

UNIVERSIDAD
NACIONAL DE LA
PATAGONIA SAN
JUAN BOSCO

Facultad de Ciencias
Naturales y Ciencias
de la Salud

Sede Trelew

Seminario de Licenciatura en Protección y
Saneamiento ambiental

UTILIZACIÓN DE RESIDUOS AGROINDUSTRIALES PARA EL DISEÑO DE UN PROTOTIPO DE ALIMENTO FUNCIONAL

Alumna: Hormaeche, Mercedes Agustina

Director: Lic. Sosa, Franco Matias

Co-directora: Dra. Vallejo, Marisol

Año 2024

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS.....	3
RESUMEN.....	5
INTRODUCCIÓN	7
Residuos agroindustriales: su aprovechamiento.....	7
<i>Lactosuero</i>	8
<i>Residuos cerveceros</i>	9
<i>Residuos pesqueros</i>	10
Microorganismos probióticos.....	11
<i>Bacterias Acido Lácticas</i>	12
<i>Género Bacillus</i>	12
<i>Bacillus clausii</i> como probióticos	12
<i>Bacillus en la cría de animales</i>	14
OBJETIVOS.....	16
MATERIALES Y MÉTODOS.....	17
Material biológico	17
Aislamiento de las cepas	17
Actividad proteolítica	18
Utilización de carbohidratos	18
Utilización de residuos agroindustriales para el cultivo de <i>B. clausii</i>	18
Evaluación de la actividad antimicrobiana	18
Prototipo de alimento funcional en base a músculo de pescado	19
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	21
CONCLUSIONES	27
BIBLIOGRAFÍA.....	28

AGRADECIMIENTOS

En mis primeros pasos por la universidad pública, transcurridos en la provincia de Buenos Aires, adquirí un concepto erróneo de la palabra *alumno*, la cual surgió de una corriente de pensamiento que interpretaba que ésta provenía del latín -a lumnen- y significaba “sin luz”. Por lo tanto, ocupar este rol, implicaba ocupar el lugar de alguien que necesitaba ser iluminado por otra persona. Sin embargo, la palabra alumno, del latín -alumnus- derivado de alĕre (raíz indoeuropea) significa “crecer, alimentar” (el que se alimenta, el que crece). Por lo tanto, en esta ocasión me gustaría agradecer a todos los que contribuyeron a mi crecimiento profesional durante mi formación de grado.

Por encima de todo, quiero agradecer a Lila y a Ramón, mis padres, que siempre alimentaron en mí el deseo de aprender, de crecer y de nunca rendirme. Aunque ya no están conmigo, su influencia fue fundamental para que llegue hasta esta etapa final.

Agradezco profundamente a cada uno de mis profesores, quienes no solo me acompañaron a lo largo de toda la carrera, sino que también mostraron una gran comprensión y empatía ante las diversas situaciones que enfrenté en cada etapa. Supieron ajustar visitas a empresas, fechas de exámenes para que pudiera rendir sin dificultades, teniendo en cuenta momentos tan significativos como mi casamiento, los embarazos, las lactancias y las pérdidas de seres queridos.

A Marisol y Rogelio, quienes respondieron de inmediato a mi solicitud de una propuesta de trabajo, adaptándola a la carrera de LIPSA, habiendo trabajado siempre en la Licenciatura en Biología. No solo me sugirieron esta línea de investigación, sino que también me brindaron un apoyo invaluable al proporcionarme bibliografía y ayudándome a avanzar en el proceso. Agradezco profundamente su paciencia y acompañamiento durante este tiempo.

A Franco, por su asesoramiento e inmensa paciencia en la parte experimental del laboratorio. Aprecio profundamente su dedicación al enseñarme y sus valiosos consejos para la redacción de este documento. Su constante predisposición y rapidez para resolver mis dudas ha sido de gran ayuda.

A mi Hermana Carolina y mi cuñado Pablo, quienes me alentaron en la valiente y difícil decisión de dejar la vida en Buenos Aires para continuar mis estudios en la UNPSJB. Ellos comprendieron el reto que implicaba avanzar en una carrera universitaria mientras debía mantenerme y trabajar a tiempo completo. Su apoyo incondicional y económico durante los primeros años fue el impulso necesario para llegar hasta aquí, y sin su ayuda, no habría alcanzado esta etapa.

A mi hermano Pablo, por inspirarme con su deseo de progreso y haberme guiado durante mis primeros años lejos de la protección de nuestros padres. Muchas veces asumió el rol de papá, y en ese proceso de dejar el nido, nunca me dejó sola.

A Silvia, por su cariño y apoyo. Por tratarme como a una hija, y por acompañarme en alguno de mis momentos más difíciles.

A Iván, mi amado esposo y compañero tanto en la vida como en la profesión. Quiero expresarle mi más profundo agradecimiento por haber sido mi pilar y complemento durante toda la cursada. Por el equipo cooperativo que formamos juntos, alternándonos para alcanzar nuestras metas: finalizar la carrera y desarrollarnos en nuestra profesión. De este modo, logramos un equilibrio perfecto entre ejercer como profesionales y desempeñar nuestro rol de padres, brindando la atención necesaria a nuestros hermosos hijos, especialmente en las etapas más vulnerables de su desarrollo.

A mis hijos, Abdías y Franchesco, por la paciencia en este tiempo en el que tuve que dedicar muchas horas a sentarme en la compu, y por aprender a esperar las pausas para poder jugar juntos. Gracias por ser mi fuente inagotable de amor y felicidad.

A mis compañeros de cursadas, por las horas de estudios compartidos y los grupos de trabajo. Por las experiencias vividas que permanecerán en nuestros recuerdos, de esta etapa tan especial como estudiantes.

Al personal no docente, por su acompañarme desde la parte administrativa durante toda esta etapa, asesorándome y guiándome en cada paso.

A la Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco por brindarme acceso a una educación pública, gratuita y de calidad, permitiéndome alcanzar un título de grado, a pesar de provenir de una clase trabajadora.

Y sobre todo a Dios, que en ningún momento apartó de sí mi oración, ni de mí su misericordia.

RESUMEN

La demanda actual de recursos naturales, cuyo fin es mantener el estilo de vida de la población mundial y la capacidad del planeta de asimilar los desechos generados, son los principales inconvenientes que afectan al ambiente y limitan las posibilidades de un desarrollo sostenible. Por lo tanto, se necesitan acciones para que el modelo productivo actual incorpore la etapa de recuperación, de modo tal que permita avanzar hacia un modelo circular. En la actualidad se generan millones de toneladas de residuos, que por su inadecuada gestión terminan impactando negativamente al ambiente. Sin embargo, reutilizarlos para la generación de elementos de interés biotecnológico se presenta como una alternativa interesante al ser económicos y ecológicos. En este contexto, el objetivo general del presente trabajo fue la utilización de residuos agroindustriales como potencial medio de cultivo de cepas de *Bacillus clausii* (conocidas por su utilización en productos farmacéuticos para la restauración de la microbiota intestinal) y su potencial uso en la elaboración de alimentos funcionales.

Para realizar este trabajo se utilizaron esporas de cuatro cepas de *B. clausii* (O/C, N/R, T y SIN) obtenidas de un medicamento de venta libre, mediante su separación con antibióticos específicos. Las cepas se conservaron a 4 °C y se repicaron cada 7-10 días durante el estudio. Se evaluó la actividad proteolítica de los cultivos de las cuatro cepas y de sus sobrenadantes libres de células, mediante el agar Davis y leche descremada al 3%. Se detectó halo de hidrólisis alrededor de las colonias para las cepas O/C, N/R y T después de 24 h de incubación a 37 °C. La fermentación de maltosa y lactosa se determinó en caldo nutritivo con la adición de púrpura de bromocresol azida (indicador de pH), incubando las cepas durante 48 h a 37 °C. Las cepas O/C, N/R y SIN fermentaron los disacáridos, exhibiendo su potencial para la utilización en los residuos agroindustriales (suero lácteo y *hot trub*).

Se evaluó el crecimiento de las cuatro cepas en suero lácteo y *hot trub*, neutralizados, centrifugados y esterilizados, incubándolas durante 6 días a 37 °C y monitoreando la viabilidad cada 48 h. Ambos residuos resultaron aptos para el crecimiento de todas las cepas de *B. clausii*, mostrando potencial para ser utilizados eficazmente como medios de cultivos económicos y accesibles.

Los sobrenadantes libres de células de las cuatro cepas se evaluaron mediante el ensayo de difusión en placa para la determinación de actividad antimicrobiana contra *Listeria innocua* ATCC 33090 y *L. monocytogenes* Scott A. No se detectó actividad antilisteria en ninguna de las cepas evaluadas bajo las condiciones utilizadas.

Se preparó una matriz con músculo de pez gallo (*Callorhinchus callorhynchus*), almidón y levadura, inoculada con bacterias ácido lácticas previamente seleccionadas y las cepas de *B. clausii*. Se incubaron durante 7 días a 18 °C, tomando muestras para evaluar su viabilidad al inicio, a los 3 días y al final del ensayo. Los resultados del estudio demostraron que las cepas O/C, SIN y T pueden sobrevivir y proliferar en la matriz ensayada. En consecuencia, en el presente estudio se demostró que ciertas cepas de *B. clausii* pueden sobrevivir y proliferar en matrices de fermentación a base de pescado, lo que sugiere un potencial prometedor para la incorporación de estos probióticos en productos pesqueros.

INTRODUCCIÓN

La preservación del ambiente constituye uno de los principales desafíos para los países y sus ciudadanos, especialmente al enfrentar los serios problemas de contaminación y deterioro ambiental que actualmente padecemos, tras años de explotación de los recursos naturales, particularmente desde la revolución industrial (Carson, 1962; Meadows *et al.*, 1972).

El desarrollo sostenible tiene sus raíces en el crecimiento global sin precedentes que se ha observado desde la segunda mitad del siglo XX. Aunque este crecimiento ha permitido avances sociales significativos en algunas regiones del mundo, también ha acarreado efectos ambientales muy negativos. Además, se deben considerar diversos desastres ambientales (como el escape de la fábrica de plaguicidas de Bhopal y el accidente de la central nuclear de Chernobyl), así como eventos económicos y políticos (como la segunda crisis del petróleo), que ocurrieron desde principios de la década de 1970 hasta mediados de los años 80 (Guha, 2000).

La economía circular es un concepto que se interrelaciona con el desarrollo sostenible y cuyo objetivo es que el valor de los productos, los materiales y los recursos se mantengan en la economía durante el mayor tiempo posible. De esta forma, se reduce la generación de residuos al mínimo y se cierra su ciclo de vida, de modo tal que los residuos no sean vistos como desecho sino como recursos (De Miguel *et al.*, 2021).

Residuos agroindustriales: su aprovechamiento

Los residuos agroindustriales se han transformado en un foco de atención a nivel mundial, debido a que parte de sus constituyentes pueden ser empleados como materia prima para generar productos de interés (Capanoglu & Tomás-Barberán, 2022). Al utilizar residuos se promueve la economía circular y se minimiza el impacto ambiental asociado a su disposición final (Awasthi *et al.*, 2022). La importancia de desarrollar bioprocesos de bajo costo utilizando residuos como materias primas radica en la búsqueda de alternativas sostenibles y económicamente viables en la industria.

Estos desechos se generan en grandes volúmenes durante el procesamiento y fabricación de alimentos y bebidas, representando un desafío para su gestión y la sostenibilidad ambiental (Mathias *et al.*, 2015). Debido a su alta concentración de materia orgánica, pueden causar daños severos a los ecosistemas si no se manejan adecuadamente. La descomposición anaeróbica de esta materia orgánica libera gases de efecto invernadero como el metano, y contaminan el suelo y las fuentes de agua a través de la lixiviación de nutrientes y compuestos tóxicos. Sin embargo, ciertos

residuos agroindustriales, como los generados por las industrias pesquera, láctea y cervecera, se presentan como las mejores opciones para su utilización como sustratos en la producción de elementos de interés biotecnológico, debido a que son económicos y amables con el ambiente (Kaur & Gupta, 2017). En consecuencia, la gestión adecuada de estos desechos agroindustriales no solo mitiga su impacto ambiental, sino que también puede transformar estos residuos en recursos valiosos, promoviendo un enfoque circular en la economía agroindustrial.

En el Valle Inferior del Rio Chubut (VIRCh), con sus 18.000 ha bajo riego, es una de las regiones productivas más importantes de la Patagonia (Diaz *et al.*, 2021). En el VIRCh se desarrollan distintas actividades agroindustriales que producen desechos que podrían ser utilizados en la producción de subproductos, como es el caso del lactosuero, los desechos cerveceros y descartes pesqueros.

Lactosuero

En la industria, los principales procesos contaminantes son los de elaboración de queso con la consecuente producción de lactosuero; crema y mantequilla por la mazada o mezcla de agua y suero producto del lavado de esta. Anualmente entre 100-115 millones de Tm de lactosuero son producidas a nivel mundial debido a la elaboración de quesos (González Cáceres, 2012). Argentina posee un desarrollo histórico en la producción lechera y derivados, superando los volúmenes requeridos para satisfacer la demanda interna, y donde la industria esta principalmente concentrada en Santa Fe, Córdoba y Buenos Aires (González Cáceres, 2012; Bargo, 2016). Se producen 36.508 millones de litros de leche, que se traducen en aproximadamente 4.095 millones de litros de suero por año (INTI, 2023).

El lactosuero, o suero lácteo, es el líquido que se separa de la leche durante la coagulación para producir queso y contiene todos los componentes de la leche que no se integran en la caseína coagulada. Se estima que por cada 10 litros de leche de vaca se pueden obtener entre 1 y 2 kg de queso y aproximadamente de 8 a 9 kg de suero (Valencia Denicia *et al.*, 2009). Representando alrededor del 90% del volumen de la leche, el suero incluye la mayor parte de los compuestos hidrosolubles, el 95% de la lactosa, el 25% de las proteínas y el 8% de la grasa láctea. Su composición varía según el origen de la leche y el tipo de queso producido, pero en general contiene aproximadamente un 93,1% de agua, un 4,9% de lactosa, un 0,9% de proteína cruda, un 0,6% de minerales (cenizas), un 0,3% de grasa, un 0,2% de ácido láctico y vitaminas hidrosolubles (Ramírez-Navas, 2012). Alrededor del 70% de la proteína cruda presente en el suero consiste en proteínas con un valor nutritivo superior al de la

caseína, como β -lactoglobulina, α -lactoglobulina, inmunoglobulinas, proteosa-peptonas y enzimas nativas (González Siso, 1996; González Cáceres, 2012). Los porcentajes anteriores nos indican el enorme desperdicio de nutrientes en la fabricación del queso, los cuales pasan a formar parte de las aguas residuales si se descargan sin tratamiento previo, convirtiéndose en un foco contaminante. Se estima que la transformación de 100.000 litros/día en quesos produce una contaminación equivalente a una población de 55.000 a 65.000 habitantes. Por ello debería evaluarse una revisión de la potencialidad del uso del suero, a partir de sus componentes (González Cáceres, 2012). La mayor parte del suero es utilizada en alimentación animal, transformado como derivados de lactosa, producción de suero en polvo para suplementación alimentaria y una muy baja proporción es tratada como efluente (Valencia Denicia *et al.*, 2009).

Residuos cerveceros

La producción de cerveza es otra fuente de desechos agroindustriales, y la misma ostenta la mayor tasa de consumo entre las bebidas alcohólicas a nivel mundial, registrándose aproximadamente 177,5 billones de litros en el 2020 (Santacruz-Salas *et al.*, 2023). En Argentina se presenta un fenómeno de aumento en la producción cervecera, en consonancia con una diversificación del mercado de la cerveza artesanal a nivel mundial, observándose una tasa de crecimiento anual del 30% (Colino *et al.*, 2017). Según datos del Centro de Cata, posteriormente chequeados con proveedores de levadura y malta (Colino *et al.*, 2017), en 2015 se produjeron 16 millones de litros de cerveza artesanal, tres millones más que en 2013 y, si bien no se conoce la composición de sus actores con claridad, diversos informes hablan de la existencia de 1.200 microproductores y 400 micro y pequeñas cervecerías en todo el país (Winkelman *et al.*, 2019). En la Patagonia hay registro de 200 cervecerías, y 42 de ellas se encuentran en la Provincia de Chubut (Colino *et al.*, 2017; Winkelman *et al.*, 2019).

Durante el proceso de elaboración, se generan residuos sólidos y líquidos, entre los que encontramos el bagazo de malta, producido durante la molienda de los granos; la levadura residual, generada durante el proceso de fermentación y la biomasa residual microbiana y el mosto producido. Por otra parte, el *hot trub* (turbio caliente) es un subproducto del proceso de hervido en la fabricación de cerveza, caracterizado por su alta concentración de humedad, estimada en 86,8% y su rica composición de materia orgánica, compuesta entre 50-70% de proteínas, 10-20% de sustancias amargas no isomerizadas procedentes del lúpulo, 5-10% de polifenoles, 4-8% de carbohidratos, 3-5% de minerales y entre 1 a 2% de ácidos grasos (Santacruz-Salas *et al.*, 2022).

Se estima que, por cada 100 litros de cerveza elaborada, se producen entre 14-20 kg de bagazo, 0,2-0,4 litros de turbio caliente y 1,5-3 kg de levadura que, considerando únicamente a la producción de China, Estados Unidos y Brasil se producen 143 millones de kg de bagazo, 2,5 millones de litros de turbio caliente y 19 millones de kg de levadura residual (Mathias *et al.*, 2017).

La mayor parte de los residuos cerveceros son utilizados en agricultura, sin embargo, debido a su rica composición en materia orgánica presenta un alto potencial para ser empleados en diversos bioprocesos industriales. Su contenido de proteínas y azúcares lo hace adecuado para su aplicación en la producción de biogás, extracción de diversos compuestos, compostaje y otros procesos de valorización de residuos orgánicos (Mathias *et al.*, 2017; Poladyan *et al.*, 2019; Radosavljević *et al.*, 2019).

Residuos pesqueros

En la mayoría de las pesquerías en el mundo generan capturas incidentales, aunque algunas se destacan por presentar mayores porcentajes de *bycatch*. A nivel global, las pesquerías de arrastre de camarón y langostino son consideradas las más problemáticas (Gillett, 2008; Kelleher, 2008). Esto se debe a que se utiliza un tamaño de malla relativamente pequeño para optimizar la operación y tiene como consecuencia un mayor porcentaje de capturas incidentales que son descartadas (Kelleher, 2008).

Se denomina captura incidental o *bycatch* a la captura de especies animales de tallas no comerciales o que no son objetivo de la pesquería, y que representa actualmente uno de los problemas más importantes que debe abordar la gestión pesquera (Kelleher, 2008; Góngora, 2011). La captura incidental y el descarte pesquero (parte de la captura que no es aprovechada o arrojada al mar por diversas razones) se consideran un desperdicio inaceptable moralmente (Kelleher, 2008). Esta práctica va en contra de una gestión responsable y del uso sostenible de los recursos marinos (Kelleher, 2008).

El Ministerio de Producción de la Provincia del Chubut informó que tanto la Provincia del Chubut, como la Patagonia Argentina, en su conjunto forman parte de uno de los ecosistemas marinos y de agua dulce más importantes del mundo. Con un litoral marítimo de 1.200 km², el sector pesquero es un pilar fundamental para el desarrollo económico, tanto provincial como nacional (<http://www.produccion.chubut.gov.ar/productosdemar>).

En la Provincia de Chubut se desarrollan dos importantes pesquerías industriales de arrastre de fondo: la pesquería de langostino (*Pleoticus muelleri*), de alto valor

económico; y la pesquería de merluza (*Merluccius hubbsi*), de alto valor ocupacional (Góngora *et al.*, 2012). En estas pesquerías participan tres tipos diferentes de flota: una flota tangonera congeladora que es responsable de más del 70% de los desembarques de langostino en Argentina y su área de operación es el Golfo San Jorge y aguas adyacentes. Una flota fresqueros de altura cuya principal especie objetivo es la merluza común, pero ocasionalmente se dirige al langostino en el Golfo San Jorge (Góngora *et al.*, 2012; Bovcon *et al.*, 2013) y una flota costera que opera en el Puerto Rawson (Ruibal Nuñez *et al.*, 2016) que tiene como especie objetivo el langostino y la merluza. Esta última flota es una histórica pesquería costera de arrastre en la Provincia del Chubut y opera dentro de la plataforma continental patagónica (Ruibal Nuñez *et al.*, 2016). Desde Puerto Rawson también se ha desarrollado una pesquerías de pequeña escala dirigida al camarón (*Artemesia longinaris*), que es la única especie explotada de la familia Penaeidae procedente de aguas de Bahía Engaño en la Provincia del Chubut (Soutric *et al.*, 2016).

El aprovechamiento de la fauna acompañante de una pesquería se ve afectada por la especie objetivo. Bovcon *et al.* (2013) observaron un aprovechamiento entre el 50% y el 60% de los taxones capturados en la pesquería de merluza común. Por el contrario, Soutric *et al.* (2016) detectaron un aprovechamiento del 20% de las capturas acompañantes, entre ellas el pez gallo (*Callorhynchus callorhynchus*) en la pesca del langostino. Si bien esta especie no posee un valor comercial de exportación y su consumo es regional, posee importantes características desde el punto de vista nutricional. Contiene proteínas de alto valor biológico, vitaminas A y D; minerales como yodo, zinc, fósforo y selenio; y ácidos grasos EPA y DHA, los cuales tienen funciones cardio y neuroprotectoras (Secretaría de Agroindustria, Ministerio de Producción y Trabajo, Presidencia de la Nación, 2014).

Microrganismos probióticos

Los probióticos son “microorganismos vivos que, cuando se administran en cantidades adecuadas, confieren un beneficio para la salud del hospedador”. Esta definición fue publicada conjuntamente por la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) en el año 2001, desde entonces, ha sido la más aceptada en todo el mundo (Ghelardi *et al.*, 2022; Giua *et al.*, 2024). En el año 2014 fue revisada y confirmada en una declaración de consenso por la Asociación Científica Internacional de Probióticos y Prebióticos.

Los productos identificados como probióticos están compuestos principalmente por bacterias pertenecientes a los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* (Elshagabee

et al., 2017; Acosta- Rodríguez-Bueno *et al.*, 2022), miembros habituales de la microbiota intestinal endógena (Saarela *et al.*, 2002).

Bacterias Acido Lácticas

Las Bacterias Acido Lácticas (BAL) comprenden un diverso grupo de microorganismos Gram positivos, no formadores de esporas, catalasa negativos, con morfología de cocos, cocobacilos, bacilos de longitud variable, inmóviles, con bajo contenido de guanina-citosina (G+C). Las BAL son anaerobias facultativas o aerotolerantes, capaces de fermentar carbohidratos para producir energía y ácido láctico. La mayor parte de las BAL pertenecen al Phylum Firmicutes, orden Lactobacillales; mientras que el resto corresponden al Phylum Actinobacteria (alto contenido de G+C), orden Bifidobacteriales, cuyo principal representante es el género *Bifidobacterium*. Los géneros *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* y *Weissella* son los más frecuentes en la fermentación de los alimentos (Mokoena, 2017). Sin embargo, recientemente se propuso fusionar Lactobacillaceae y Leuconostocaceae en una sola familia Lactobacillaceae y el género *Lactobacillus* se reclasificó en 25 géneros (Zheng *et al.*, 2020).

Cuando se consideran las fermentaciones de alimentos (a diferencia de las fermentaciones alcohólicas que involucran levaduras), las BAL son las principales responsables de muchas de las transformaciones que se producen en los alimentos fermentados más comunes. Estas bacterias son utilizadas en la industria alimentaria, no solamente por su habilidad de acidificar y preservar alimentos, sino también por su influencia en la textura, sabor, olor y desarrollo de aroma en los alimentos fermentados (Parra Huertas, 2010).

Genero Bacillus

El género *Bacillus* se encuentra estrechamente relacionado con el género *Lactobacillus*, e incluye especies grampositivas en forma de bastón, formadoras de esporas y capaces de vivir en condiciones aeróbicas o anaeróbicas facultativas. Entre estas especies se encuentran *B. coagulans*, *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. indicus* y *B. clausii* (Acosta- Rodríguez-Bueno *et al.*, 2022).

***Bacillus clausii* como probióticos**

B. clausii es una bacteria probiótica Gram positiva, aeróbica, formadora de esporas y con forma de bastón, resistente a los ácidos y capaz de colonizar el intestino (Paparo *et al.*, 2020).

Las cepas de *B. clausii* han sido utilizadas simultáneamente con antibióticos para minimizar los efectos secundarios gastrointestinales que provoca el tratamiento con estos medicamentos (Nista *et al.*, 2004). Un claro ejemplo son las cepas probióticas de *B. clausii*: O/C, N/R, SIN, T, que son comercializadas como medicamento de venta libre, que son bien tolerados y se han utilizado en humanos durante varias décadas (Abbrescia *et al.*, 2014). Estas cuatro cepas derivadas de una única cepa resistente a la penicilina, (*B. subtilis* ATCC 9799), fueron inicialmente clasificados como *B. subtilis* hasta su reclasificación como *B. clausii* en 2001 por Senesi *et al.* (Ghelardi *et al.*, 2022).

Sus características clave para garantizar un paso seguro a través del tracto gastrointestinal humano sin pérdida de viabilidad son: capacidad de formar esporas, tolerancia al ácido, al calor y a la sal (Ghelardi *et al.*, 2022), además de propiedades funcionales como la actividad antimicrobiana e inmunomodulación (Urdaci *et al.*, 2004).

Recientemente, Vecchione *et al.* (2018) determinaron que las esporas de las cepas de *B. clausii* (O/C, N/R, SIN y T) pueden mantenerse viables durante al menos 120 minutos en fluidos gástricos simulados, en contraste con la mayoría de los otros probióticos estudiados, que mostraron una reducción significativa en su viabilidad después de 30 minutos de exposición. Además, estas cepas de *B. clausii* fueron las únicas que pudieron reproducirse después de 240 minutos de exposición a líquidos intestinales simulados, destacándose frente a otros probióticos que experimentaron una disminución notable en su viabilidad en el mismo periodo (Vecchione *et al.*, 2018). Estos hallazgos sugieren que las cepas de O/C, N/R, SIN y T poseen características que les permiten colonizar efectivamente el tracto gastrointestinal.

Dentro de las propiedades fisiológicas de *B. clausii* se destaca su resistencia a antibióticos. Sin embargo, para que esta resistencia (intrínseca o natural) sea considerada un atributo de seguridad positivo de un probiótico, es crucial demostrar que no puede transferirse a otras bacterias (resistencia adquirida). Esto se alinea con las directrices para la evaluación de probióticos en alimentos de la FAO y la OMS (FAO/OMS, 2002) y permite su uso concomitantemente con un tratamiento con antibióticos (Ghelardi *et al.*, 2004). Las células vegetativas de las cepas O/C, N/R, SIN y T muestran resistencia intrínseca variable a diferentes antibióticos, entre los que se destacan el cloranfenicol, rifampicina, estreptomina y tetracilina, entre otros (Abbrescia *et al.*, 2014).

Bacillus en la cría de animales

Desde la década de 1960, la producción ganadera global ha incrementado considerablemente, como resultado directo del crecimiento de la población mundial y el aumento de la demanda de alimentos (Mingmongkolchai & Panbangred, 2018).

El uso de probióticos en la alimentación de ganado terrestre (pollo, cerdo, vaca) y acuático (cangrejos, camarones) ha crecido notablemente en los últimos diez años, debido a su asociación con la disminución de enfermedades y la mejora del rendimiento animal (Mingmongkolchai & Panbangred, 2018).

Se han realizado diversas investigaciones que han evidenciado que las esporas de *Bacillus* pueden germinar en el intestino delgado (Cartman *et al.*, 2008), actuando beneficiosamente en los animales anfitriones mediante mecanismos metabólicamente activos, tales como la secreción de sustancias antimicrobianas y la competencia con bacterias patógenas por nutrientes esenciales (Duc *et al.*, 2004).

Los probióticos se han utilizado en la producción avícola, especialmente en polluelos durante sus primeras etapas de vida, ya que nacen con un intestino estéril. Esta suplementación con probióticos restaura la microbiota intestinal protectora y facilita la competencia exclusiva. Alimentar a las aves con cepas probióticas de *Bacillus* no solo suprime la colonización de patógenos intestinales, sino que también puede mejorar la conversión alimenticia y el aumento de peso, así como la digestibilidad de los nutrientes y la capacidad de absorción del intestino delgado (Mingmongkolchai & Panbangred, 2018). Al igual que las aves de corral, los cerdos recién nacidos tienen un intestino estéril y adquieren su flora característica mediante el contacto con su madre y el ambiente. Los estudios de Kenny *et al.* (2011) y Kyriakis *et al.* (1999) demostraron que la administración de *Bacillus* a lechones destetados reducía la incidencia y gravedad de la diarrea, además de provocar una mejora en la conversión alimenticia y el aumento de peso.

A diferencia de los animales de granja terrestre que experimentan un desarrollo embrionario dentro de un amnios, las formas larvales de casi todos los animales acuáticos se liberan al ambiente externo en una etapa ontogenética temprana. También interactúan constantemente con patógenos oportunistas, que son una de las principales causas de mortalidad y pérdidas económicas en la acuicultura, a través de los procesos de osmorregulación y alimentación. Por lo tanto, se requieren tratamientos con probióticos durante las etapas larvarias para una mejora óptima de la microbiota intestinal autóctona (Mingmongkolchai & Panbangred, 2018).

Numerosos trabajos de investigación han demostrado que la aplicación de probióticos mejora la utilización del alimento y la tasa de crecimiento en varios peces ornamentales (Sahandi *et al.*, 2013; Lakshmi *et al.*, 2017). Aunque el mecanismo exacto por el cual los probióticos estimulan el crecimiento de los peces no está completamente dilucidado, las investigaciones indican que el consumo de probióticos aumenta la actividad de las enzimas digestivas en el tracto gastrointestinal, mejorando así la utilización de nutrientes y la digestión (Lakshmi *et al.*, 2017). Otros estudios han informado que la presencia de cepas probióticas mejora las condiciones de crecimiento al equilibrar la microbiota intestinal y reducir la flora patógena, lo que acelera la absorción de alimentos (De Angelis *et al.*, 2006).

El concepto de formulación de alimento funcional a base de probióticos para peces y camarones abre un nuevo paradigma para que la industria acuícola aumente el rendimiento y las ganancias de manera sostenible (Ochoa-Solano & Olmos-Soto, 2006).

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el crecimiento y desarrollo de *B. clausii* en subproductos provenientes de la industria alimentaria y su inclusión en el desarrollo de potenciales alimentos a base de subproductos para uso animal.

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1) Aislar las cepas de *B. clausii* provenientes de suplementos farmacéuticos empleando medios selectivos y diferenciales.
- 2) Estudiar la utilización de carbohidratos y actividad proteolítica de los aislamientos de *B. clausii*.
- 3) Evaluar el crecimiento y desarrollo de los microorganismos en residuos provenientes de la industria láctea y cervecera.
- 4) Determinar la actividad antagonista contra cepas patógenas de alimentos en medio comercial.
- 5) Realizar un prototipo de alimento en base a músculo de pescado, fermentado con cepas de *B. clausii* y BAL previamente seleccionadas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico

El presente trabajo se realizó en las instalaciones del Laboratorio de Biotecnología Bacteriana (LBB) que dispone la Cátedra de Biología Celular y Molecular de la Facultad de Ciencia Naturales y Ciencias de la Salud (FCNyCS) de la Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco de la ciudad de Trelew en la Provincia del Chubut.

Los microorganismos que se utilizaron durante los ensayos se obtuvieron de un medicamento de venta libre, que se presenta como una suspensión de esporas de cuatro cepas de *B. clausii* comercializado en Argentina como Enterogermina®. Además, se utilizaron las cepas *Lactiplantibacillus plantarum* AKTw180 y *Leuconostoc mesenteroides* spp. *jonggajibkimchi* RCTw1.1 provenientes de fermentaciones espontáneas de brasicáceas (akusai y repollo colorado, respectivamente) (Parada *et al.*, 2023).

Aislamiento de las cepas

En el inicio de la experiencia se inoculó una ampolla de 5 ml del producto farmacéutico que contiene aproximadamente $2 \cdot 10^9$ esporas de *B. clausii* (especie promotora de la restauración de la microbiota intestinal) en caldo nutritivo (Britania, Argentina) y se dejó incubar durante 4 h a 37 °C. Posteriormente, el aislamiento de las cuatro cepas presentes en la suspensión se realizó mediante un cultivo sólido compuesto por extracto de carne (Britania, Argentina) al 1% m/v, peptona (Britania, Argentina) al 1% m/v, extracto de levadura (Britania, Argentina) al 0,5% m/v y agar (Biokar, Francia) al 1,5%. Los medios de cultivo se suplementaron con distintas concentraciones de cloranfenicol (Sigma-Aldrich), rifampicina (Sigma-Aldrich), estreptocimicina (Sigma-Aldrich) y tetraciclina (Sigma-Aldrich) según lo propuesto por Abbrescia *et al.* (2014).

Con el propósito de obtener aislamientos puros, se realizaron repiques sucesivos en medios de cultivos suplementados con la concentración máxima de los antibióticos antes mencionados, según lo recomendado para su aislamiento. Posteriormente, se realizó la prueba de catalasa y coloración de Gram para su identificación preliminar.

Una vez obtenidos los aislamientos, las cepas se conservaron en placa de Petri y en pico de flauta a 4 °C en el cepario del Laboratorio de Biotecnología Bacteriana FCNyCS (Sede Trelew) como parte de la colección. Las cepas se repicaron cada 7-10 días para el mantenimiento de la viabilidad.

Actividad proteolítica

Para el ensayo de actividad proteolítica se utilizó el medio base Davis (Difco, EEUU), suplementado con 1,5% de agar y 3% m/v de leche descremada (Nestlé, Suiza), según lo propuesto por Phyu *et al.* (2015). Se repicaron cada una de las cepas aisladas en este medio y se incubaron durante 24 h a 37 °C.

Paralelamente, todas las cepas conservadas se repicaron en caldo nutritivo e incubaron durante 24 h a 37 °C. Pasado el tiempo, los cultivos se centrifugaron a 12000 g durante 2 min, obteniéndose el sobrenadante libre de células (SLC) para la determinación de la actividad proteolítica. Posteriormente se tomaron 50 µl del SLC de cada cepa y se sembraron en pocillos realizados con un sacabocados estéril en agar Davis. Las placas se incubaron durante 48 h a 37 °C.

Se consideró como resultado positivo la presencia de un halo de hidrólisis alrededor de la siembra de las colonias y/o SLC.

Utilización de carbohidratos

La utilización de carbohidratos se evaluó utilizando un caldo nutritivo suplementado con 0,5% m/v de maltosa y lactosa (Merck, Alemania) y púrpura de bromocresol azida como indicador del proceso fermentativo. Luego se sembró cada una de las cepas y se incubó durante 48 h a 37 °C.

Utilización de residuos agroindustriales para el cultivo de *B. clausii*

Se evaluó el crecimiento de las cepas de *B. clausii* utilizando desechos de las industrias queseras y cerveceras de la comarca VIRCh-Valdés. Para este fin, se empleó el suero ácido de quesería y *hot trub* (turbio caliente) proveniente de la elaboración de cerveza. Todos los medios se neutralizaron a pH 6,5-7 utilizando NaOH (0,5 M), se centrifugaron a 8000 g durante 2 min con el objetivo de eliminar los precipitados y se esterilizaron. Posteriormente se inocularon al 1% v/v con cultivos *over-night* de las cepas conservadas y se incubaron durante 6 días a 37 °C.

Con el propósito de evaluar la viabilidad, se realizaron repiques de cada una de las cepas sembradas en los distintos residuos cada 48 h, para su posterior incubación en agar nutritivo a 37°C durante 48 h.

Evaluación de la actividad antimicrobiana

Las cepas de *B. clausii* conservadas se repicaron se repicaron en el medio descrito en la sección aislamiento de las cepas y se incubaron a 37 °C hasta alcanzar la fase

estacionaria. Luego del período de incubación, los cultivos se centrifugaron a 8000 g durante 2 min, posteriormente los SLC se almacenaron a -30 °C hasta su uso.

Los SLC de las cepas se emplearon en el ensayo antimicrobiano que se realizó por el método de difusión en placa (Vallejo *et al.*, 2013). Se colocaron 50 µl de SLC en pocillos (6 mm de diámetro) practicados en placas de agar tripticasa soja (TS) (Britania, Argentina), sembrados previamente con 50 µl de un cultivo *over-night* (0.5 de la escala Mc Farland) de *Listeria innocua* ATCC 33090 y *L. monocytogenes* Scott A, pertenecientes al Cepario del LBB. Las placas se mantuvieron a 4 °C durante 2 h y luego se incubaron a 30 °C durante 24 h.

Prototipo de alimento funcional en base a músculo de pescado

Se realizó una matriz de fermentación (ensilado biológico) compuesta por 79% de músculo procesado de pez gallo (*Callorhynchus callorhynchus*), 20% de almidón (Anedra, Argentina), 1% de levadura comestible (TITÁN, Francia). Se preparó un total de 700 g y se mezclaron los componentes hasta su homogenización.

Una vez lista la matriz, se inocularon al 1% con cultivos *over-night* de las cepas *L. plantarum* AKTw180 y *L. mesenteroides* spp. *jonggajibkimchi* RCTw1.1 pertenecientes al LBB. Para tal fin, los cultivos se centrifugaron a 2000 g durante 15 min y se realizaron dos lavados con agua destilada (AD) estéril. El pellet obtenido fue resuspendido en el mismo volumen de AD estéril para su inoculación en la matriz.

Posteriormente se fraccionó la matriz en 8 frascos de 80 g (tal como se observa en la [Figura 1](#)), los cuales se inocularon con 4 ml de cada una de las cepas de *B. clausii* viables, realizando el mismo tratamiento de lavado mencionado anteriormente. Cada frasco se rotuló y mezcló con espátula, posteriormente se incubaron durante 7 días a 18 °C. Se tomaron muestras al inicio de la experiencia (T0), a los tres días (T3) y al final del ensayo (T7).



Figura 1: Separación de la matriz de fermentación inoculadas con cada una de las cepas viables.

Cada una de las muestras recolectadas se resuspendieron en AD estéril, se sembraron en placas de Petri y se incubaron durante 48 h a 37 °C con el propósito de evaluar su viabilidad.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el presente trabajo se utilizó un producto médico de venta libre, constituido por una suspensión de esporas de cuatro cepas de *B. clausii*, denominadas O/C, N/R, SIN y T, sin poder patógeno. Este producto se utiliza para el tratamiento y profilaxis de disbiosis intestinal (alteraciones de la microbiota intestinal) producida por tratamiento antibiótico o quimioterápico, infecciones intestinales, alteraciones en la dieta, desórdenes gastrointestinales agudos y crónicos en lactantes, etc.

Para corroborar la separación de las cuatro cepas se realizaron repiques, utilizando medios individuales suplementados con la máxima concentración de los antibióticos cloranfenicol, estreptomina, rifampicina y tetraciclina donde se detectó crecimiento (Abbrescia *et al.*, 2014), según se detalla en la [Tabla 1](#) y como se puede observar en la [Figura 2](#). Los resultados obtenidos demuestran que la separación de las cepas de *B. clausii* utilizando distintos antibióticos fue efectiva, y de ese modo se pudieron realizar los ensayos posteriores con cada uno de los microorganismos aislados y conservados.

Tabla 1: Resultados del ensayo de purificación de cepas

Concentración máxima	O/C	N/R	SIN	T
100 µg/ml Cloranfenicol	+	-	-	-
60 µg/ml Rifampicina	-	+	-	-
600 µg/ml Estreptomina	-	-	+	-
32 µg/ml Tetraciclina	-	-	-	+

+ = Se observa crecimiento; - = No se observa crecimiento.

En la selección de cepas bacterianas para uso en la industria alimentaria, la resistencia a antibióticos, producción de toxinas y/o factores de virulencia, son criterios fundamentales a evaluar. En Europa, de acuerdo con el enfoque de Presunción Cualificada de Seguridad (QPS) establecido por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA, 2008), se debe evaluar la presencia de cualquier determinante de resistencia a antibióticos en los microorganismos candidatos antes de ser aprobados para su uso. Por lo tanto, la resistencia a los antibióticos en sí misma no constituye un problema de seguridad; solo se convierte en uno si existe riesgo de transferencia (Gueimonde *et al.*, 2013).

Varios estudios han demostrado que no ocurre la transferencia horizontal de resistencia a antibióticos desde *B. clausii* hacia microorganismos patógenos (Bozdogan *et al.*, 2003; Bozdogan *et al.*, 2004; Galopin *et al.*, 2009). Por lo tanto, la resistencia a antibióticos de *B. clausii* no se percibe como un rasgo negativo.

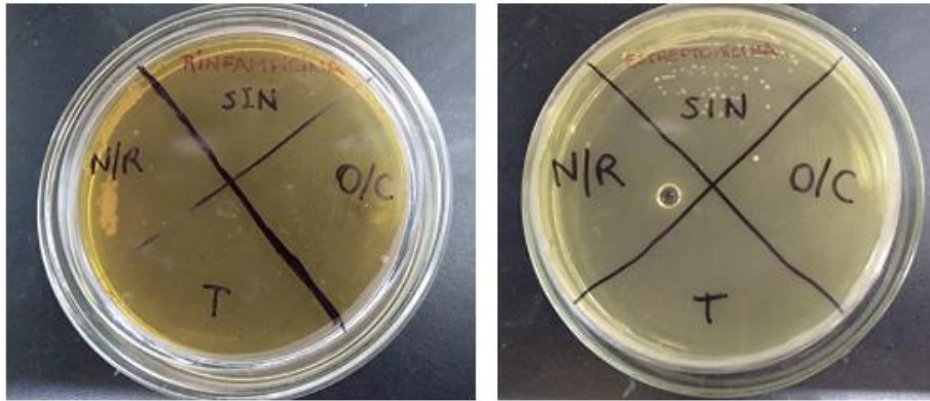


Figura 2: Medios individuales suplementados con la máxima concentración de antibiótico en la que se detectó el crecimiento. En la imagen a la izquierda, se observa el medio suplementado con rifampicina. A la derecha, el medio suplementado con estreptomina.

Para la preservación de las cepas se recurrió a un método a corto plazo, mediante conservación por transferencia periódica en placa con agar nutritivo y en agar en pico de flauta a 4 °C (Figura 3 y Figura 4). Si bien este no es el mejor método para conseguir la estabilidad genética, se recurrió a esto por la poca viabilidad a la conservación por congelación que exhibieron las cepas. Además, se utilizó el agar nutritivo debido a que no contiene fuentes de azúcares, lo que contribuye a mantener un pH cercano a la neutralidad.



Figura 3: Conservación de las cepas en placa de Petri

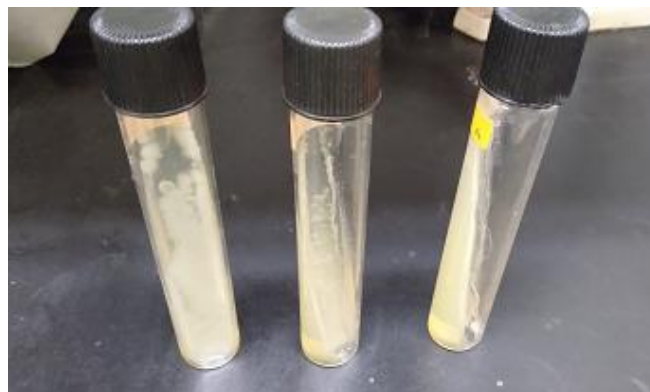


Figura 4: conservación de las cepas en pico de flauta.

De las cuatro cepas presentes en la suspensión farmacéutica, solo O/C, N/R y T exhibieron actividad proteolítica en agar Davis, lo cual es consistente con la literatura (Vélez Bravo *et al.*, 2023). La presencia de halo de hidrólisis alrededor de las colonias (Figura 5) sugiere que estas cepas son capaces de producir enzimas proteolíticas activas, un comportamiento esperado en *Bacillus*, dado su historial como eficientes productores de proteasas. Sin embargo, cuando se utilizaron los SLC no se determinó actividad proteolítica, lo que merece una discusión más profunda. Una posible explicación podría ser que las enzimas proteolíticas no se excretaron en cantidades suficientes al medio. Además, como se menciona en la bibliografía, la síntesis de enzimas extracelulares en *Bacillus* ocurre principalmente al final de la fase exponencial y antes de la esporulación, lo que podría implicar que las condiciones experimentales no fueron óptimas para la secreción de enzimas activas al medio extracelular. El contraste entre la actividad observada en cultivo celulares y la ausencia de actividad en SLC puede indicar la necesidad de ajustar factores como el tiempo de incubación o la composición del medio para promover la secreción de estas enzimas en cantidades detectables.

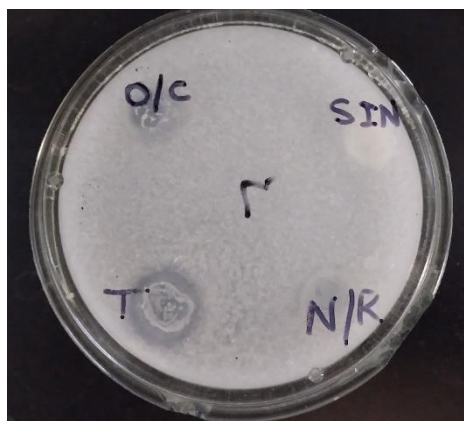


Figura 5: Resultado de la actividad proteolítica en donde se observa el halo de hidrólisis de las cepas O/C, N/R y T.

La evaluación preliminar de la utilización de carbohidratos por parte de *B. clausii* con el fin de determinar su potencial para crecer en medios derivados de residuos agroindustriales, permitió demostrar la capacidad de las cepas O/C, N/R y SIN para fermentar tanto lactosa como maltosa, ambos disacáridos presentes en suero y *hot trub*, respectivamente. Estos resultados son prometedores e indican que *B. clausii* tiene el potencial de crecer eficientemente en medios derivados de estos residuos, lo cual podría ser aprovechado en aplicaciones biotecnológicas. Por ejemplo, la utilización de suero lácteo y *hot trub* como medios de cultivo podría reducir los costos de producción de *B. clausii*, al mismo tiempo que contribuiría a la reducción de residuos industriales, promoviendo un enfoque sostenible en la producción biotecnológica. Asimismo, la capacidad de fermentar tanto lactosa como maltosa

demuestra que estas cepas poseen las enzimas necesarias para metabolizar estos azúcares.

Según los resultados obtenidos en el presente estudio, se observó crecimiento de las cuatro cepas en ambos residuos agroindustriales utilizados. En suero lácteo, a partir de las 48 h se observó un crecimiento abundante, mientras que, en *hot trub* se detectó crecimiento a partir del día 4. Al finalizar los ensayos (día 6), ambos residuos resultaron medios de cultivos adecuados para lograr un crecimiento óptimo para todas las cepas (Tabla 2 y Tabla 3).

El suero lácteo es un subproducto rico en nutrientes como lactosa, proteína cruda, minerales, grasas y vitaminas hidrosolubles que proporcionan un ambiente favorable para el crecimiento bacteriano. La rápida disponibilidad de estos nutrientes podría explicar el crecimiento abundante observado en un corto período. Si bien el *hot trub* también es un residuo rico en proteínas, carbohidratos, minerales y ácidos grasos, podría presentar una menor biodisponibilidad de nutrientes esenciales, como aminoácidos libres o proteínas solubles (Mathias *et al.*, 2015). El tiempo adicional necesario para la adaptación y aprovechamiento de los nutrientes disponibles podría explicar el retraso en el crecimiento observado.

En trabajos previos (Rochín-Medina *et al.*, 2017; Ghelardi *et al.*, 2022) se demostró que el suero lácteo puede ser utilizado como un medio de cultivo de bajo costo para el crecimiento y producción de metabolitos bioactivos en cepas de *B. clausii*, sin embargo, aún no se han utilizado residuos de la industria cervecera para este propósito. En este trabajo se demostró que el *hot trub* podría ser otra alternativa para su utilización como sustrato para el crecimiento de *B. clausii*. A futuro deberían llevarse a cabo otros estudios para evaluar y optimizar la producción de metabolitos de interés comercial.

Tabla 2: Crecimiento de las cepas de *B. clausii* en suero lácteo

Tiempo	O/C	N/R	SIN	T
Día 2	+++	+++	+++	+++
Día 4	+++	+++	+++	+++
Día 6	+++	+++	+++	+++

+++ = Se observa crecimiento abundante.

Tabla 3: Crecimiento de las cepas de *B. clausii* en hot trub

Tiempo	O/C	N/R	SIN	T
Día 2	-	-	-	-
Día 4	+	+	+	+
Día 6	+++	+++	+++	+++

- = No se observa crecimiento; + = Se observa crecimiento; +++ = Se observa crecimiento abundante.

En el presente estudio se desarrolló una matriz de fermentación con el objetivo de crear un alimento a base de pez gallo que contenga esporas de *B. clausii*. En conjunto con este microorganismo, se utilizaron las cepas *L. plantarum* AKTw180 y *L. mesenteroides* ssp. *jonggajibkimchi* RCTw1.1, por su comprobada capacidad de acidificar rápidamente el medio, contribuyendo a las condiciones deseadas para la fermentación.

Los resultados obtenidos (Tabla 4 y Tabla 5) indican que las cepas O/C, SIN y T pueden sobrevivir y multiplicarse en el ensilado biológico de pescado, lo que sugiere su potencial para ser utilizado en la elaboración de un alimento. La acidificación rápida proporcionada por las cepas AKTw180 y RCTw1.1. creó un entorno favorable para la esporulación de *B. clausii*. Sin embargo, no se pudo determinar la presencia de N/R en la matriz debido a que las réplicas se contaminaron antes de finalizar el ensayo.

Tabla 4: Resultados de las mediciones de pH en distintas etapas de la experiencia

Cepas	pH al inicio	pH a las 72 h
O/C	6,55	6,05
N/R	6,59	5,80
SIN	6,60	6,06
T	6,59	6,00

Tabla 5: Presencia las cepas de *B. clausii* en la matriz de fermentación.

Cepas	T ₀	T ₃	T ₇
O/C	+	+	+
N/R	+	+	-
SIN	+	+	+
T	+	+	+

+ Se detectó la presencia de *B. clausii*; - No se detectó la presencia de *B. clausii*.

La suplementación de alimentos procesados con microorganismos probióticos es una realidad en la industria alimentaria actual, de esta manera se satisfacen las necesidades de los consumidores modernos quienes buscan una fuente de nutrientes para mantener las funciones vitales del organismo, así como otros efectos benéficos para la salud (Soares *et al.*, 2023).

La investigación de Zeybekoğlu *et al.* (2021) aporta datos relevantes sobre los desafíos que se enfrentan durante la suplementación de alimentos con cepas probióticas formadoras de esporas, específicamente en matrices alimentarias como el tofu. En el mencionado estudio, se determinó el efecto de la temperatura sobre la concentración de esporas en el alimento, destacándose la importancia de mantener la cadena de frío durante su conservación con el propósito de no comprometer la viabilidad del microorganismo y, por tanto, su eficacia probiótica.

Los resultados obtenidos en el presente estudio demuestran que las cepas O/C, SIN y T pudieron sobrevivir y multiplicarse en la matriz de fermentación utilizada. Esto constituye un resultado prometedor, debido a la posibilidad de utilizar estas cepas probióticas en productos pesqueros, ampliando el espectro de alimentos fermentados. Sin embargo, la incapacidad de determinar la presencia de la cepa N/R debido a la contaminación pone de relieve la necesidad de un control riguroso durante el ensayo, así como la importancia de validar la estabilidad de las cepas en diferentes condiciones de almacenamiento y procesamiento. Además, la relevancia del monitoreo de la viabilidad de las esporas inoculadas es una preocupación clave. Tal como mencionan Soares *et al.* (2023), la germinación de esporas durante el procesamiento o almacenamiento puede afectar no solo la estabilidad del producto, sino también su seguridad y la efectividad de los probióticos para el huésped. Por lo tanto, es crucial continuar investigando las condiciones óptimas que permitan la estabilidad de estos microorganismos sin comprometer la calidad del alimento.

La comparación con estudios anteriores refuerza la necesidad de un enfoque cauteloso y basado en evidencia para la incorporación de probióticos formadores de esporas en diversas matrices alimentarias. La adición de microorganismos formadores de esporas a los alimentos es un avance reciente en la industria, por lo tanto, la selección de la matriz alimentaria depende de la especie o cepa utilizada como probiótico.

CONCLUSIONES

La utilización de medios individuales suplementados con la máxima concentración de antibióticos resultó efectiva para el aislamiento de las cuatro cepas de *B. clausii*. Esto permitió la realización de ensayos posteriores con cada uno de los microorganismos aislados y conservados, garantizando la pureza de los cultivos y la precisión de los resultados experimentales.

Respecto a la actividad proteolítica, los resultados obtenidos son congruentes con la literatura en cuanto a la capacidad de las cepas de *Bacillus* como productores de proteasas. Sin embargo, la falta de actividad en los SLC señala la necesidad de explorar más a fondo las condiciones que afectan la secreción y estabilidad de las enzimas proteolíticas, un aspecto crucial para su aplicación biotecnológica.

El estudio preliminar de fermentación de azúcares sugiere que las cepas O/C, N/R y SIN de *B. clausii* presentan potencial para crecer en medios compuestos por residuos agroindustriales como el suero lácteo y el *hot trub*.

Ambos residuos resultaron adecuados para un crecimiento óptimo de todas las cepas al final del ensayo (día 6), lo que muestra su potencial para ser utilizados eficazmente como medios de cultivo para *B. clausii*. Esto representa un hallazgo positivo ya que no solo pueden utilizarse como medios de cultivo de bajo costo para la producción de este microorganismo, sino también que contribuyen a una gestión sostenible de los subproductos industriales. Para maximizar el aprovechamiento de estos residuos, se deben realizar investigaciones que permitan optimizar las condiciones de cultivo, así como la producción de metabolitos de interés, sobre todo para el *hot trub*, ya que no hay antecedentes de utilización de residuos de la industria cervecera para este propósito.

Aunque *B. clausii* es conocido por su capacidad para producir sustancias antimicrobianas, incluyendo antibióticos como la clausina, no se evidenció actividad antilisteria en ninguna de las cepas evaluadas bajo las condiciones de ensayo utilizadas. A futuro, se deberían realizar estudios adicionales con variaciones en las condiciones de cultivo (tiempo, pH, temperatura, composición, etc), con el propósito de optimizar la producción de metabolitos antimicrobianos.

En última instancia, el presente estudio demostró que ciertas cepas de *B. clausii* pueden sobrevivir y proliferar en matrices de fermentación a base de pez gallo, lo que sugiere un potencial para la incorporación de estos probióticos en productos pesqueros. Para avanzar en la aplicación de *B. clausii* en diversas matrices

alimentarias, es esencial continuar estudiando las condiciones óptimas que preserven la viabilidad y eficacia de estos microorganismos.

BIBLIOGRAFÍA

- Abbrescia A., Palese L. L., Papa S., Gaballo A., Alifano P., & Sardanelli A. 2014.** Antibiotic sensitivity of *Bacillus clausii* strains in commercial preparation. *Clinical Immunology, Endocrine & Metabolic Drugs*. Vol 1, No 2: 102-110. Doi: 10.2174/2212707002666150128195631
- Acosta-Rodríguez-Bueno C. P., Abreu Y Abreu A. T., Guarner F., Guno M. J. V., Pehlivanoğlu E., & Pérez M. 2022.** *Bacillus clausii* for gastrointestinal disorders: a narrative literature review. *Advances in Therapy*. Vol 39, No 11: 4854-4874. Doi: 10.1007/s12325-022-02285-0
- Awasthi M. K., Yan B., Taner S., Gómez-García R., Ren L., Sharma P., Binod P., Sindhu R., Kumar V., Kumar D., Mohamed B. A., Zhang Z., & Taherzadeh M. J. 2022.** Organic waste recycling for carbon smart circular bioeconomy and sustainable development: A review. *Bioresource Technology*. Vol 360: 127620. Doi: 10.1016/j.biortech.2022.127620
- Bargo, F., 2016.** Análisis tecnológicos y prospectivos sectoriales.
- Betoret E., Betoret N., Vidal D., & Fito P. 2011.** Functional foods development: trends and technologies. *Trends in Food Science & Technology*. Vol 22, No 9: 498-508. Doi: 10.1016/j.tifs.2011.05.004
- Bovcon N. D., Góngora M. E., Marinao C., & González-Zevallos D. 2013.** Composición de las capturas y descartes generados en la pesca de merluza común *Merluccius hubbsi* y langostino patagónico *Pleoticus muelleri*: un caso de estudio en la flota fresquera de altura del Golfo San Jorge, Chubut, Argentina. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*. Vol 48, No 2: 303-319. Doi: 10.4067/S0718-19572013000200010
- Bozdogan B., Galopin S., & Leclercq R. 2004.** Characterization of a new erm-related macrolide resistance gene present in probiotic strains of *Bacillus clausii*. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol 70, No 1: 280-284. Doi: 10.1128/AEM.70.1.280-284.2004
- Bozdogan B., Galopin S., Gerbaud G., Courvalin P., & Leclercq R. 2003.** Chromosomal *aadD2* encodes an aminoglycoside nucleotidyl-transferase in *Bacillus clausii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. Vol 47, No 4: 1343-1346. Doi: 10.1128/aac.47.4.1343-1346.2003
- Capanoglu E., Nemli E., & Tomás-Barberán F. 2022.** Novel approaches in the valorization of agricultural wastes and their applications. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol 70, No 23: 6787-6804. Doi: 10.1021/acs.jafc.1c07104

- Carson R. 1962.** Silent spring. Houghton Mifflin. Boston, Massachusetts, Estados Unidos
- Cartman S. T., La Ragione R. M., & Woodward M. J. 2008.** *Bacillus subtilis* spores germinate in the chicken gastrointestinal tract. Applied and Environmental Microbiology. Vol 74, No 16: 5254-5258. Doi: 10.1128/AEM.00580-08
- Colino E., Civitaresi H. M., Capuano A., Quiroga J. M., & Winkelman B. 2017.** Análisis de la estructura y dinámica del complejo cervecero artesanal de Bariloche, Argentina. Revista Pilquén. Vol 20, No 2: 79-91.
- De Angelis M., Siragusa S., Berloco M., Caputo L., Settanni L., Alfonsi G., Amerio M., Grandi A., Ragni A., & Gobbetti M. 2006.** Selection of potential probiotic lactobacilli from pig feces to be used as additives in pelleted feeding. Research in Microbiology. Vol 157, No 8: 792–801. Doi: 10.1016/j.resmic.2006.05.003
- De Miguel C., Martínez K., Pereira M., & Kohout M. 2021.** Economía circular en América Latina y el Caribe: oportunidad para una recuperación transformadora. Documentos de Proyectos (LC/TS.2021/120). Santiago: Comisión Económica para América Latina y el Caribe (CEPAL).
- Díaz L. D., Raguileo, D. A., Hernández, M., Salvadores, F.J. 2021.** Caracterización del sistema de riego del Valle Inferior del Río Chubut: análisis desde las representaciones y opiniones de quienes riegan. INTA Ediciones, Centro Regional Patagonia Sur, Argentina.
- Duc L. H., Hong H. A., Barbosa T. M., Henriques A. O., & Cutting S. M. 2004.** Characterization of *Bacillus* probiotics available for human use. Applied and Environmental Microbiology. Vol 70, No 4: 2161-2171. Doi: 10.1128/AEM.70.4.2161-2171.2004
- Eishaghabe F. M., Rokana N., Gulhane R. D., Sharma C., & Panwar H. 2017.** *Bacillus* as potential probiotics: status, concerns, and future perspectives. Frontiers in microbiology. Vol 8, Art: 1490. Doi: 10.3389/fmicb.2017.01490.
- FAO/OMS. 2002.** Directrices para la evaluación de probióticos en alimentos. <https://www.mhlw.go.jp/file/05-Shingikai-11121000-Iyakushokuhinkyoku-Soumuka/0000197343.pdf>. Consultado el 6 de junio de 2024.
- Galopin S., Cattoir V., & Leclercq R. 2009.** A chromosomal chloramphenicol acetyltransferase determinant from a probiotic strain of *Bacillus clausii*. FEMS Microbiology Letters. Vol: 296, No 2: 185–189. Doi: 10.1111/j.1574-6968.2009.01633.x.
- Ghelardi E., Abreu Y Abreu A. T., Marzet C. B., Álvarez Calatayud G., Perez III M., & Moschione Castro A. P. 2022.** Current progress and future perspectives on the use of *Bacillus clausii*. Microorganisms. Vol 10, No 6, Art 1246. Doi: 10.3390/microorganisms10061246.
- Gillett, R. 2008.** Global study of shrimp fisheries. FAO Fisheries Technical Paper 475, 331 pp.

- Giua C., Romano F., Keber E., Pellegrino P., Perez III M. & Uboldi M. C. 2024.** A prospective real-world study of *Bacillus clausii* evaluating use, treatment habits and patient satisfaction in Italian community pharmacies: The PEGASO Study. *Drugs Real World Outcomes*. Vol 11, No 1:137-147. Doi: 10.1007/s40801-023-00402-1.
- Góngora M. E. 2011.** Dinámica y manejo de la captura incidental de peces en la pesquería de langostino patagónico (*Pleoticus muelleri*). Tesis doctoral, Centro Regional Universitario Bariloche, Universidad Nacional del Comahue, Bariloche. [Consultado el 24 de agosto de 2024]. Disponible en: <http://hdl.handle.net/1834/4190>
- Góngora M.E., Zevallos D.G., Petovello, A., Mendía L. 2011.** Caracterización de las principales pesquerías del golfo San Jorge Patagonia, Argentina. *Latin American Journal of Aquatic Research*. Vol 40, No 1: 1-11
- González Cáceres M. D. J. 2012.** Aspectos medio ambientales asociados a los procesos de la industria láctea. *Mundo Pecuario*. Vol 8, No 1: 16–32.
- González Siso M. 1996.** The biotechnological utilization of cheese whey: a review. *Bioresource Technology*. Vol 57, No 1: 1-11. Doi: 10.1016/0960-8524(96)00036-3.
- Gueimonde M., Sánchez B. G., de Los Reyes-Gavilán C., & Margolles A. 2013.** Antibiotic resistance in probiotic bacteria. *Frontiers in Microbiology*. Vol 4, Art 202. Doi: 10.3389/fmicb.2013.00202.
- Guha R. 2000.** Environmentalism: a global history. Longman. Nueva York, Estados Unidos
- Kaur S. J., & Gupta V. K. 2017.** Production of pectinolytic enzymes pectinase and pectin lyase by *Bacillus subtilis* SAV-21 in solid state fermentation. *Annals of Microbiology*. Vol 67: 333–342. Doi: 10.1007/s13213-017-1264-4
- Kelleher K. 2008.** Descartes en la pesca de captura marina mundial. *FAO Documento Técnico de Pesca 470*: 1-147.
- Kenny M., Smidt H., Mengheri E., & Miller B. 2011.** Probiotics—do they have a role in the pig industry? *Animal*. Vol 5, No 3: 462-470. Doi: 10.1017/S175173111000193X
- Kyriakis S. C, Tsiloyiannis V. K., Vlemmas J., Sarris K., Tsinas A. C., Alexopoulos C., & Jansegers L. 1999.** The effect of probiotic LSP 122 on the control of post-weaning diarrhoea syndrome of piglets. *Research in Veterinary Science*. Vol 67, No 3: 223–228. Doi: 10.1053/rvsc.1999.0308
- Lakshmi G. B., Rajappan K. T., & Raghavan K. T. 2017.** Formulation and in vivo study of *Bacillus clausii* based functional feed in guppy (*Poecilia reticulata*). *International Journal of Advanced Research*. Vol 5, No 7: 2813-2821. Doi: 10.21474/IJAR01/5027.
- Mathias T. R. D. S, Alexandre V. M. F, Cammarota M. C., de Mello P. P. M., & Sérvulo E. F. C. 2015.** Characterization and determination of brewer's solid wastes composition. *Journal of the Institute of Brewing*. Vol 121, No 3: 400-404. Doi: 10.1002/jib.229

- Mathias T. R. D. S., Fernandes de Aguiar P., Batista de Almeida e Silva J. B., Moretzsohn de Mello P. P., & Sérvulo E F. C. 2017.** Brewery waste reuse for protease production by lactic acid fermentation. *Food Technology and Biotechnology*. Vol 55, No 2: 218-224. Doi: 10.17113/ftb.55.02.17.4378
- Meadows D. H., Meadows D. L., Randers J., & Behrens III W. W. 1972.** The limits to growth: a report for the club of rome's project on the predicament of mankind. Universe Books. Nueva York, Estados Unidos
- Mingmongkolchai S., & Panbangred W. 2018.** *Bacillus* probiotics: an alternative to antibiotics for livestock production. *Journal of Applied Microbiology*. Vol 124, No 5: 1334-1346. Doi: 10.1111/jam.13690
- Mokoena M. P. 2017.** Lactic acid bacteria and their bacteriocins: classification, biosynthesis and applications against uropathogens: a mini-review. *Molecules*. Vol 22, No 8, Art 1255. Doi: 10.3390/molecules22081255
- Nista E. C, Candelli M., Cremonini F., Cazzato I. A., Zocco M. A., Franceschi F., Cammarota G., Gasbarrini G., & Gasbarrini A. 2004.** *Bacillus clausii* therapy to reduce side-effects of anti-*Helicobacter pylori* treatment: Randomized, double-blind, placebo controlled trial. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*. Vol 20, No 10: 1181-1188. Doi: 10.1111/j.1365-2036.2004.02274.x
- Ochoa-Solano J. L., & Olmos-Soto J. 2006.** The functional property of *Bacillus* for shrimp feeds. *Food microbiology*. Vol23, No 6: 519-525. Doi: 10.1016/j.fm.2005.10.004
- Paparo L., Tripodi L., Bruno C., Pisapia L., Damiano C., Pastore L., & Berni Canani R. 2020.** Protective action of *Bacillus clausii* probiotic strains in an in vitro model of Rotavirus infection. *Scientific Reports*. Vol 10, No 1, Art 12636. Doi: 10.1038/s41598-020-69533-7
- Parada R. B., Marguet E. R., Campos C. & Vallejo M. 2023.** Improved antioxidant capacity of three Brassica vegetables by two-step controlled fermentation using isolated autochthone strains of the genus *Leuconostoc* spp. and *Lactiplantibacillus* spp. 2023. *Food Chemistry: Molecular Sciences* 6 100163. <https://doi.org/10.1016/j.fochms.2023.100163>
- Parra Huertas, R. A. 2010.** Bacterias ácido lácticas: Papel funcional en los alimentos. *Biotechnología en el sector agropecuario y agroindustrial*. Vol 8, No 1: 93-105.
- Phyu H. E, Oo Z. K, & Aye K. N. 2015.** Screening on proteolytic activity of lactic acid bacteria from various yogurts and fermented milk. *International Journal of Advances in Science Engineering and Technology*. No 5: 34-37. Disponible en https://www.iraj.in/journal/journal_file/journal_pdf/6-214-145197650334-37.pdf
- Poladyan A., Trchounian K., Vassilian A., & Trchounian A. 2019.** Hydrogen production by *Escherichia coli* using brewery waste: optimal pretreatment of waste and role of different hydrogenases. *Renewable Energy*. Vol 115: 931-936. Doi: 10.1016/j.renene.2017.09.022.

- Radosavljević M., Pejin J., Pribić M., Kocić-Tanackov S., Romanić R., Mladenović D., Djukić-Vuković A., & Mojović L. 2019.** Utilization of brewing and malting by-products as carrier and raw materials in L- (+)- lactic acid production and feed application. *Applied Microbiology and biotechnology*. Vol 103: 3001-3013. Doi: 10.1007/s00253-019-09683-5.
- Ramírez-Navas J. R. S. 2012.** Aprovechamiento industrial de lactosuero mediante procesos fermentativos. *Publicaciones e Investigación*. Vol 6: 69-83. Doi: 10.1007/s00253-019-09709-8
- Ripert G., Racedo S. M., Elie A. M., Jacquot C., Bressollier P., & Urdaci M. C. 2016.** Secreted compounds of the probiotic *Bacillus clausii* strain O/C inhibit the cytotoxic effects induced by *Clostridium difficile* and *Bacillus cereus* toxins. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. Vol 60, No 6: 3445–3454. Doi: 10.1128/AAC.02815-15
- Rochín-Medina J. J., Ramírez-Medina H. K., Rangel-Peraza J. G., Pineda-Hidalgo K. V., & Iribe-Arellano P. 2018.** Use of whey as a culture medium for *Bacillus clausii* for the production of protein hydrolysates with antimicrobial and antioxidant activity. *Food Science and Technology International*. Vol 24, No 1: 35-42. Doi: 10.1177/1082013217724705.
- Ruibal Núñez J, Bovcon N.D., Cochía P.D., Góngora M.E. 2016.** Bycatch of chondrichthyans in a coastal trawl fishery on Chubut province coast and adjacent waters, Argentina. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*. Vol 98. No 3: 605-616. Doi:10.1017/S0025315416001508
- Saarela, M., Matto, J., & Mattila-Sandholm, T. 2002.** Safety aspects of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species originating from human oro-gastrointestinal tract or from probiotic products. *Microbial Ecology in Health and Disease*. Vol 14, No 4: 234–241. Doi: 10.1080/08910600310002127
- Sahandi J., Jafaryan H., Moradi P., & Tadiri C. 2013.** Effect of in-feed probiotic blend on growth performance and infection resistance of the guppy (*Poecilia reticulata*). *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine*. Vol 16, No 4: 243–250.
- Santacruz-Salas A. P., Antunes-Pereira M. L., Gomez-Herrera S, Velez-Lozano J. A., & Mancini S. D. 2023.** Sostenibilidad en la industria cervecera: una revisión crítica de los residuos generados y su gestión. *Bioteología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*. Vol 21, No 2: 178-194. Doi: 10.18684/rbsaa.v21.n2.2023.2167
- Secretaría de Agroindustria – Ministerio de Producción y Trabajo, Presidencia de la Nación. 2014** Ficha 27: Incluí PESCADO en tu alimentación. Disponible en https://alimentosargentinos.magyp.gob.ar/HomeAlimentos/seguridad-alimentaria-y-nutricion/fichaspdf/Ficha_27_pescados.pdf [Consultado el 26 de agosto de 2024]
- Senesi S., Celandroni F., Tavanti A., & Ghelardi E. 2001.** Molecular characterization and identification of *Bacillus clausii* strains marketed for use in oral bacteriotherapy. *Applied*

and environmental microbiology. Vol 67, No 2: 834-839. Doi: 10.1128/AEM.67.2.834-839.2001

Soares M. B., Almada C. N., Pereira E. P., Ferreira B. M., Balthazar C. F., Khorshidian N., Rocha R. S., Xavier-Santos D., Cruz A. G., Ranadheera C. S., Mortazavian A. M., Gómez-Zavaglia A., Martinez R. C. R. & Sant'Ana, A. S. 2023. Sporeforming probiotic bacteria: Characteristics, health benefits, and technological aspects for their applications in foods and beverages. *Trends in Food Science & Technology*. Vol. 138, August 2023: 834-839. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2023.06.029>

Soutric M. H., Ruiz A. E., & Góngora M. E. 2016. Biología y pesquería del camarón en aguas de Bahía Engaño, Chubut, Argentina. Instituto Nacional de Investigación y Desarrollo Pesquero (INIDEP). Disponible en: <http://hdl.handle.net/1834/14367>

Urdaci M. C., Bressollier P., & Pinchuk I. 2004. *Bacillus clausii* probiotic strains: antimicrobial and immunomodulatory activities. *Journal of Clinical Gastroenterology*. Vol 38: S86-90. Doi: 10.1097/01.mcg.0000128925.06662.69.

Valencia Denicia E., & Ramírez Castillo M. L. 2009. La industria de la leche y la contaminación del agua. *Elementos: Ciencia y Cultura*. Vol 73, No1: 27 – 31.

Vallejo M, Ledesma P, Marguet E. R. 2013. Caracterización parcial de enterocinas producidas por una cepa de *Enterococcus faecium* aislada de leche ovina. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*. Vol 33. No 1: 28-34

Vecchione A., Celandroni F., Mazzantini D., Senesi S., Lupetti A., & Ghelardi E. 2018. Compositional quality and potential gastrointestinal behavior of probiotic products commercialized in Italy. *Frontiers in Medicine*. Vol 5, Art 59. Doi: 10.3389/fmed.2022.1091788

Vélez Bravo S., & Arroyave Ospina V., Castañeda L., Sánchez J. 2023. Determinación de la actividad proteolítica de cepas *Bacillus cereus* previamente aisladas de alimentos. [Tesis en internet]. Universidad De Antioquia. [Consultado el 3 de junio de 2024] Disponible en: <https://hdl.handle.net/10495/35081>

Winkelman B., Colino E., & Civitaresi M. H. 2019. El sistema agroalimentario localizado de la cerveza artesanal de San Carlos de Bariloche, Argentina. *RIVAR (Santiago)*. Vol 6, No 18: 34-58. Doi: 10.35588/rivar.v6i18.4174

World Commission on Environment and Development. 1987. Our common future (The Brundtland Report). Oxford University Press.

Zaragoza Carmona J. P. J. 2011. Aislamiento de cepas de *Bacillus* productoras de proteasas con potencial uso industrial. [Tesis en internet]. Universidad Autónoma De Nuevo León. [Consultado el 3 de junio de 2024]. Disponible en: <http://eprints.uanl.mx/2955/1/1080224404.pdf>.

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*. Vol 70, No 4: 2782–2858. Doi: 10.1099/ijsem.0.004107.

Zeybekoğlu N., Özhan H., & Boyacıoğlu O. 2021. Probiotic tofu with *Bacillus clausii* spores to support gastrointestinal microflora. *Journal of Adnan Menderes University Health Sciences Faculty*. Vol 5, No 3: 534-545. Doi: 10.46237/amusbfd.929382