sterile 0.45 µm membrane filter was inserted into the cap of each tube to simulate air leakage. Mini-silos were incubated for 7 days at 25 °C. Additional mini-silos were prepared for the analysis of T1 samples prior to incubation. All treatments were performed in duplicate.

4.5. Analysis of Mini-Silos

After incubation, mini-silos were analyzed for pH and *A. flavus* biomass. In the case of silos prepared with T1, additional analyses were performed before and after incubation.

The content of each mini-silo was placed in a sterile bag containing 180 mL of sterile water and the mixture was homogenized in a laboratory blender for 1 min (Stomacher 400, Seward, UK). The pH of each homogenate was determined using a pH electrode (HANNA HI1131). Total DNA was extracted from all of the homogenates. One milliliter of each suspension were centrifuged for 1 min at 10,000 rpm. Pellets were reconstituted in 750 µL of a lysis solution and total DNA was extracted from the pellets using the ZR Fungal/Bacterial DNA MiniPrep kit (ZymoResearch). Aliquots of DNA solutions obtained from the samples were used to determine the concentration of *A. flavus* by qPCR, as described above. All determinations were performed in duplicate. Additional aliquots of total DNA solutions obtained from T1 mini- (initial time and after 7 days of incubation) were used to characterize the microbial community using a metabarcoding approach, as described below. The concentration of yeast and lactic and acetic acid bacteria in mini-silos prepared with T1 were determined before and after the incubation period. Microbiological analyses were performed by plate counting on Potato Dextrose Agar (Oxoid Ltd., England) amended with 0.017% of chloramphenicol

(Sigma-Aldrich, Missouri, MO USA) and Man, Rogosa, and Sharpe Agar (Oxoid Ltd., Hampshire, England) with 0.04% cycloheximide (Sigma-Aldrich, Missouri, USA), respectively. Plates were incubated for four days at 28 °C, in aerobic and anaerobic conditions. Every bacterial or yeast colony that exhibited a different morphology was isolated using either aerobic or anaerobic conditions and identified to species level as described below.

Results were analyzed by ANOVA and significant differences between means were determined by an LSD test at a significance level of 0.05 using the INFOSTAT software package version 2017 (<https://www.infostat.com.ar>) (Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina, 2009).

4.6. Molecular Identification of Yeast

Yeast isolates were identified by sequence analysis of the D1/D2 variable domain. DNA extraction was carried out as described by Schena et al. (1999) [52]. PCR fragments were generated using primers ITS1 [53] and D2R [54] as described by Martinez et al. (2016) [55]. PCR products were visualized by electrophoresis on 0.8% agarose gel. Nucleotide sequences of the PCR products were obtained with primer D2R at Macrogen (Macrogen Inc., Seoul, Korea) and compared to NCBI databases using BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

4.7. Molecular Identification of Bacteria

Lactic and acetic acid bacteria were identified by sequence analysis of a partial sequence of 16S ribosomal DNA. Alkaline lysis was carried out for DNA extraction. Bacterial cultures grown in Man, Rogosa, and Sharpe Agar (MRS, Oxoid Ltd., England) for 48 h were suspended in 100 µL of a NaOH solution (0.05 M) and incubated for 15 min at 95 °C. The suspensions were then centrifuged at 1000 rpm for 2 min and the supernatants were retained. PCR reactions were performed in a MultiGene Mini Personal TC020-24 thermocycler (Labnet International Inc., New Jersey, NJ USA) in a total reaction volume of 25 µL consisting of 2.5 µL of 10× buffer, 2.5 µL of dNTPs (2 mM each), 1.5 µL of MgCl₂ (25 mM), 1 µL of primer 27F (10 µM) [56], 1 µL of primer 1492R (10 µM) [56], 0.2 µL of Taq DNA Polymerase (2.5 U/µL) (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, MA USA), 1 µL of bacterial lysis supernatant and sterile MiliQ water up to 25 µL. The PCR protocol consisted of an initial heating step of 5 min at 94 °C, followed by 35 cycles of 1 min at 94 °C for template denaturation, 2 min at 55 °C for primer annealing, and 3 min at 72 °C for primer extension, with a final extension at 72 °C for 10 min. PCR products were visualized by electrophoresis on 0.8% agarose gel. Amplicons were purified and sequenced in forward direction at Macrogen (Macrogen Inc., Seoul, Korea). Nucleotide sequences of the PCR products were compared to NCBI databases using BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

4.8. Phylogenetic Analysis

Phylogenetic analysis of D1/D2 sequences for yeast and ribosomal RNA 16S sequences for bacteria were conducted using MEGA version 7 (University, Pennsylvania, PA USA). DNA sequences were aligned with sequences of homologous regions of closely related type strains retrieved from GenBank. In all cases, evolutionary distances were computed using Jukes–Cantor method, and phylogenetic trees were obtained by neighbor-joining. Stability of clades was assessed with 1000 bootstrap replications.

4.9. Characterization of the Fungal and Bacterial Microbiota Using Metabarcoding and High-Throughput Sequencing

Characterization of the microbiota of T1 mini-silos before and after incubation were conducting by metabarcoding and high-throughput sequencing. Genomic DNA was extracted directly from the product using the same extraction kit as described above, following the manufacturer's instructions. Total DNA from each sample was quantified in a spectrophotometer ($\lambda = 260$ nm) (Nanodrop; Thermo Fisher Scientific Inc.) and the DNA concentration was adjusted to 5.0 ng/µL. The ITS 2 region

of fungal rRNA was amplified with the universal primers ITS3/KYO2 and ITS4 [57]. The V4 region of bacterial 16S rRNA was amplified using the universal primers 515F and 806R [58]. A pair of peptide-nucleic-acids (PNA) were incorporated into the PCR amplification to reduce the generation of non-target chloroplast and mitochondrial amplicons. All primers were modified to include Illumina adaptors (www.illumina.com). PCR reactions were conducted in a total volume of 25 μ L containing 12.5 μ L of KAPA HiFi HotStart ReadyMix (Kapa Biosystems, Wilmington, MA, USA), 1.0 μ L of each primer (10 μ M), 2.5 μ L of DNA template, and 8.0 μ L nuclease free water. Reactions were incubated in a T100 thermal cycler (Bio-Rad, California, CA USA) for 3 min at 98 $^{\circ}$ C followed by 30 cycles of 30 s at 95 $^{\circ}$ C, 30 s at 50 $^{\circ}$ C, and 30 s at 72 $^{\circ}$ C. All reactions ended with a final extension of 1 min at 72 $^{\circ}$ C. Nuclease-free water (QIAGEN, Valencia, CA, USA) replaced template DNA in negative controls. All amplicons and amplification mixtures including negative controls were sequenced on a MiSeq platform using V2 chemistry (Illumina, San Diego, CA USA).

4.10. Data Analysis of Amplicon Sequences

Paired-end reads were merged using PEAR 0.9.6 paired-end read merger [59] and default parameters. The CLC genomics workbench V8 (Qiagen) was used for primer and quality trimming with a minimum of Q20. Sequences without either primer were discarded. Chimeric sequences were identified and filtered using VSEARCH 1.4.0 [60]. The UCLUST algorithm [61] of the software package QIIME 1.9.1 [62] was used to cluster sequences at a similarity threshold of 97% against the UNITE dynamic database released on 31.01.2016 [63] for ITS2 reads and Greengenes Database for the 16S rRNA reads. Singletons were removed and sequences that failed to cluster against the database were de novo clustered using the same algorithm. The most abundant sequences in each OTU were selected as representative sequences and used for the taxonomic assignment using the BLAST algorithm [64] as implemented in QIIME 1.9.1. The OTU table was normalized by rarefaction to an even sequencing depth to remove sample heterogeneity. The rarefied OTU table was used to calculate alpha diversity indices, including Chao1 and Shannon metrics, using the PAST program [65]. A phylogenetic tree was generated for the OTUs corresponding to *Lactobacillus* genera using MEGA version 7, including sequences from type strains retrieved from GenBank. The neighbor-joining method was used and evolutionary distances were computed using Jukes–Cantor method. Stability of clades was assessed with 1000 bootstrap replications.

Author Contributions: Conceptualization, M.G., G.G., S.V., C.R., A.L.P., M.W. and S.D.; methodology, M.G., S.V., G.G., C.R. and M.W.; software, M.G.; validation, S.V., C.R. and M.W.; formal analysis, M.G., S.V. and M.W.; investigation, M.G., S.V., C.R. and M.W.; resources, S.V., C.R., S.D. and M.W.; data curation, S.V., C.R. and M.W.; writing—original draft preparation, M.G., G.G. and S.V.; writing—review and editing, M.W., C.R., G.G. and S.V.; visualization, M.G.; supervision, S.V., C.R. and M.W.; project administration, S.V. and M.W.; funding acquisition, S.V., M.W. and S.D.

Funding: This research was funded by a grant from Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC Uruguay) provided by S. Vero and a grant from the U.S.-Israel Binational Agricultural Research and Development Fund (BARD), IS-5040-17, provided to S. Droby and M. Wisniewski. The APC was funded by BARD.

Acknowledgments: We are very grateful to the Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC Uruguay), Comisión Académica de Posgrado (CAP), Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII) and Programa de Desarrollo de Ciencias Básicas (Pediciba) who supported this work.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Pahlow, G.; Muck, R.E.; Driehuis, F.; Oude Elferink, S.J.W.H.; Spoelstra, S.F. Microbiology of ensiling. In *Silage Science and Technology*; Buxton, D.R., Muck, R.E., Harrison, J., Eds.; American Society of Agronomy: Madison, Wisconsin, WI, USA, 2003; pp. 31–93, ISBN 0891181512.
2. Scarpitta, N. Qué necesitamos conocer sobre el silo de grano húmedo de sorgo? *Rev. Plan Agropecu.* **2008**, *126*, 48–54.

3. Chiossone, J.; Misi, O.; Vicini, R. Available online: <http://inta.gob.ar/documentos/silaje-de-sorgo/> (accessed on 1st June 2019).
4. Borreani, G.; Tabacco, E.; Schmidt, R.J.; Holmes, B.J.; Muck, R.E. Silage review: Factors affecting dry matter and quality losses in silages. *J. Dairy Sci.* **2018**, *101*, 3952–3979.
5. Alonso, V.A.; Pereyra, C.M.; Keller, L.A.M.; Dalcero, A.M.; Rosa, C.A.R.; Chiacchiera, S.M.; Cavaglieri, L.R. Fungi and mycotoxins in silage: An overview. *J. Appl. Microbiol.* **2013**, *115*, 637–643.
6. Wambacq, E.; Vanhoutte, I.; Audenaert, K.; De Gelder, L.; Haesaert, G. Occurrence, prevention and remediation of toxigenic fungi and mycotoxins in silage: A review. *J. Sci. Food Agric.* **2016**, *96*, 2284–2302.
7. García y Santos, C.; Hugo, I.; Suárez, G.; Capella, A.; Domínguez, R.; Sosa, S. Dinámica del pH en microsilos experimentales, con distintos niveles de humedad y el agregado de inoculante. *Vet.* **2012**, *48*, 142.
8. Keller, L.; Pereyra, C.M.; Cavaglieri, L.; Keller, K.; Almeida, T.X.; Deveza, M. V.; Assad, R.Q.; Rocha Rosa, C. Fungi and aflatoxin B1 in pre and post fermented sorghum trench type silos destined to bovine intensive-rearing in Brazil. *Rev. Bio. Ciencias Sist. Nac. Investig.* **2012**, *2*, 81–91.
9. Rodríguez, A.; Rodríguez, M.; Luque, M.I.; Martín, A.; Córdoba, J.J. Real-time PCR assays for detection and quantification of aflatoxin-producing molds in foods. *Food Microbiol.* **2012**, *31*, 89–99.
10. Alhaag, H.; Yuan, X.; Mala, A.; Bai, J.; Shao, T. Fermentation Characteristics of *Lactobacillus Plantarum* and *Pediococcus* Species Isolated from Sweet Sorghum Silage and Their Application as Silage Inoculants. *Appl. Sci.* **2019**, *9*, 1247.
11. Gamba, R.R.; Colo, C.N.; Correa, M.; Astoreca, A.; Alconada, T.; Antoni, G. De; Peláez, A.L. Antifungal activity against *Aspergillus parasiticus* of supernatants from whey permeates fermented with kéfir grains. *Adv. Microbiol.* **2015**, *05*, 479–492.
12. Passoth, V.; Schnürer, J. Non-conventional yeasts in antifungal application. In *Functional Genetics of Industrial Yeasts. Topics in Current Genetics*; de Winde, J.H., Eds.; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, **2003**; *2*, pp. 297–329, ISBN 978-3-540-37003-1.
13. Druvefors, U.; Schnürer, J. Mold-inhibitory activity of different yeast species during airtight storage of wheat grain. *Fems Yeast Res.* **2005**, *5*, 373–378.
14. Fredlund, E.; Gidlund, A.; Olsen, M.; Börjesson, T.; Spliid, N.H.H.; Simonsson, M. Method evaluation of Fusarium DNA extraction from mycelia and wheat for down-stream real-time PCR quantification and correlation to mycotoxin levels. *J. Microbiol. Methods* **2008**, *73*, 33–40.
15. Olstorpe, M.; Borling, J.; Schnürer, J.; Passoth, V. *Pichia anomala* yeast improves feed hygiene during storage of moist crimped barley grain under Swedish farm conditions. *Anim. Feed Sci. Technol.* **2010**, *156*, 47–56.
16. Duniere, L.; Jin, L.; Smiley, B.; Qi, M.; Rutherford, W.; Wang, Y.; McAllister, T. Impact of adding *Saccharomyces* strains on fermentation, aerobic stability, nutritive value, and select lactobacilli populations in corn silage. *J. Anim. Sci.* **2015**, *93*, 2322–2335.
17. Schnürer, J.; Jonsson, A. *Pichia anomala* J121: A 30-year overnight near success biopreservation story. *Antonie Van Leeuwenhoek* **2011**, *99*, 5–12.
18. Thakkar, A.; Saraf, M. Development of microbial consortia as a biocontrol agent for effective management of fungal diseases in *Glycine max* L. *Arch. Phytopathol. Plant Prot.* **2015**, *48*, 459–474.
19. Gamba, R.R.; Caro, C.A.; Martínez, O.L.; Moretti, A.F.; Giannuzzi, L.; De Antoni, G.L.; León Peláez, A. Antifungal effect of kefir fermented milk and shelf life improvement of corn arepas. *Int. J. Food Microbiol.* **2016**, *235*, 85–92.
20. Droby, S.; Wisniewski, M. The fruit microbiome: A new frontier for postharvest biocontrol and postharvest biology. *Postharvest Biol. Technol.* **2018**, *140*, 107–112.
21. Droby, S.; Wisniewski, M.; Teixidó, N.; Spadaro, D.; Jijakli, M.H. The science, development, and commercialization of postharvest biocontrol products. *Postharvest Biol. Technol.* **2016**, *122*, 22–29.
22. Gultiz, A.; Stadie, J.; Wenning, M.; Ehrmann, M.A.; Vogel, R.F. The microbial diversity of water kefir. *Int. J. Food Microbiol.* **2011**, *151*, 284–288.
23. Laureys, D.; De Vuyst, L. Microbial species diversity, community dynamics, and metabolite kinetics of water Kefir fermentation. *Appl. Env. Microbiol.* **2014**, *80*, 2564–2572.
24. Guzel-Seydim, Z.B.; Kok-Tas, T.; Greene, A.K.; Seydim, A.C. Review: Functional Properties of Kefir. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2011**, *51*, 261–268.
25. Dong-Hyeon, K.; Jung-Whan, C.; Hyunsook, K.; Kun-Ho, S. Modulation of intestinal microbiota in mice by kefir administration. *Food Sci. Biotechnol.* **2015**, *24*, 1397–1403.
26. Vinderola, C.G.; Duarte, J.; Thangavel, D.; Perdigón, G.; Farnworth, E.; Matar, C. Immunomodulating

- capacity of kefir. *J. Dairy Res.* **2005**, *72*, 195–202.
27. Kim, D.-H.; Jeong, D.; Kim, H.; Kang, I.-B.; Chon, J.-W.; Song, K.-Y.; Seo, K.-H. Antimicrobial Activity of Kefir against Various Food Pathogens and Spoilage Bacteria. *Korean J. Food Sci. Anim. Resour.* **2016**, *36*, 787–790.
 28. Ismaiel, A.A.; Ghaly, M.F.; El-Naggar, A.K. Milk Kefir: Ultrastructure, Antimicrobial Activity and Efficacy on Aflatoxin B1 Production by *Aspergillus flavus*. *Curr. Microbiol.* **2011**, *62*, 1602–1609.
 29. Ryan, M.P.; Rea, M.C.; Hill, C.; Ross, R.P. An application in cheddar cheese manufacture for a strain of *Lactococcus lactis* producing a novel broad-spectrum bacteriocin, lacticin 3147. *Appl. Env. Microbiol.* **1996**, *62*, 612–619.
 30. Rodrigues, K.L.; Caputo, L.R.G.; Carvalho, J.C.T.; Evangelista, J.; Schneedorf, J.M. Antimicrobial and healing activity of kefir and kefir extract. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2005**, *25*, 404–408.
 31. Sun, Z.; Yu, J.; Dan, T.; Zhang, W.; Zhang, H. Phylogenesis and Evolution of Lactic Acid Bacteria. In *Lactic Acid Bacteria: Fundamentals and Practice*. Zhang, H., Cai, Y., Eds.; Springer Netherlands: Dordrecht, 2014; pp. 1–101, ISBN 978-94-017-8841-0.
 32. De Vos, P.; Garrity, G.; Jones, D.; Krieg, N.; Ludwig, W.; Rainey, F.; Schleifer, K.-H.; Whitman, W. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. The Firmicutes*; Whitman, W.B., Ed.; 2nd ed.; Springer New York: New York, NY, USA, 2009; 3, ISBN 978-0-387-95041-9.
 33. Muck, R.E.; Nadeau, E.M.G.; McAllister, T.A.; Contreras-Govea, F.E.; Santos, M.C.; Kung, L. Silage review: Recent advances and future uses of silage additives. *J. Dairy Sci.* **2018**, *101*, 3980–4000.
 34. Shehata, M.G.; Badr, A.N.; El Sohaimy, S.A.; Asker, D.; Awad, T.S. Characterization of antifungal metabolites produced by novel lactic acid bacterium and their potential application as food biopreservatives. *Ann. Agric. Sci.* **2019**.
 35. Fernandez-Pacheco, P.; Arévalo-Villena, M.; Bevilacqua, A.; Corbo, M.R.; Briones Pérez, A. Probiotic characteristics in *Saccharomyces cerevisiae* strains: Properties for application in food industries. *LWT* **2018**, *97*, 332–340.
 36. Lutz, M.C.; Lopes, C.A.; Rodriguez, M.E.; Sosa, M.C.; Sangorrín, M.P. Efficacy and putative mode of action of native and commercial antagonistic yeasts against postharvest pathogens of pear. *Int. J. Food Microbiol.* **2013**, *164*, 166–172.
 37. Santos, R.; Buisson, N.; Knight, S.A.B.; Dancis, A.; Camadro, J.-M.; Lesuisse, E. *Candida albicans* lacking the frataxin homologue: A relevant yeast model for studying the role of frataxin. *Mol. Microbiol.* **2004**, *54*, 507–519.
 38. Druvefors, U.A.; Passoth, V.; Schnürer, J. Nutrient effects on biocontrol of *Penicillium roqueforti* by *Pichia anomala* J121 during airtight storage of wheat. *Appl. Env. Microbiol.* **2005**, *71*, 1865–1869.
 39. Fiorda, F.A.; de Melo Pereira, G.V.; Thomaz-Soccol, V.; Rakshit, S.K.; Pagnoncelli, M.G.B.; Vandenberghe, L.P. de S.; Soccol, C.R. Microbiological, biochemical, and functional aspects of sugary kefir fermentation—A review. *Food Microbiol.* **2017**, *66*, 86–95.
 40. Yoo, J.A.; Lim, Y.M.; Yoon, M.H. Production and antifungal effect of 3-phenyllactic acid (PLA) by lactic acid bacteria. *J. Appl. Biol. Chem.* **2016**, *59*, 173–178.
 41. Magnusson, J.; Schnürer, J. *Lactobacillus coryniformis* subsp. *coryniformis* Strain Si3 Produces a Broad-Spectrum Proteinaceous Antifungal Compound. *Appl. Env. Microbiol.* **2001**, *67*, 1–5.
 42. Gerez, C.; J.; Torres, M.; Valdez, G.; Rollán, G. Control of spoilage fungi by lactic acid bacteria. *Biol. Control* **2013**, *64*, 231–237.
 43. Cleusix, V.; Lacroix, C.; Vollenweider, S.; Duboux, M.; Le Blay, G. Inhibitory activity spectrum of reuterin produced by *Lactobacillus reuteri* against intestinal bacteria. *Bmc Microbiol.* **2007**, *7*, 101.
 44. Ryu, E.H.; Yang, E.J.; Woo, E.R.; Chang, H.C. Purification and characterization of antifungal compounds from *Lactobacillus plantarum* HD1 isolated from kimchi. *Food Microbiol.* **2014**, *41*, 19–26.
 45. Arrarte, E.; Garmendia, G.; Rossini, C.; Wisniewski, M.; Vero, S. Volatile organic compounds produced by Antarctic strains of *Candida sake* play a role in the control of postharvest pathogens of apples. *Biol. Control* **2017**, *109*, 14–20.
 46. Passoth, V.; Fredlund, E.; Druvefors, U.Ä.; Schnürer, J. Biotechnology, physiology and genetics of the yeast *Pichia anomala*. *Fems Yeast Res.* **2006**, *6*, 3–13.
 47. Muccilli, S.; Restuccia, C. Bioprotective Role of Yeasts. *Microorganisms* **2015**, *3*, 588–611.
 48. Lipinska, L.; Klewicki, R.; Sójka, M.; Bonikowski, R.; Żyżelewicz, D.; Kolodziejczyk, K.; Klewicka, E. Antifungal Activity of *Lactobacillus pentosus* ŁOCK 0979 in the Presence of Polyols and Galactosyl-Polyols.

- Probiotics Antimicrob. Proteins* **2018**, *10*, 186–200.
49. Shweta, S.; Madhavan, S.; Paranidharan, V.; Velazhahan, R. Detection of *Aspergillus flavus* in maize kernels by conventional and real-time PCR assays. *Int. Food Res. J.* **2013**, *20*, 3329–3335.
 50. Dorak, M.T. *Real-Time PCR*; Taylor & Francis Group: Oxford, UK, 2006; ISBN 041537734X.
 51. Petersson, S.; Schnurer, J. Biocontrol of mold growth in high-moisture wheat stored under airtight conditions by *Pichia anomala*, *Pichia guilliermondii*, and *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Env. Microbiol.* **1995**, *61*, 1027–1032.
 52. Schena, L.; Ippolito, A.; Zahavi, T.; Cohen, L.; Nigro, F.; Droby, S. Genetic diversity and biocontrol activity of *Aureobasidium pullulans* isolates against postharvest rots. *Postharvest Biol. Technol.* **1999**, *17*, 189–199.
 53. White, T.J.; Bruns, T.; Lee, S.; Taylor, J. Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics. In: Innis, M.A., Gelfand, D.H. and Sninsky, J.J., Eds ; Academic Press: San Diego, New York, NY, USA, 1990; pp. 315–322, ISBN 978-0-12-372180-8.
 54. Peterson, S.W.; Horn, B.W. *Penicillium parvulum* and *Penicillium georgiense*, sp. nov., isolated from the conidial heads of *Aspergillus* species. *Mycologia* **2009**, *101*, 71–83.
 55. Martinez, A.; Cavello, I.; Garmendia, G.; Rufo, C.; Cavalitto, S.; Vero, S. Yeasts from sub-Antarctic region: Biodiversity, enzymatic activities and their potential as oleaginous microorganisms. *Extremophiles* **2016**, *20*, 759–769.
 56. Hogg, J.C.; Lehane, M.J. Identification of bacterial species associated with the sheep scab mite (*Psoroptes ovis*) by using amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Env. Microbiol.* **1999**, *65*, 4227–4229.
 57. Toju, H.; Tanabe, A.S.; Yamamoto, S.; Sato, H.; Larsson, K.; Gilles, A. High-Coverage ITS Primers for the DNA-Based Identification of Ascomycetes and Basidiomycetes in Environmental Samples. *Plos ONE* **2012**, *7*, e40863.
 58. Lundberg, D.S.; Yourstone, S.; Mieczkowski, P.; Jones, C.D.; Dangl, J.L. Practical innovations for high-throughput amplicon sequencing. *Nat. Methods* **2013**, *10*, 999–1002.
 59. Zhang, J.; Kobert, K.; Flouri, T.; Stamatakis, A. PEAR: A fast and accurate Illumina Paired-End reAd mergeR. *Bioinformatics* **2014**, *30*, 614–620.
 60. Rognes, T.; Mahé, F.; Flouri, T.; McDonald, D.; Schloss, P. VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics. *PeerJ.* **2016**, *4*:e2584.
 61. Edgar, R.C. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics* **2010**, *26*, 2460–2461.
 62. Caporaso, J.G.; Kuczynski, J.; Stombaugh, J.; Bittinger, K.; Bushman, F.D.; Costello, E.K.; Fierer, N.; Peña, A.G.; Goodrich, J.K.; Gordon, J.I.; et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat. Methods* **2010**, *7*, 335–336.
 63. Abarenkov, K.; Henrik Nilsson, R.; Larsson, K.-H.; Alexander, I.J.; Eberhardt, U.; Erland, S.; Høiland, K.; Kjølner, R.; Larsson, E.; Pennanen, T.; et al. The UNITE database for molecular identification of fungi—recent updates and future perspectives. *New Phytol.* **2010**, *186*, 281–285.
 64. Altschul, S.F.; Gish, W.; Miller, W.; Myers, E.W.; Lipman, D.J. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **1990**, *215*, 403–410.
 65. Ryan, P.D.; Hammer, Ø.; Harper, D.A.; Paul Ryan, D.D. PAST: paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontol. Electron.* **2001**, *4*, 5–7.

