



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>

Departament de Genètica i Microbiologia

Facultat de Biociències

Universitat Autònoma de Barcelona

Memoria presentada para optar al Grado de Doctor en Microbiología

TESIS DOCTORAL

“Microbiología del caracol *Helix aspersa* Müller.
Aplicaciones biotecnológicas para su
mejoramiento sanitario con impacto en su
comercialización”

Directora

Dra. María Àngels Calvo i Torras

Tutor

Dr. Jordi Mas Gordi

RODRIGO ELIZARDO VERA GARCIA

2016

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis doctoral, si bien tiene un autor, esta ha sido esfuerzo y dedicación de varias personas, las que han aportado sus conocimientos, sabiduría, tiempo, comprensión y cariño.

Comenzar agradeciendo a mi directora de tesis, Dra. María Ángels Calvo, quien hace varios años me aceptó en su grupo de investigación para llevar a cabo este desafío personal, y gracias a su experiencia académica, profesional y su calidad humana hicieron posible llegar al final de esta etapa. Asimismo, agradecer a los diversos compañeros de laboratorio que pasaron durante estos años, y también a aquellos que continúan, que aportaron con su apoyo técnico, científico o emocional, como Leo, Gisela, Carlos, Graciela, Brian, entre otros. También agradecer a Erica Castro, y otros profesores de la Universidad de Concepción por su apoyo en los inicios de esta aventura.

Este proceso, sin apoyo emocional es difícil de terminar, por esta razón agradecer a quienes han sido mi familia en Barcelona, mis amigos chilenos residentes en España, quienes siempre han estado a nuestro lado aportando cariños, risas, y buenos momentos.

A mi familia que se encuentra en Chile, a mis padres, hermanas, cuñado, sobrinos, primos y tíos, quienes nos apoyan a lo lejos constantemente para continuar cumpliendo nuestros sueños, y siempre entregando amor a pesar de la distancia.

Agradecer a Dios, por su protección, por darme la fortaleza a seguir, a superar dificultades, la resignación por lo que no puedo cambiar, y por nunca sentirme abandonado.

Por último, y no menos importante mi mujer Tabita y mis hijos Rodrigo y Matías, que son la razón de tomar esta linda aventura. Su amor y cariño son la guía para continuar con nuevos desafíos, y todo este esfuerzo y dedicación en esta investigación es para ellos.

RESUMEN

La Helicicultura se define como la cría a ciclo biológico completo de caracoles. El caracol terrestre *Helix aspersa* Müller es el más utilizados en distintas regiones europeas como alimento, que destaca por su alta prolificidad y capacidad de adaptación al ambiente. La cría de caracoles es una actividad ganadera, y no está exenta de la manifestación de procesos patológicos de origen microbiológico que ocasionan pérdidas productivas. Actualmente, la Helicicultura tiene por objetivo la comercialización de un caracol de calidad, sometido a rigurosos controles sanitarios y zootécnicos para garantizar su inocuidad y seguridad como alimento.

Los objetivos de esta Tesis doctoral son lograr optimizar y/o generar metodologías que faciliten la correcta administración de la cepa probiótica *Lactobacillus plantarum* Ca7, aislada desde caracoles, y que contribuyan a mejorar el estado sanitario de granjas destinadas a cría y engorde del caracol terrestre *Helix aspersa* Müller.

Los resultados obtenidos indican que, la contaminación presente en una nave destinada a la reproducción de caracoles, está relacionada con los microorganismos existentes en la microbiota intestinal de los animales, principalmente los de la familia Enterobacteriaceae, y que la microbiota se modifica si consume pienso contaminado. Los estudios sobre *L. plantarum* Ca7 indicaron que modificaciones en el medio de cultivo MRS, parámetros de incubación, y aquellos involucrados en el proceso de liofilización, permiten mejorar la producción de la biomasa, incrementar la concentración de la cepa liofilizada, y establecer las óptimas condiciones de almacenamiento de los cultivos liofilizados. Para el uso de un sistema en agitación que incorpora un cultivo de *L. plantarum* Ca7 para administrar a los caracoles a través del agua de riego, es preferible partir de cultivos no liofilizados y mezclarlos con agua de pozo para asegurar la sobrevivencia de la cepa y la inocuidad del preparado durante la hidratación de los caracoles. En relación al uso del sobrenadante de la cepa, se observó que posee propiedades inhibitorias sobre el desarrollo de microorganismos patógenos y sobre la formación de biopelículas de

Staphylococcus aureus, además si esta fracción es liofilizada, aumentan sus propiedades inhibitorias, destacando el efecto sobre *Pseudomonas aeruginosa*. Este sobrenadante es posible incorporarlo al pienso de forma liofilizada sin que pierda sus propiedades inhibitorias. En laboratorio, tras la administración a caracoles de distinta edad de pienso enriquecido con *L. plantarum* Ca7, los resultados indicaron que este alimento modifica la microbiota, previene la mortalidad de los caracoles, y mejora la calidad microbiológica del pienso.

En base a estos resultados podemos indicar que la administración a caracoles de *L. plantarum* Ca7 y el uso de su sobrenadante para el control de microorganismos contaminantes presentes en la Helicicultura, serían capaces de ayudar a mejorar sanitariamente esta actividad ganadera, a través de la prevención de patologías de origen microbiano, modificación de la microbiota intestinal, y mejora de la calidad microbiológica del pienso. Efectos que conllevan a una mejora productiva durante la crianza del caracol, y entregan un valor agregado al producto final, con consecuente impacto en su comercialización.

ABSTRACT

The Heliciculture is defined as the full life cycle breeding of snails. The land snail *Helix aspersa* Müller is the most used in different European regions as food, and it stand up for its high prolificacy and adaptability to the environment capacity. The breeding of snails is a livestock activity, and is not exempt from the manifestation of pathological processes of microbiological origin, that cause production losses. Currently, the Heliciculture aims at the marketing of quality snail, subjected to strict health and zootechnical controls to ensure the safety of this food.

The objectives of this thesis are to optimize and/or create methodologies that facilitate the correct administration of the probiotic *Lactobacillus plantarum* Ca7 strain, which contributes to improve the health status of farms, intended for breeding and fattening land snail *Helix aspersa* Müller.

The obtained results indicated that, the contamination present on a farm dedicated to snail reproduction, is associated with the microorganism in the intestinal microbiota of animals, mainly the Enterobacteriaceae Family, and the microbiota change because of contaminated feed consupcion. The *L. plantarum* Ca7 studies, indicated that changes in the MRS culture medium, incubation parameters, and those involved in the lyophilization process, allow the improvement of the biomass production, increase of the lyophilized strain concentration, and the establishment of optimal storage conditions of freeze-dried cultures. For the use of an agitation system incorporating a culture of *L. plantarum* Ca7 to manage snails through irrigation water, it's better to start whit no-lyophilized cultures, mixed with well water to ensure the survival of the strain and the safety of the preparation during the snails hydration. Concerning the use of the strain supernatant, observation showed that it possesses inhibitory properties on growth of pathogenic microorganisms and *Staphylococcus aureus* biofilm formation, also if this fraction is lyophilized, that increases its inhibitory properties, highlighting the effect on *Pseudomonas aeruginosa*. It is possible to incorporate this one to the feed in its lyophilized form without losing its inhibitory properties. In the laboratory, after the administration of the enriched with *L.*

plantarum Ca7 feed to different age snails, the results indicated that this food alters the microbiota, prevents mortality of snails, and improves the microbiological quality of the feed.

Based on these results, we can indicate that the administration of the *L. plantarum* Ca7 strain to snails, and its supernatant for contaminant microorganism control, present in the Heliciculture, would be able to help improve the sanitary livestock through the prevention of diseases of microbial origin, modification of the intestinal microbiota, and ameliorate the microbiological quality of the feed. Which leads to a productive improvement during snail breeding, and delivers added value to the final product, with consequent impact on marketing.

ÍNDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS	i
RESUMEN	iii
ABSTRACT	v
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. ASPECTOS BIOLÓGICOS Y ECOLÓGICOS DEL CARACOL TERRESTRE.	1
1.2. HELICICULTURA.....	4
1.2.1. Aspectos generales.	4
1.2.2. El caracol como alimento.....	5
1.2.3. Recolección y consumo de caracoles.....	6
1.2.4. El caracol <i>Helix aspersa</i>	8
1.2.5. Datos estadísticos de producción en España.	10
1.2.6. Alimentación en la cría del caracol.	11
1.2.7. Enfermedades de etiología microbiológica y parasitaria.....	13
1.2.8. Reglamentación y legislación en España para el sector helicícola..	18
1.3. ALIMENTOS FUNCIONALES	20
1.3.1. Probióticos	21
1.3.2. Extractos de plantas.	30
2. OBJETIVOS	33
2.1. OBJETIVO GENERAL	35
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	35

3. PLAN DE TRABAJO	37
3.1. EVALUAR EL ESTADO SANITARIO DE UNA GRANJA HELICÍCOLA. 39	
3.2. MEJORAR LA PRODUCCIÓN DE LA CEPA PROBIÓTICA DESTINADA A LA APLICACIÓN EN CARACOLES.....	40
3.3. MODIFICAR Y EVALUAR NUEVAS VÍAS DE ADMINISTRACIÓN DEL PROBIÓTICO EN GRANJAS DE CARACOLES.....	41
3.4. EVALUAR ALTERNATIVAS PARA EL CONTROL DE CONTAMINACIÓN MICROBIOLÓGICA.	42
3.5. ESTUDIAR EL EFECTO EN CARACOLES DE LA ADMINISTRACIÓN DE <i>Lactobacillus plantarum</i> Ca7 A ESCALA DE LABORATORIO.....	43
 4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	45
4.1. EVALUAR EL ESTADO SANITARIO DE UNA GRANJA HELICÍCOLA.....	47
4.1.1. Análisis microbiológico ambiental de granja helicícola destinada a la reproducción de caracoles.....	47
4.1.2. Evaluación del estado microbiológico de caracoles provenientes de distintas granjas de engorde.....	56
4.2. MEJORAR LA PRODUCCIÓN DE LA CEPA PROBIÓTICA DESTINADA A LA APLICACIÓN EN CARACOLES.....	63
4.2.1. Evaluar el efecto de modificaciones de parámetros de incubación que permitan incrementar la concentración de la cepa probiótica en el proceso productivo.	63
4.2.2. Evaluar modificaciones de parámetros involucrados en el proceso de liofilización que permitan incrementar la concentración de la cepa probiótica en el proceso productivo.....	66
4.3. MODIFICAR Y EVALUAR NUEVAS VÍAS DE ADMINISTRACIÓN DEL PROBIÓTICO EN GRANJAS DE CARACOLES.....	74
4.3.1. Administración de la cepa probiótica a caracoles mediante la incorporación en el pienso.	74

4.3.2. Administración de la cepa a caracoles mediante la incorporación en el agua de riego.....	79
4.3.3. Desarrollo de una alternativa de administración del probiótico a través de implementar un sistema de agitación y distribución en agua de riego..	81
4.4. EVALUAR ALTERNATIVAS PARA EL CONTROL DE CONTAMINACIÓN MICROBIOLÓGICA	86
4.4.1. Evaluar aplicaciones de la cepa probiótica para el control de contaminación microbiológica.....	86
4.4.2. Efecto de antifúngicos y acidificantes como control de contaminación microbiológica en piensos.....	96
4.5. EFECTO EN CARACOLES DE LA ADMINISTRACIÓN DE <i>Lactobacillus plantarum</i> Ca7 A ESCALA DE LABORATORIO.	100
5. RESULTADOS.....	105
5.1. EVALUAR EL ESTADO SANITARIO DE UNA GRANJA HELICÍCOLA.....	107
5.1.1. Análisis microbiológico ambiental de granja helicícola destinada a la reproducción de caracoles.....	107
5.1.2. Evaluación del estado microbiológico de caracoles provenientes de distintas granjas de engorde.....	114
5.2. MEJORAR LA PRODUCCIÓN DE LA CEPAS PROBIÓTICA DESTINADA A LA APLICACIÓN EN CARACOLES.....	120
5.2.1. Evaluar el efecto de modificaciones de parámetros de incubación que permitan incrementar la concentración de la cepa probiótica en el proceso productivo.	120
5.2.2. Evaluar modificaciones de parámetros involucrados en el proceso de liofilización que permitan incrementar la concentración de la cepa probiótica en el proceso productivo.....	122
5.3. MODIFICARY EVALUAR NUEVAS VÍAS DE ADMINISTRACIÓN DEL PROBIÓTICO EN GRANJAS DE CARACOLES.....	129

5.3.1. Administración de la cepa probiótica a caracoles mediante la incorporación en el pienso.....	129
5.3.2. Administración de la cepa a caracoles mediante la incorporación en el agua de riego.....	132
5.3.3 Desarrollo de una alternativa de administración del probiótico a través de la implementación de un sistema de agitación y distribución en agua de riego.....	134
5.4. EVALUAR ALTERNATIVAS PARA EL CONTROL DE CONTAMINACIÓN MICROBIOLÓGICA.	140
5.4.1. Evaluar aplicaciones de la cepa probiótica para el control de contaminación microbiológica.....	140
5.4.2. Efecto de antifúngicos y acidificantes como control de contaminación microbiológica en piensos.....	148
5.5. EFECTO EN CARACOLES DE LA ADMINISTRACIÓN DE <i>Lactobacillus plantarum</i> Ca7 A ESCALA DE LABORATORIO.	150
6. DISCUSIÓN	159
6.1. EVALUACIÓN DEL ESTADO SANITARIO DE UNA GRANJA HELICÍCOLA.....	161
6.2. MEJORAR LA PRODUCCIÓN DE LA CEPA PROBIÓTICA DESTINADA A LA APLICACIÓN EN CARACOLES.....	170
6.3. MODIFICACIÓN Y EVALUACIÓN DE NUEVAS VÍAS DE ADMINISTRACIÓN DEL PROBIÓTICO EN GRANJAS DE CARACOLES.	176
6.4. EVALUAR ALTERNATIVAS PARA EL CONTROL DE CONTAMINACIÓN MICROBIOLÓGICA.	182
6.5. EFECTO EN CARACOLES DE LA ADMINISTRACIÓN DE <i>Lactobacillus plantarum</i> Ca7 A ESCALA DE LABORATORIO.	189
7.CONCLUSIONES	190
8. BIBLIOGRAFÍA	190

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición nutricional del caracol.....	5
Tabla 2. Variedades y características del caracol <i>Helix aspersa</i>	9
Tabla 3. Ingredientes y sus proporciones en pienso comercial.....	11
Tabla 4. Componentes y sus proporciones en pienso comercial.	12
Tabla 5. Detección de microorganismos a partir de muestras obtenidas mediante hisopos estériles en salas limpias.	108
Tabla 6. Detección de microorganismos a partir de muestras obtenidas mediante hisopos estériles en nave en los que los caracoles reciben pienso sin adición de probiótico, en su alimentación.	108
Tabla 7. Presencia de microorganismos en hisopado en salas con caracoles alimentados con pienso base con adición de un probiótico.	109
Tabla 8. Recuento de microorganismos (UFC/placa) a partir de muestras de superficie mediante placas de RODAC en distintas naves.	110
Tabla 9. Recuento de microorganismos (UFC/placa) en muestras ambientales en las distintas salas de la nave.....	111
Tabla 10. Porcentaje de muestras positivas o negativas, y recuento de UFC/mL de microorganismos presentes en muestras de agua de red y de pozo.	112
Tabla 11. Concentraciones de microorganismos (Log_{10} UFC/gr) presentes en distintos tipos de piensos analizados.	113
Tabla 12. Caracol sano. Valores de concentraciones de microorganismos expresadas en Log_{10} UFC/gr halladas en porciones del tracto digestivo.	116
Tabla 13. Caracoles enfermos. Valores de concentraciones de microorganismos expresadas en Log_{10} UFC/gr halladas en porciones del tracto digestivo.	117
Tabla 14. Heces de caracoles. Valores de concentraciones de microorganismos expresadas en Log_{10} UFC/gr presentes en los tres grupos de animales analizados.	119
Tabla 15. Recuentos obtenidos en viales que contienen la cepa probiótica durante el proceso de congelación y liofilización.....	122
Tabla 16. Resultados de ensayo de interacción en placa, entre el sobrenadante obtenido de la cepa crecida e incubada a distintas condiciones. Valores de diámetro de inhibición en milímetros (mm).....	125

Tabla 17. Resumen de parámetros a considerar en el cálculo de gramos a pesar de biomasa probiótica a incorporar al pienso.....	130
Tabla 18. Valores de estabilidad de la concentración y porcentaje de reducción de <i>Lactobacillus plantarum</i> Ca7 incorporado en pienso.....	130
Tabla 19. Concentración de <i>Lactobacillus plantarum</i> Ca7 obtenida a partir de muestras de agua de red y pozo	132
Tabla 20. Porcentaje de pérdida de viabilidad a través del tiempo de <i>Lactobacillus plantarum</i> diluida	132
Tabla 21. Valores de concentración y porcentaje de reducción de <i>Lactobacillus plantarum</i> Ca7 incorporado en equipo de agitación.....	135
Tabla 22. Valores de concentración (Log ₁₀ UFC/mL) de viabilidad en el tiempo, de cultivos liofilizados preparados con distintas bases y diluidos en solución de Ringer a proporción 1:10.....	137
Tabla 23. Valores de concentración de <i>Lactobacillus plantarum</i> Ca7 en las distintas concentraciones utilizadas en la solución de máquina y su respectivo valor a la salida en el agua de riego.....	139
Tabla 24. Evaluación y presencia de otros microorganismos contaminantes en la solución de la máquina y el agua de la mezcla.	139
Tabla 25. Diámetros de los halos de inhibición de cinco patógenos frente a la presencia de sobrenadante de <i>Lactobacillus plantarum</i> Ca7 a diferentes concentraciones.	141
Tabla 26. Valores de diámetro de inhibición obtenidos en el ensayo de interacción en placa entre preparaciones de cultivos liofilizados que contienen una porción de sobrenadante y <i>Escherichia coli</i>	143
Tabla 27. Valores de Densidad óptica (DO) obtenidos a las 24 horas de incubación.....	144
Tabla 28. Valores de Densidad óptica (DO) relacionados con la formación de la biopelícula.....	145
Tabla 29. Valores de DO y porcentaje reducción de la biopelícula en ensayo de inhibición.....	146
Tabla 30. Valores de DO y porcentaje reducción de la biopelícula en ensayo de disrupción.....	147
Tabla 31. Valores de diámetro de concha (mm) de caracoles de 1 año de vida al inicio y final del experimento.	150

Tabla 32. Valores de diámetro de concha (mm) de caracoles de 3 meses de vida al inicio y final del experimento.....	151
Tabla 33. Valores de R^2 de los distintos grupos de microorganismos para cada grupo de caracoles, y de cada preparación de pienso evaluado.....	156
Tabla 34. Número de caracoles muertos durante el ensayo.....	156

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Caracol <i>Helix aspersa</i> Müller.....	9
Figura 2. Principales mecanismos de acción de los probióticos.....	25
Figura 3. Esquema representativo de la morfo-anatomía del tracto digestivo del caracol.....	58
Figura 4. Caracol sano. Concentraciones Log_{10} UFC/gr de microorganismos presentes en porciones del tracto digestivo.	116
Figura 5. Caracol enfermo. Concentraciones Log_{10} UFC/gr de microorganismos presentes en porciones del tracto digestivo.	117
Figura 6. Heces de caracoles. Concentraciones Log_{10} UFC/gr de microorganismos presentes en los tres grupos de animales analizados.....	118
Figura 7. Concentración post-incubación de <i>Lactobacillus plantarum</i> Ca7 crecida en medio MRS con y sin adición de Tween 80, e incubada en distintas condiciones	120
Figura 8. Crecimiento de <i>Lactobacillus plantarum</i> Ca7 frente a la presencia de distintas concentraciones de Tween 80.	121
Figura 9. Recuentos Log_{10} UFC/mL de <i>L. plantarum</i> Ca7 crecida en condición de estrés salino.	123
Figura 10. Concentración y valores de pH de cultivos de <i>Lactobacillus plantarum</i> Ca7 crecida e incubada en distintas condiciones.....	124
Figura 11. Porcentaje de reducción de estabilidad de <i>Lactobacillus plantarum</i> Ca7 crecida en condición de estrés salino y liofilizada.....	126
Figura 12. Porcentaje de reducción de estabilidad de <i>L. plantarum</i> Ca7 crecida en condición normal y liofilizada.....	126

Figura 13. Porcentaje de reducción de estabilidad para <i>Lactobacillus plantarum</i> Ca7 liofilizada proveniente de crecimiento en condición de estrés salino y utilización de maltodextrina como crioprotector.....	127
Figura 14. Porcentaje de reducción de estabilidad para <i>L. plantarum</i> Ca7 liofilizada proveniente de crecimiento en MRS sin Tween 80 y utilización de maltodextrina como crioprotector.	128
Figura 15. Comportamiento del porcentaje de reducción de viabilidad en <i>Lactobacillus plantarum</i> Ca7 incorporada al pienso durante 90 días.	131
Figura 16. Comportamiento del porcentaje de reducción de viabilidad de <i>Lactobacillus plantarum</i> Ca7 diluida en agua de red y agua de pozo	133
Figura 17. Comportamiento del porcentaje de reducción de viabilidad de <i>Lactobacillus plantarum</i> Ca7 incorporada en equipo de agitación durante cinco días.	135
Figura 18. Porcentajes de reducción de viabilidad de <i>Lactobacillus plantarum</i> Ca7 durante cuatro horas y diluida en agua de pozo. Evaluación realizada por cinco días.	136
Figura 19. Porcentajes de reducción de viabilidad de cultivos liofilizados de <i>Lactobacillus plantarum</i> Ca7, y diluidos en solución de Ringer a proporción 1:10 durante 4 días.	137
Figura 20. Recuentos y estabilidad en el tiempo de las distintas preparaciones de cultivos liofilizados que contienen una porción de sobrenadante almacenadas a 5°C.	142
Figura 21. Gráfico con los valores de DO obtenidos en el ensayo de inhibición de formación de una biopelícula de <i>Staphylococcus aureus</i>	146
Figura 22. Gráfico con los valores de DO obtenidos en el ensayo de disrupción de una biopelícula madura formada por <i>Staphylococcus aureus</i>	147
Figura 23. Recuento de enterobacterias de diversas preparaciones de pienso y aditivos acidificantes.	148
Figura 24. Recuento hongos miceliares de diversas preparaciones de pienso y aditivos acidificantes.	149
Figura 25. Efecto de distintas formulaciones de piensos sobre el crecimiento de la concha en caracoles de 1 año.....	151
Figura 26. Efecto de distintas formulaciones de piensos sobre el crecimiento de la concha en caracoles de tres meses de vida.....	152

Figura 27. Recuentos en el tiempo y línea de regresión de cada grupo de microorganismos analizados desde las heces de caracoles con 3 meses de edad y alimentados con el pienso 1.	153
Figura 28. Recuentos en el tiempo y línea de regresión de cada grupo de microorganismos analizados desde las heces de caracoles con 1 año de edad y alimentados con el pienso 1.	153
Figura 29. Recuentos en el tiempo y línea de regresión de cada grupo de microorganismos analizados desde las heces de caracoles con 3 meses de edad y alimentados con el pienso 2.	154
Figura 30. Recuentos en el tiempo y línea de regresión de cada grupo de microorganismos analizados desde las heces de caracoles con 1 año de edad y alimentados con el pienso 2.	154
Figura 31. Recuentos en el tiempo y línea de regresión de cada grupo de microorganismos analizados desde las heces de caracoles con 3 meses de edad y alimentados con el pienso 3.	155
Figura 32. Recuentos en el tiempo y línea de regresión de cada grupo de microorganismos analizados desde las heces de caracoles con 1 año de edad y alimentados con el pienso 3.	155
Figura 33. Análisis microbiológico del pienso 1 a través del tiempo.	157
Figura 34. Análisis microbiológico del pienso 2 a través del tiempo.	157
Figura 35. Análisis microbiológico del pienso 3 a través del tiempo.	158

ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS

Fotografía 1. Especies comestibles de caracoles terrestres pertenecientes al género <i>Helix</i>	4
Fotografía 2. Sistema de cría intensiva en Helicicultura	7
Fotografía 3. Salas de reproducción en nave helicícola empresa Cal Jep.	48
Fotografía 4. Caracoles en ensayo de laboratorio	102
Fotografía 5. Órganos de <i>Helix aspersa</i> Müller, obtenida por disección del caracol.	114

Fotografía 6. Separación de porciones del tracto digestivo en caracol <i>Helix aspersa</i> Müller.	115
Fotografía 7. Placa Petri de MRS con crecimientos de <i>Lactobacillus plantarum</i> Ca7 proveniente del desarrollo del microorganismo a distintas concentraciones de NaCl.	123
Fotografía 8. Visualización de efecto inhibitorio de <i>Lactobacillus plantarum</i> Ca7 crecida en condición de estrés salino (6% de NaCl).	125
Fotografía 9. Botellas con crecimiento bacteriano de <i>Lactobacillus plantarum</i> Ca7.....	129
Fotografía 10. Equipo de agitación y mantención de temperatura con cultivo de <i>Lactobacillus plantarum</i> Ca7.	134
Fotografía 11. Instalación de máquina de agitación conectada a estanques con agua de pozo para realizar la mezcla.....	138
Fotografía 12. Máquina de agitación instalada en granja helicícola.....	138
Fotografía 13. Vial de vidrio con sobrenadante liofilizado de <i>Lactobacillus plantarum</i> Ca7.....	140
Fotografía 14. Visualización de los halos de inhibición sobre <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	141
Fotografía 15. Ensayo de interacción en placa, con la utilización del producto obtenido finalizado el proceso de liofilización a partir de distintas preparaciones de cultivos liofilizados que contienen una porción de sobrenadante.	143
Fotografía 16. Placas de microtitulación de 96 pocillos utilizadas para el ensayo de determinación de biopelícula.....	145
Fotografía 17. Visualización del efecto de preparaciones de piensos que incorporan antifúngicos y/o acidificantes sobre <i>Lactobacillus plantarum</i> Ca7.....	149

1. INTRODUCCIÓN

1.1. ASPECTOS BIOLÓGICOS Y ECOLÓGICOS DEL CARACOL TERRESTRE

El caracol terrestre es un molusco gasterópodo perteneciente al Orden Pulmonados, al Suborden Estilomatóforos, y a la Familia de los Helícidos. Desde un punto de vista biológico, después de los artrópodos, los helícidos son el segundo grupo zoológico con mayor éxito en el medio terrestre gracias a sus amplios recursos adaptativos que les permiten habitar en un amplio espectro de biotipos terrestres (Arrébora y Álvarez, 2001).

La distribución geográfica de estos caracoles depende de las condiciones climáticas, de la altitud y del sustrato. En general requieren suelos calizos, bien sean selváticos o con escasa vegetación, y la presencia un ambiente húmedo es indispensable para regular su actividad fisiológica. El óptimo de humedad relativa oscila entre 75% y 90%, y en el caso de la temperatura es de 15 - 20 °C. El incremento o disminución de estos valores puede disminuir o paralizar sus funciones vitales (Cuellar y Cuellar, 2002).

Se pueden identificar tres fases fisiológicas en el ciclo vital de los caracoles que están relacionadas con las condiciones ambientales higrométricas y térmicas:

- vida activa
- estivación
- hibernación

La vida activa corresponde a la fase en que los caracoles se alimentan y presentan actividad, principalmente durante los meses de primavera y de otoño, coincidiendo con las temporadas de crecimiento y reproducción. En esta fase el caracol se alimenta continuamente para fortalecerse y crecer, y finalmente inicia su actividad de apareamiento y posterior puesta de sus huevos (Cuellar y Cuellar, 2002; Marasco y Murciano, 2000; Pereyra *et al.*, 2003).

La estivación es un estado letárgico que se desarrolla en las épocas de máximo calor y menor humedad ambiental y cuya duración puede llegar a

alcanzar hasta cuatro meses. Durante este tiempo el metabolismo del caracol disminuye, pudiendo llegar a paralizarse. Esta fase puede no existir si las condiciones climáticas no llegan a ser extremas. En climas atlánticos no se produce estivación si el verano es suficientemente lluvioso (Cuellar y Cuellar, 2002; Marasco y Murciano, 2000; Pereyra *et al.*, 2003).

Igual que la anterior, la hibernación es un estado letárgico que se produce cuando baja la temperatura o disminuye la alimentación, generalmente coincide con las bajas temperaturas invernales y con otros factores como la disminución del fotoperíodo. Durante esta fase de la vida del caracol, se paralizan las funciones digestivas y la frecuencia cardíaca, llegando hasta tres contracciones por minuto a 0°C, cuando en condiciones normales presentan de 20 a 35 contracciones por minuto. Durante este letargo el caracol se mantiene vivo a través de las reservas acumuladas, especialmente del glucógeno del hepatopáncreas.

Este estado es más pronunciado y duradero que el de estivación, pudiendo mantenerse varios meses en función de las condiciones climáticas. Algunos autores indican que la hibernación corresponde a un fenómeno de reposo fisiológico interno necesario para la recuperación de los órganos reproductores y las funciones sexuales, y que una hibernación mínima de tres meses favorece la reproducción hermafrodita. Lo mismo ocurre con el crecimiento, los caracoles en estado juvenil presentan un fenómeno compensatorio que les permite alcanzar el mismo estado de desarrollo al cabo de cinco meses, tanto los que han permanecido un mes de hibernación como los que han estado dos o tres meses (Cuellar y Cuellar, 2002; Marasco y Murciano, 2000; Pereyra *et al.*, 2003).

En estas dos fases fisiológicas, los caracoles operculan en el interior de la concha mediante la secreción de una sustancia mucosa, que en contacto con el aire se endurece y forma el epifragma. En el caracol *Helix aspersa* el epifragma es mucoso, mientras que en el de *Helix pomatia* es de tipo calcáreo (Cuellar y Cuellar, 2002; Marasco y Murciano, 2000; Pereyra *et al.*, 2003).

Desde el punto de vista etológico estos animales están influenciados principalmente por factores abióticos (radiación solar, agua, viento, etc.) y por

factores bióticos, con los cuales pueden establecer relaciones mutuas de cooperación o de competencia.

En general el caracol es un animal de costumbres nocturnas. Durante el día se resguarda del calor y de la luz, refugiándose en la sombra o en sectores húmedos del ambiente. El fotoperíodo y las condiciones de humedad y temperatura determinan dos períodos de máxima actividad durante el día, uno a la puesta del sol y otras seis horas después del crepúsculo. En días húmedos o lluviosos estos períodos de actividad pueden alargarse considerablemente.

Finalizado el período de actividad el caracol regresa al mismo lugar de descanso que ocupó durante el día. Esto mismo sucede en la conducta estacional de hibernación y estivación (Cuellar y Cuellar, 2002; Marasco y Murciano, 2000; Pereyra *et al.*, 2003).

1.2. HELICICULTURA

1.2.1. Aspectos generales

Entre las especies de caracoles con mayor interés zootécnico y bromatológico podemos encontrar las del género *Helix*, en que destacan *Helix aspersa* Müller, *Helix pomatia* Linné y *Helix lucorum* Linné (Fotografía núm. 1), las que se pueden diferenciar externamente por el tipo y coloración de la concha (Cuellar y Cuellar, 2002; Pereyra *et al.*, 2003).



Helix aspersa Müller

Helix pomatia Linné

Helix lucorum Linné

Fotografía 1. Especies comestibles de caracoles terrestres pertenecientes al género *Helix*.

Adaptado de www.biolib.cz

La utilización de caracoles como parte de la dieta del hombre se remonta a tiempos prehistóricos, así ha quedado al descubierto al hallar restos fósiles de moluscos en cavernas de América y Europa (Mead *et al.*, 2010; Diéguez y Montero, 1997). Posteriormente durante la antigua Roma comenzó la crianza de estos animales, ya que idearon los primeros recintos conocidos para este fin, donde existían secciones separadas para las diferentes especies, introduciendo además la selección de mejores ejemplares para la reproducción (Duhart, 2009).

La práctica de criar caracoles destinados a la alimentación es una actividad zootécnica que ha alcanzado un auge particular y relevante en el campo de la explotación comercial. Esta actividad se conoce como Helicicultura, que podemos definirla como “Cría a ciclo biológico completo de caracoles comestibles terrestres” (Cuellar y Cuellar, 2002; Cuellar *et al.*, 1991).

1.2.2. El caracol como alimento

A nivel nutricional o bromatológico, el caracol tiene un gran poder nutritivo siendo muy rico en proteínas (proporcionalmente de 5 a 6 veces mayor que la carne de bóvidos), con un alto contenido de minerales como calcio, magnesio, cobre y zinc, y una escasa proporción de lípidos. En el caso de las proteínas sus porcentajes de 13% a 15%, de minerales de 1,8% a 2,0%, y de calorías de 73,0% a 82,7% (Cuellar y Cuellar, 2002).

La Tabla núm. 1 indica detalladamente la composición nutricional del caracol como alimento:

Tabla 1. Composición nutricional del caracol.

Composición por cada 100 gr de porción comestible	valor
Energía (Kcal)	78
Proteínas (g)	16,3
Lípidos totales (g)	1,4
Hidratos de carbono (g)	0
Fibra (g)	0
Agua (g)	82,3
Calcio (mg)	140
Hierro (mg)	10,6
Yodo (µg)	6
Magnesio (mg)	250
Zinc (mg)	4,4
Sodio (mg)	70
Potasio (mg)	382
Fosforo (mg)	272
Selenio (µg)	27,4
Tiamina (mg)	0,04
Riboflavina (mg)	0,14
Equivalentes niacina (mg)	41
Vitaminas B6 (µg)	0,13
Folatos	6
Vitamina B12 (µg)	Trazas
Vitamina C (mg)	Trazas
Vitamina D (µg)	Trazas
Vitamina E (mg)	0,8

Extraído de: Tabla de composición de alimentos (Moreiras *et al.*, 2013).

1.2.3. Recolección y consumo de caracoles

Hasta hace algunas décadas, el consumo de caracoles se realizaba a través de la simple recolección de caracoles del medio ambiente, la mayoría de las veces para consumo propio o bien para vender en el mercado local. A partir de finales del siglo XIX, las cualidades gastronómicas del caracol comenzaron a ser tan apreciadas que pasó a convertirse en un alimento muy solicitado. En el año 1952, en Francia se consumieron 40.000 toneladas de caracoles, 10 veces la cantidad consumida en 1910. Después de los años 1960 los intentos de cría del caracol fueron realizados por criaderos particulares en instalaciones rústicas al aire libre. En las últimas décadas la cría casera de caracoles ha adquirido gran auge en Francia e Italia. En Alemania, especialmente en el sur, han conseguido avances espectaculares en sus viveros caseros de caracoles, y en América del sur y Estados Unidos se han establecido grandes criaderos al aire libre (Cuellar y Cuellar, 2002; Cuellar *et al.*, 1991).

En España esta actividad de aprovechamiento del caracol terrestre como recurso alimenticio posee un gran arraigo cultural, especialmente en algunas comunidades autónomas como la de Andalucía, Aragón, Valencia y Catalunya (Arrébora y Álvarez, 2001).

Desde unos 20 años la Helicicultura en España está comenzando a adquirir interés bajo un punto de vista industrial, en que los criaderos más avanzados se establecen de tal forma que les permite conseguir un sistema de cría intensiva (Fotografía núm. 2) y no extensiva como se viene realizando en otros países de la unión europea.



Fotografía 2. Sistema de cría intensiva en Helicicultura.

Adaptado de: www.agromeat.com

Este tipo de sistema de cría permitir instalar de criaderos en zonas donde las condiciones climáticas no son favorables al desarrollo natural del caracol. Asimismo, se requiere de una mayor inversión económica, debido a que se necesita una infraestructura para mantener estable la temperatura y humedad del criadero o granja.

Regularmente la cría intensiva se realiza en recintos cerrados, en mesas de cría de planos verticales lo que permite incrementar considerablemente la superficie de cría y obtener el mayor aprovechamiento de la superficie del criadero.

El ambiente de estas salas estará totalmente controlado respecto a la temperatura 18°C / 20°C, humedad 75% / 90% y fotoperíodo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad para lograr el microclima ideal, siendo además fundamental mantener un estricto control de la higiene del pienso y de los parámetros climáticos para obtener éxito en la explotación del caracol.

1.2.4 El caracol *Helix aspersa*

Helix aspersa Müller (1774) es la especie de caracol terrestre de mayor uso para crianza por su alta prolificidad y capacidad de adaptación a climas templados oceánicos, semicontinentales e incluso tropicales, presentando un variado polimorfismo en su concha: forma, talla, coloración, y espesor de su concha (Cuellar y Cuellar, 2002; Cuellar *et al.*, 1991).

Helix aspersa, se conoce también como “petit-gris” o “chagriné” por los franceses (Figura núm. 1). Su tamaño oscila de 20 mm a 40 mm de alto y de 24 mm a 45 mm de ancho. Su color es parduzco con franjas oscuras transversales a la línea de sutura. La concha tiene forma de cono convexo y globoso no umbilicado con 4 o 5 espiras. La abertura de la boca es oblicua y ovalada, presentando un peristoma gris-amarillento. La pared interna es de color uniforme pajizo blanquecino. Durante los períodos de descanso el epifragma presenta coloración parda, es traslucido y tiene reflejos irisados. El grosor del epifragma varía de invierno a verano, siendo mayor su espesor en épocas frías aumentando así su capacidad protectora. Habita principalmente en campos, setos y jardines sobre todo en zonas húmedas y sombrías pudiendo alcanzar altitudes de hasta 1200 metros. Hiberna enterrado en tierra blanda a profundidad de 5 a 10 cm, en el hemisferio norte sale en los meses de marzo o abril, reproduciéndose a principios de primavera y en otoño. Deposita sus huevos en la tierra dentro de pequeños agujeros de 5 a 6 cm de profundidad, en número de 80 a 100. Los huevos eclosionan a los 13-15 días. Su distribución es cosmopolita, hallando sus mayores concentraciones en Francia, España, Suiza y Alemania. En España se encuentra principalmente en la mitad norte, siendo más abundantes en Galicia, borde Cantábrico, Pirineos y Catalunya (Cuellar y Cuellar, 2002; Cuellar *et al.*, 1991).

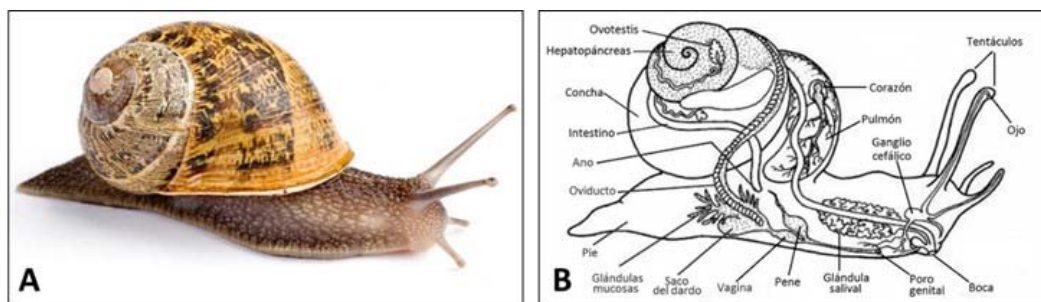


Figura 1. Caracol *Helix aspersa* Müller. A) anatomía externa; B) anatomía interna.
Adaptado de: <http://www.thesnailwrangler.com>

Según el tamaño del caracol *Helix aspersa* se distinguen cuatro variedades (Tabla núm. 2):

Tabla 2. Variedades y características del caracol *Helix aspersa*.

Variedad	Peso (gr)	Diámetro de concha (mm)
Menor o enana	5	28
Normal	5-15	28-40
Grande	15-20	40-45
Máxima o gigante	20-25	45

1.2.5. Datos estadísticos de producción en España

El Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente español, indica que al ser la Helicicultura una actividad reciente, los datos que se disponen son estimativos, si bien el consumo de caracoles es tradicional, su comercialización no está plenamente regulada (MAGRAMA, 2010).

Los datos estimativos que se disponen tienen su fuente en estudios de mercado, y nos indican un consumo de caracoles anual de 400 gr / persona / año en España, lo que supondría unos 16 millones de kilogramos anuales (MAGRAMA, 2010).

Existen más de cien explotaciones helicícolas regularizadas legalmente, sin embargo, el caracol de crianza alcanza el 3% del total comercializado, por lo tanto, el origen mayoritario del caracol que se consume es silvestre. Para Catalunya el Ministerio indica que en el Registro de Explotaciones Ganaderas de del año 2010 se registraron 49 explotaciones, con una capacidad para 25.333.930 individuos y un censo medio de 10.133.349 cabezas.

1.2.6. Alimentación en la cría del caracol

La alimentación de los caracoles es a base de productos vegetales, ya que los helícidos son fitófagos, y en algunos casos detritívoros, sin embargo, en Helicicultura la alimentación se realiza básicamente a base de piensos concentrados especiales para caracol, aunque en algunas fases tempranas del desarrollo del caracol (alevín) igualmente se utilizan vegetales en la alimentación, principalmente como profilaxis de enfermedades.

Las granjas que utilizan el sistema de crianza intensiva requieren que la principal vía de engorde de sus caracoles sea a base de piensos compuestos, que son desarrollados especialmente para estos animales. Es un pienso de harina, de textura muy fina, lo cual es especialmente importante en la zona de maternidad, puesto que así lo consumen mejor (ANCEC, 2007).

El pienso estará compuesto principalmente por harina de diversos cereales y forrajes, aportando de esta manera proteínas, celulosas, calcio, vitaminas, y oligoelementos.

A continuación, se detallan los ingredientes (Tabla núm. 3), y los componentes (Tabla núm. 4) del pienso comercial con sus respectivos porcentajes.

Tabla 3. Ingredientes y sus proporciones en pienso comercial.

Ingredientes principales	Porcentaje
Maíz	30,0
Carbonato cálcico	28,6
Soja	19,4
Cebada	8,0
Alfalfa	5,0
Fosfato bicálcico	4,0
Salvado de trigo	3,5
Sal	0,5
Cascarilla de soja	0,5
Aceite de soja	0,2
Corrector base	0,1

Fuente: Pienso para caracoles. Empresa Pinallet®.

Tabla 4. Componentes y sus proporciones en pienso comercial.

Componentes	Porcentaje
Proteína bruta	13,43
Aceites y Grasas brutas	1,92
Fibra bruta	3,05
Ceniza bruta	31,19
Lisina	0,69
Metionina	0,21
Calcio	12,10
Sodio	0,24
Fósforo	1,0

A la composición indicada se le añade Vitamina A y D3 a concentración 15000 UI/K y 3000 UI/K respectivamente.

Fuente: Piensos para caracoles. Empresa Pinallet®.

1.2.7. Enfermedades de etiología microbiológica y parasitaria.

La Helicicultura no está ajena a la manifestación de procesos patológicos que afectan considerablemente la rentabilidad de esta actividad. Actualmente el conocimiento e información de las enfermedades que afectan a los caracoles son muy limitadas. La patología que se manifiesta será distinta, según la localización y el tipo de criadero (aire libre, ambiente controlado o mixto). Desde el punto de vista microbiológico la presencia de microorganismos patógenos es más frecuente en explotaciones intensivas, mientras que la acción negativa de parásitos y depredadores se detecta con más frecuencia en sistemas de cría extensiva.

La única enfermedad bacteriana de tipo epizoótica descrita, hasta el presente, es la causada por *Pseudomonas aeruginosa*. Esta infección es de ubicación intestinal y desencadena un proceso de septicemia y finalmente muerte de los caracoles, pudiendo ocasionar en poco tiempo una elevada mortalidad, en algunos casos puede llegar a afectar al 60% de la explotación helicícola en corto período de tiempo. En individuos sanos se pueden aislar cepas de este microorganismo, indicando que en condiciones normales *P. aeruginosa* forma parte de la microbiota normal del animal (Martínez, 2001).

Los cuadros clínicos observados en caracoles afectados *P. aeruginosa*, son muy típicos: primero permanecen en el interior de la concha sin producir moco, ni siquiera al tocarlos; a continuación se produce una parálisis del animal impidiéndole a este retraerse totalmente dentro de la concha; y finalmente el proceso termina con la formación de un líquido verdoso que se extiende alrededor del cuerpo e interior de la concha, desprendiendo un olor desagradable, lo que hace suponer que existe un proceso fermentativo producido por las cepas de *Pseudomonas*.

Generalmente cuando el animal lleva algún tiempo enfermo, no sólo se aíslan cepas de *Pseudomonas* en sus cavidades, sino que también aparecen otras bacterias, sin embargo, en algunos casos *P. aeruginosa* es la única bacteria causante de enfermedad.

El primer indicio de la existencia de esta enfermedad en una explotación helicícola es la aparición de caracoles muertos, los cuales se presentan con la abertura de la concha hacia arriba y el animal muerto en su interior; cuando han transcurrido varias horas desde la muerte, el cuerpo del caracol se presenta totalmente licuado.

En caracoles criados individualmente a 18°C, con alimentación de pienso contaminado durante 6 días, la mortalidad no supera el 8%, mientras que, si la humedad relativa es del 100% y la temperatura de 24°C, los desajustes alimenticios producidos por *Pseudomonas aeruginosa* provocan una mortalidad de un 20% a los 15 días, que aumenta progresivamente en el tiempo (Cuellar y Cuellar, 2002; Cuellar *et al.*, 1991).

La manifestación de esta patología es debida principalmente a problemas higiénicos en la granja que conlleva a la contaminación del alimento, o por cambios bruscos ambientales de calor y/o humedad. Esta enfermedad es controlable con tratamiento antibiótico o sulfamidas, que se administran a través del agua de riego o mezclado con el pienso. Entre los antibióticos más eficaces citaremos: gentamicina, trobamicina, amikacina y carbenicilina, y entre las sulfamidas: la sulfamerazina y sulfametazina (Cuellar y Cuellar, 2002)

Aunque hasta ahora no se hayan descrito otras bacteriosis en caracoles de cría, es posible que puedan verse afectados por otros agentes etiológicos descritos como parte de la microbiota normal de estos animales entre los que destacaremos a los pertenecientes a géneros como *Escherichia*, *Klebsiella*, *Aeromonas*, *Streptococcus*, *Listeria*, *Clostridium* (Cicero *et al.*, 2015; Vilena *et al.*, 2010; Kiebre-Toe *et al.*, 2003; Kiebre-Toe *et al.*, 2005; Pérez *et al.*, 2014)

En los criaderos también se describen con frecuencia, elevadas tasas de mortalidad sin que lleguen a alcanzar el carácter de epizootias. Se pueden observar una serie de síntomas consistentes en la pérdida de reflejos, retracción incompleta en la concha, el pie adquiere coloración amarillenta o verdosa en sus márgenes, la cabeza aumenta de tamaño y no se retraen los tentáculos oculares, frecuentemente hay una dilatación del poro genital. Asimismo, existe una emisión de moco filante por la boca y cuando el caracol muere se forma un líquido claro en el interior de la concha. En estos casos se detecta una variada

microbiota formada por bacterias Gram positivas (esporuladas y no esporuladas) y Gram negativas de las Familias Enterobacteriaceae y Pseudomonadaceae (Cuellar y Cuellar, 2002).

Asimismo, también se detectan micosis como otras patologías en estos animales, los géneros de hongos filamentosos mayoritariamente implicados en estos procesos son: *Fusarium*, *Verticillium* y *Aspergillus*. Especies de los dos primeros, inciden negativamente sobre las puestas. Mientras que las del género *Aspergillus*, afectan a los caracoles ya nacidos, tanto en estadios juveniles como adultos (Martínez, 2001).

Las especies del género *Fusarium*, son los agentes etiológicos de la denominada enfermedad de la “puesta rosa”. Esta patología se caracteriza por la modificación de la turgencia y de la habitual coloración blanco-nacarada de los huevos, que en su lugar presentan tonalidades parduzcas, amarillentas y normalmente rosada. Estas puestas se desecan antes de llegar a producirse la eclosión de los huevos.

En el caso de las especies de *Verticillium*, estas se desarrollan a expensas de los embriones, dando lugar a una red compacta de micelio que invade el huevo, provocando su muerte. Si pueden evolucionar hasta el nacimiento, estos caracoles suelen morir poco tiempo después, sin llegar al estado de adultos (Martínez, 2001).

Determinadas especies del género *Aspergillus*, son responsables de infecciones e intoxicaciones, no sólo de caracoles sino en gran diversidad de animales domésticos y salvajes. Algunas cepas al contaminar los piensos mal conservados o húmedos producen una serie de micotoxinas entre las que destacan las aflatoxinas, que son capaces de desencadenar necrosis hepática, procesos cancerígenos e incluso una muerte rápida, en función de la dosis ingerida (Cullen y Newberne, 1994; Calvo, 2008)

Asimismo, existen patologías de tipo parasitaria, donde son variados los organismos que afectarían a los caracoles, en los que encontramos ácaros, helmintos y dípteros. Ninguno de ellos a excepción de los ácaros producen daños graves en explotaciones industriales.

La acariosis, es una de las enfermedades más graves del caracol, y es producida por el acaro *Riccardoella limacum* (Martínez, 2001).

Riccardoella limacum (Schrank 1776) es un ácaro ectoparásito de gastrópodos terrestres (Fain y Van Goethem, 1986). Este ácaro se alimenta de la sangre del tejido respiratorio de su hospedador, debido a que esta zona se encuentra altamente irrigada por capilares sanguíneos (Baker, 1970), produciendo de esta forma una reducción de sus tasas de crecimiento y actividad, retrasando el desarrollo reproductivo del caracol (Graham *et al.*, 1996). La transmisión se realiza a través del contacto físico entre los caracoles (Baur y Baur, 2005), a través del moco del animal infectado o indirectamente a través del suelo (Schüpbach y Baur, 2008).

El ciclo de vida de este parásito ha sido estudiado bajo condiciones de laboratorio en el caracol *Cornu aspersum* (Graham, 1994). Las hembras del ácaro depositan sus huevos en el tejido respiratorio, posteriormente siguen tres estados de ninfa, para finalizar con un estado sexualmente maduro diferenciando machos y hembras, ambos alcanzan 0,4 mm de largo (Baker, 1970). El tiempo total del ciclo oscila desde 19 a 23 días, cuando la temperatura es de 20°C a 25°C. Durante la hibernación del hospedador, los ácaros en estado adulto raramente sobreviven en la cavidad del manto, sin embargo, una nueva generación de larvas eclosionara desde los huevos resistentes este estado de letargo durante la primavera.

En el caso explotaciones intensivas de caracoles, en las que las condiciones mediambientales están controladas (temperatura y humedad), la hembra del ácaro pone huevos durante todo el año, lo que produce un gran incremento de la parasitación en este tipo de cría. En condiciones naturales las hembras del ácaro la llevan a cabo en primavera y verano.

Esta enfermedad se transmite de forma lenta pero progresiva. Cuando los caracoles tienen una ligera parasitación (<10 ácaros/caracol), se puede detectar al observar el caracol cuando este se encuentre introducido en su concha, donde se observan pequeños puntos blancos moviéndose por su superficie. Según aumenta el número de parásitos se reduce el número de puestas del caracol,

disminuye el número de huevos por puesta y el animal deja de comer progresivamente.

Una elevada concentración de parásitos en la cavidad paleal (>100 ácaros/caracol) produce una reducción del 80% de la población en la explotación, debido a los fuertes procesos anémicos. El 20% de los caracoles morirán progresivamente en pocos meses (Fontanilla, 1998; Martínez, 2001).

1.2.8. Reglamentación y legislación en España para el sector helicícola

Actualmente la Helicicultura busca la comercialización de un producto o caracol de calidad, que sea sometido a rigurosos controles sanitarios y zootécnicos para garantizar los estándares de seguridad alimentaria dispuestos por la Unión Europea.

Debido a diversas crisis alimentarias que en décadas pasadas afectaron a la Unión Europea, se manifestó la necesidad de establecer rigurosos requisitos de higiene y seguridad alimentaria. Estos esfuerzos legislativos quedaron plasmados en el denominado "paquete de higiene", una serie de reglamentos comunitarios de obligada aplicación en el conjunto de los Estados Miembros de la Unión Europea, con los que se establecen las disposiciones aplicables en materia de higiene de los alimentos, independientemente de su origen, centrándose otros textos en los de origen animal por su especial naturaleza.

Con esta nueva visión la producción primaria en la Helicicultura se convierte en el primer eslabón de la cadena alimentaria, figurando el productor primario de la industria helicícola como uno de los responsables de la seguridad del producto final, otorgándole por tanto las responsabilidades derivadas de su actividad (MARM, 2009).

El informe sobre la legislación aplicable a la Helicicultura en materia de seguridad alimentaria del Ministerio Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente, indica que, desde el punto de vista de la legislación comunitaria aplicable, el caracol susceptible de ser vendido está englobado dentro la definición de alimento, tanto si se vende vivo como si no. Esta definición está recogida en el reglamento 178/2002 por el que se establecen los principios y los requisitos generales de la legislación alimentaria.

Al ser considerado alimento, es aplicable toda la legislación en materia de higiene alimentaria. Asimismo, se considera en función de las definiciones posteriores que recoge el mismo reglamento, a los operadores del sector helicícola como “explotadores de empresas alimentarias”, y como “empresa

alimentaria” tanto a las explotaciones de cría y engorde como a todas las que realicen actividades relacionadas con las mismas hasta el consumidor final.

Asimismo, este ministerio indica que, desde el 1 de enero de 2008, el sector helicícola, al igual que el resto de sectores agrícolas y ganaderos, se encuentra recogido dentro del régimen de la Organización Común de Mercados (OCM) única, regulada por el Reglamento (CE) N° 1234/2007 del Consejo de 22 de octubre de 2007, por el que se crea una organización común de mercados agrícolas y se establecen disposiciones específicas para determinados productos agrícolas.

Dentro del ámbito jurídico nacional, las explotaciones helicícolas se encuentran reguladas como actividad ganadera por la Ley 8/2003, de 24 de abril, de sanidad animal, que establece las normas básicas y de coordinación en materia de sanidad animal para todas las explotaciones ganaderas y regula la sanidad exterior en lo relativo a la sanidad animal.

Para los piensos destinados a la alimentación de los caracoles en las granjas, el Reglamento 767/2009 simplifica los procedimientos de etiquetado y comercialización de estos alimentos. Este reglamento mejora la eficacia del sistema general garantizando un elevado nivel de protección de la salud y del bienestar de los animales, así como de la salud pública, donde estos deben cumplir ciertas exigencias en materia de seguridad y comercialización. En particular, deben ser seguros, no tener ningún efecto adverso directo en el medio ambiente ni en el bienestar de los animales, ser sanos, genuinos, no estar adulterados, ser adecuados a sus objetivos y de calidad comercializable, estar etiquetados, envasados y presentados de conformidad con la legislación en vigor, y ajustarse a las disposiciones técnicas sobre impurezas y otros determinantes químicos, asimismo la trazabilidad debe estar garantizada en todas y cada una de las etapas de producción, transformación y distribución. Los piensos que se comercializan en la Comunidad Europea, o que son susceptibles de comercializarse, se etiquetan o identifican de forma adecuada para facilitar su trazabilidad.

1.3. ALIMENTOS FUNCIONALES

Las tendencias mundiales de la alimentación en los últimos años indican un interés acentuado de los consumidores hacia ciertos alimentos, que además de un valor nutritivo aporten beneficios a las funciones fisiológicas del organismo. Así surge el concepto de alimento funcional, amplio abanico de productos nutritivos y no nutritivos que no sólo alimentan, sino que modulando o actuando sobre determinadas funciones y elementos de organismo, tienen un efecto beneficioso en la salud del individuo.

Un alimento funcional se define como aquel que está suficientemente demostrado que actúa beneficiosamente sobre una o más funciones del organismo, más allá de su efecto nutricional, mejorando la salud y el bienestar y/o reduciendo el riesgo de enfermedad.

Puede ser un alimento natural, un alimento al que se ha añadido, eliminado o modificado un componente por medios biotecnológicos, un alimento en el que se ha modificado la biodisponibilidad de uno o más de sus componentes o una combinación de cualquiera de estas posibilidades.

Entre la amplia gama de componentes podemos citar: la adición de microorganismos vivos (probióticos) que ejercen un efecto beneficioso a quien lo consume, y/o la adición de aditivos como son los extractos de plantas.

1.3.1. Probióticos

Los probióticos son definidos como “microorganismos vivos que, cuando se administran en cantidades apropiadas, confieren sobre el huésped un beneficio para la salud” (FAO/WHO, 2006).

El término probiótico significa “a favor de la vida” y actualmente se utiliza para designar las bacterias que tienen efectos beneficiosos para los seres humanos y los animales. La observación original de la función positiva desempeñada por algunas bacterias se atribuye a Eli Metchnikoff, ruso galardonado con el premio Nobel por sus trabajos en el Instituto Pasteur a comienzos del siglo pasado, que afirmó que “la dependencia de los microbios intestinales con respecto a los alimentos hace posible adoptar medidas para modificar la flora de nuestro organismo y sustituir los microbios nocivos por microbios útiles” (Metchnikoff, 1908).

Por entonces el pediatra francés Henry Tissier observó que los niños con diarrea tenían en sus heces un escaso número de bacterias caracterizadas por una morfología peculiar en forma de Y (y griega). Estas bacterias “bífidas” eran, por el contrario, abundantes en los niños sanos (Tissier, 1906). Sugirió así la posibilidad de administrar estas bacterias a pacientes con diarrea para facilitar el restablecimiento de una microbiota intestinal sana.

Las obras de Metchnikoff y Tissier (Metchnikoff, 1908; Tissier, 1906) fueron las primeras en las que se hicieron propuestas científicas con respecto a la utilización probiótica de bacterias, aún cuando la palabra “probiótico” no se acuñó hasta 1960, para designar las sustancias producidas por microorganismos que promovían el crecimiento de otros microorganismos. Fuller en 1989, con objeto de recalcar el carácter microbiano de los probióticos, definió de nuevo el término como “un suplemento dietético a base de microbios vivos que afecta beneficiosamente al animal huésped mejorando su equilibrio intestinal”. Havenaar y Huis In't Veld (1992) propusieron una definición muy similar: “un monocultivo o cultivo mixto viable de bacterias que, cuando se aplica a animales o seres humanos, afecta beneficiosamente al huésped mejorando las propiedades de la flora autóctona”. Una definición más reciente, aunque

probablemente no será la última, es la siguiente: "microorganismos vivos que, cuando se consumen en cantidades apropiadas, confieren al huésped efectos saludables" (Guarner y Schaafsma, 1998).

En salud humana los probióticos más utilizados incluyen a microorganismos pertenecientes al grupo de bacterias ácido lácticas, donde destacan principalmente especies del género *Lactobacillus*, que se han utilizado especialmente en la fermentación de alimentos, así como la utilización de especies de *Bifidobacterium*, microorganismos predominantes en la microbiota intestinal de niños (Naidu *et al.*, 1999; Lorente y Serra, 2001). Asimismo, existen muchos otros microorganismos con actividades potencialmente beneficiosas, tales como especies de *Streptococcus*, *Lactococcus*, y algunas cepas de *Saccharomyces* (Fioramonti *et al.*, 2003).

Las bacterias ácido lácticas son un grupo bacteriano que se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza, asociado tanto a células vegetales, como al tracto intestinal, a fosas nasofaríngeas o a la vagina, de diversas especies animales, incluyendo al hombre.

Se caracterizan por ser bacterias Gram positivas, no esporuladas, que presentan una morfología celular variable, pudiendo presentarse como cocos o como bacilos. Son catalasa y oxidasa negativa debido a la ausencia de citocromos y porfirinas. Las bacterias lácticas son exigentes en cuanto a requerimientos nutricionales, por lo que no son fáciles de cultivar en el laboratorio. Toleran las condiciones ácidas, siendo viables a pH bajo. Se caracterizan también por ser bacterias estrictamente fermentativas que presentan un bajo contenido de G+C en su ADN (<55%) y tienen la capacidad de desarrollarse en presencia de una baja concentración de oxígeno (microaerofilia) o bien en ausencia del mismo (anaerobias estrictas). La característica principal de este grupo de bacterias es la producción de ácido láctico como producto principal resultante de la fermentación de carbohidratos (Carr *et al.*, 2002; Salminen *et al.*, 2004).

Bacterias ácido lácticas con actividad probiótica generalmente pertenecen a la microbiota intestinal, en donde juegan un importante rol benéfico o probiótico sobre el ecosistema del sistema gastrointestinal en humanos. El espectro de esta

actividad benéfica puede ser dividida dentro de efectos nutricionales, fisiológicos y antimicrobianos. Estas observaciones han llevado al desarrollo de una variedad de alimentos destinados al consumo humano y animal que contienen bacterias lácticas para su uso como probióticos (Gerritse, 1990; Naidu *et al.*, 1999).

Además de la administración como probióticos, estas bacterias ácido lácticas poseen otras propiedades, tales como transformación de la lactosa, actividad proteinasa, y producción de bacteriocinas, características que son empleadas industrialmente con un alto valor económico. Muchas de estas propiedades son reguladas genéticamente, a menudo por plásmidos inestables y transferibles de forma natural (McKay, 1985; Naidu *et al.*, 1999; Parvez *et al.*, 2006).

1.3.1.1. Modos de acción de los probióticos

Popularmente se ha asumido que los efectos de los probióticos están relacionados con el sistema gastrointestinal, con incidencia sobre la diarrea y otras infecciones del tracto digestivo. Sin embargo, se ha demostrado que los efectos del consumo de probióticos pueden ser más que generales (Fuller, 1992), y en que el tipo de acción sobre el huésped estará relacionado con la cepa probiótica utilizada (Reid, 2016).

Nagpal *et al.*, (2013) describen algunos de los mecanismos principales de acción de los probióticos:

- Elevada competencia con las bacterias patógenas por nutrientes y lugar de adhesión.
- Producción de sustancias antimicrobianas como son: ácidos orgánicos, peróxido de hidrogeno y bacteriocinas, las cuales tienen efecto antimicrobiano.
- Producción de ácidos grasos de cadena corta por fermentación de hidratos de carbono, que pueden:
 - o Reducir el pH del colon.
 - o Proporcionar nutrientes para las células del colon.
- Reducción de la permeabilidad intestinal.
- Modulación de la función inmune de la mucosa gastrointestinal, incrementando la respuesta inmune humoral.

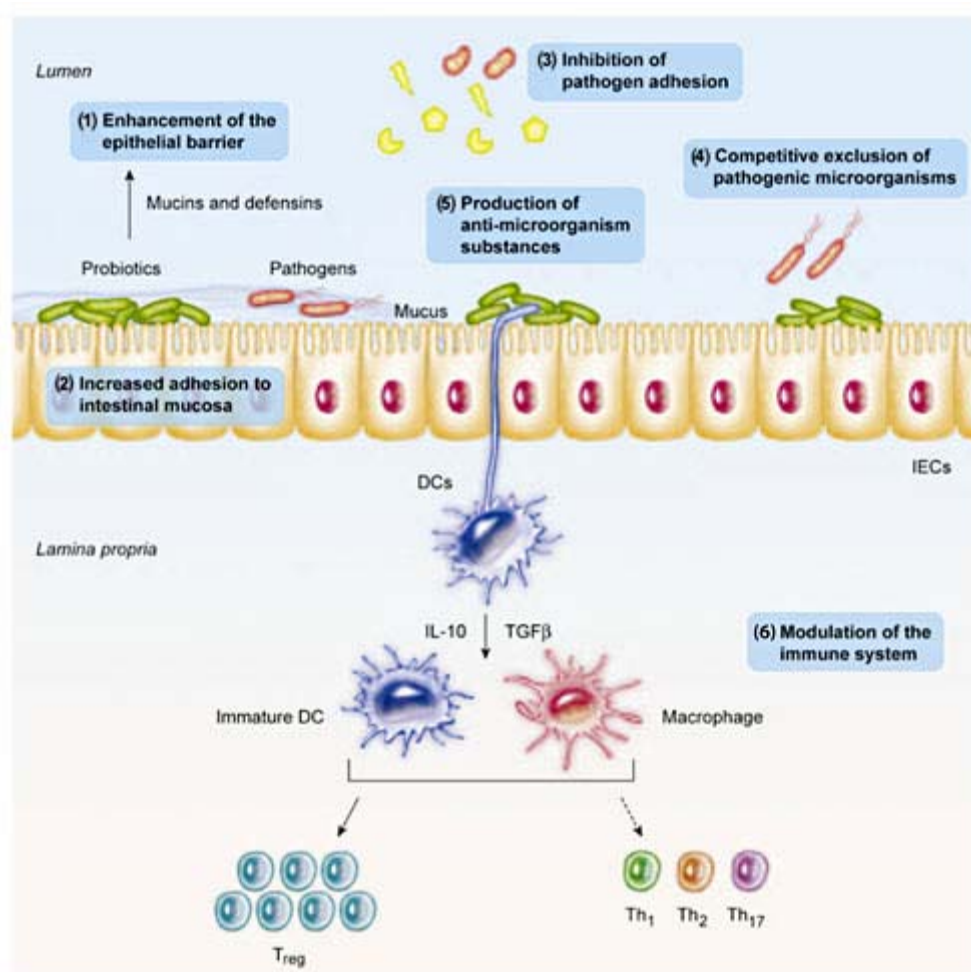


Figura 2. Principales mecanismos de acción de los probióticos.
Adaptado de Bermúdez-Brito *et al.*, (2012).

1.3.1.2. Probióticos en el ámbito veterinario.

Durante muchas décadas los antibióticos han sido usados como aditivos en los piensos de distintas especies de animales de granja, a concentraciones que permitían considerarlos como promotores de crecimiento. En la mayoría de los casos los parámetros de rendimiento, como la ganancia de peso corporal o índice de conversión mejora hasta un 5%. Estos efectos benéficos de los antibióticos pueden ser explicados por modificaciones de las bacterias intestinales y su interacción con el huésped, que incluye además interacciones con el tejido intestinal (renovación de las células epiteliales, formación y secreción de mucina, etc.), así como efectos en el sistema inmune (respuesta de la población de linfocitos, y la formación y secreción de inmunoglobulinas). Esto indicaría que la microbiota intestinal no sólo estará involucrada en la conversión de nutrientes a lo largo del sistema gastrointestinal, sino que también puede afectar o mejorar la salud del animal (Simon *et al.*, 2005).

Debido a la preocupación de que el uso de antibióticos como aditivo para piensos podría contribuir a un aumento de la resistencia bacteriana, la Unión Europea decidió prohibir los antibióticos como aditivos en piensos a partir del primero de enero de 2006, y su uso está restringido solamente a la administración en animales enfermos (Cepero, 2006).

Por esta razón, se iniciaron investigaciones para establecer otras sustancias con efectos beneficiosos sobre los animales a través de la modificación de la microbiota intestinal. Entre estas "alternativas a los antibióticos" podemos citar: probióticos, prebióticos, ácidos orgánicos, y plantas y sus extractos (Valencia y Serrano, 2006; Ramírez *et al.*, 2013).

De la revisión bibliográfica realizada por el Instituto de Investigación y Tecnología Alimentaria de España (IRTA) para la EFSA en el año 2015, se pone en evidencia la existencia de 921 investigaciones que demuestran los beneficios sobre el sistema inmune de diversas especies de animales por la administración de probióticos, y los principales grupos de microorganismos encontrados en esta revisión corresponden a especies de:

- *Lactobacillus*
- *Bacillus*
- *Enterococcus*
- *Bifidobacterium*
- *Clostridium*
- *Pediococcus*
- *Streptococcus*
- *Aspergillus*
- *Saccharomyces*
- *Candida*

En el caracol de cría *Helix aspersa* la única evidencia científica del uso de probióticos, está indicada por la investigación realizada por Pérez (2011) donde concluyó que *Lactobacillus plantarum* Ca7 ejerció un efecto beneficioso principalmente en el número de puestas de estos animales.

1.3.1.2. Proceso de liofilización en probióticos

Para que los probióticos sean efectivos en el huésped, es imprescindible que estos microorganismos sean viables después de su administración oral para lograr su efecto en el animal mediante la modificación de su microbiota. Una cepa probiótica debe ser capaz de ser viable y mantenerse en suficiente concentración en el intestino. Tecnológicamente esto requiere la sobrevivencia del probiótico durante el procesamiento del alimento o pienso, que incluye la granulación por calor en muchas aplicaciones, su estabilidad en el almacenamiento por varias semanas y finalmente ser capaz de resistir los cambios de pH, así como el efecto de diversas enzimas presentes en el sistema gastrointestinal.

Existen diversos mecanismos que permiten preservar la viabilidad de las bacterias a lo largo del tiempo, entre las más destacadas podemos citar la crioconservación y la liofilización.

La crioconservación es el proceso para enfriar y almacenar células, tejidos u órganos a temperaturas muy bajas o congelarlos para guardarlos para su uso en el futuro (Fuller y Paynter, 2004).

La liofilización es la forma clásica de producir un “polvo seco de bacterias” (Heckly, 1984), que además es más fácil de manejar que los productos crioconservados. Este proceso es adecuado para la producción de cultivos bacterianos concentrados, con la ventaja que una vez secos se pueden almacenar a temperatura ambiente (Palmfeldt *et al.*, 2003).

La liofilización es un proceso de conservación mediante la utilización de la sublimación, con el fin de reducir las pérdidas de los componentes volátiles o termo-sensibles. Es el proceso de conservación más utilizado para productos biológicos, porque une los dos métodos más fiables de conservación, la congelación y la deshidratación. Sin conservantes o productos químicos, es el proceso ideal para preservar células, enzimas, vacunas, virus, levaduras, sueros, derivados sanguíneos, algas, así como frutas, vegetales, y alimentos en

general. En este proceso de secado los productos obtenidos no se ven alterados en sus propiedades y se rehidratan fácilmente (Ramírez-Navas, 2007).

Este proceso no altera la estructura físico-química del material, y permite su conservación indefinida sin cadena de frío, con menos del 15% de humedad y alta estabilidad microbiológica (Alvarado, 1996). A diferencia de lo que ocurre en el secado por calor, con la liofilización en el alimento la variación en tamaño es mínima, el aspecto, la textura, el sabor y el aroma no se pierden, se intensifican y se mantienen las propiedades nutricionales (Charm, 1981). Es ideal para conservar productos alimenticios, farmacéuticos y biológicos, que no deben calentarse ni siquiera a temperaturas moderadas (Geankoplis, 1999).

Si bien este proceso es exitoso para microorganismos probióticos, lleva consigo una disminución de células viables a lo largo del tiempo, principalmente si su almacenamiento es a temperatura ambiente. Por esta razón se hace necesario evaluar si la modificación de algunos parámetros y sustancias protectoras involucradas previamente y durante el proceso de liofilización, tales como crecimiento microbiano, temperatura de congelación, solución crioprotectora, o adición de sustancias protectoras frente al estrés celular, pueden conllevar y asegurar un mejor rendimiento productivo, así como una mejor estabilidad en el tiempo y eficacia sobre el huésped por parte de los probióticos (Santivarangkna *et al.*, 2008; Strasser *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2011; Siaterlis *et al.*, 2009).

1.3.2. Extractos de plantas

La búsqueda de sustancias alternativas capaces de mantener por otros medios la productividad y el estado sanitario de las explotaciones animales, así como los estudios relacionados con los efectos de determinados aditivos, sobre todo de origen vegetal, se han multiplicado en los últimos años (Cross *et al.*, 2011).

Las investigaciones de Rubio *et al.*, (Rubio *et al.*, 1995; Rubio *et al.*, 1998; Rubio *et al.*, 2015) y de Ruiz *et al.*, (Ruiz *et al.*, 2010; Ruiz *et al.*, 2015) han indicado que la utilización de determinados aditivos, así como modificaciones en la ración en nutrición animal, pueden dar lugar a cambios potencialmente beneficiosos en la composición de la microbiota intestinal. Por tanto, estos aditivos pueden representar, al menos en parte, una alternativa al uso de antibióticos en el mantenimiento de las condiciones productivo-sanitarias adecuadas.

La adición de extractos de plantas o sustancias de origen vegetal en los alimentos, es una práctica habitual en nutrición humana y animal. Estos extractos de plantas o aditivos fitogénicos comprende un gran número de compuestos y variedad de: plantas, y sus derivados, particularmente aceites esenciales. El modo de acción de estos extractos de plantas se basa en promover el crecimiento de especies bacterianas que son potencialmente beneficiosas para el hospedador y promover el incremento de ácidos grasos de cadena corta en el íleon y colon, mientras reducen a los microorganismos potencialmente perjudiciales, así como la producción de catabolitos derivados de proteínas.

Los extractos de plantas están formados por diferentes compuestos, que incluyen moléculas con propiedades inmunoestimulantes capaces de modular la inmunidad celular y humoral. Estos efectos sobre el sistema inmune son específicos para cada compuesto.

Dentro de la amplia gama de vegetales utilizados encontramos el ajo, la canela, y sus derivados. Actualmente los derivados de ambos vegetales son

utilizados principalmente como aromatizantes y saborizantes en nutrición animal (IRTA, 2015).

Allium sativum Linn, conocido comúnmente como ajo, es una planta anual, de origen asiático, popularmente denominados "cabezas" (Álvarez *et al.*, 1991). Se conocen sus propiedades beneficiosas desde hace 5000 años. Inicialmente en Asia, fue usado por las tribus nómadas para mejorar su salud (Jesse *et al.*, 1997). Todos sus beneficios han formado parte de la medicina popular durante miles de años, y estudios llevados a cabo por numerosos investigadores han aportado un gran número de evidencias farmacológicas que justifican su uso como antihipertensivos (Pedraza-Chaverri *et al.*, 1998; Das *et al.*, 1995) antifúngico (Pai y Platt, 1995; Passwater, 1999), antimicrobiano (Jessee *et al.*, 1997; Ress *et al.*, 1993), antiviral (Weber *et al.*, 1992), y larvicida (Amonkar y Banerji, 1971), entre otros.

A nivel microbiológico, los efectos del ajo han demostrado un amplio espectro antibacteriano sobre bacterias Gram positivas y Gram negativas presentes en la microbiota intestinal animal y humana capaces de causar procesos patológicos (Kumar y Berwal, 1998; Harris *et al.*, 2001). Esta actividad antimicrobiana se debe principalmente a la alicina (Ariga y Seki, 2006), que es la molécula principal, y que además es responsable del sabor y del olor característico e inconfundible del ajo. Esta molécula químicamente es un organosulfonato. En un ajo intacto, la alicina se encuentra en concentraciones bajas, pero cuando el ajo se corta, se aplasta o se tritura, la alicina se forma en cantidades abundantes, debido a que al cortar o aplastar ajo liberan un enzima, la alinasa, que transforma a la aliina en alicina y que es el compuesto responsable del sabor y del olor (Kourounakis y Rekka, 1991; Chung, 2006).

La canela (*Cinnamomum cassia*) es conocida como un estimulante del apetito y de la digestión, y sus propiedades antimicrobianas están principalmente relacionadas con el cinamaldehído que es el componente principal, junto con el eugenol y el carvacrol (Tabak *et al.*, 1999). El cinamaldehído ha sido documentado por poseer actividad antimicrobiana sobre un amplio rango de bacterias (Chang *et al.*, 2001), propiedades antioxidantes (Singh *et al.*, 2007), y propiedades antifúngicas sobre *Aspergillus flavus* (Montes-Belmont

y Carvajal, 1998). Al igual que el ajo, la canela se ha utilizado desde muchos años como planta medicinal, en que los primeros antecedentes se remontan a los antiguos egipcios, hace 2000 años antes de Cristo, tal como indican dibujos hallados en sus pirámides (Jakhetia *et al.*, 2010; Ranasinghe *et al.*, 2013).

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GENERAL

El objetivo general es lograr optimizar y/o generar metodologías que faciliten la correcta administración de la cepa probiótica *Lactobacillus plantarum* Ca7, aislada previamente por Pérez (2011) a partir de heces de caracoles, y que contribuyan a mejorar el estado sanitario de granjas destinadas a cría y engorde del caracol terrestre *Helix aspersa* Müller.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Los objetivos específicos se resumen en base a cinco líneas de investigación:

- i. Evaluar el estado sanitario de una granja helicícola.
- ii. Mejorar la producción de la cepa probiótica destinada a la administración en caracoles.
- iii. Modificar y evaluar nuevas vías de administración del probiótico en granjas de caracoles.
- iv. Evaluar alternativas para el control de contaminación microbiológica.
- v. Estudiar el efecto en caracoles de la administración de *Lactobacillus plantarum* Ca7 a escala de laboratorio.

El desglose de cada objetivo específico se aporta en el Plan de trabajo asociado a cada línea de investigación que se describe a continuación.

3. PLAN DE TRABAJO

3.1. EVALUAR EL ESTADO SANITARIO DE UNA GRANJA HELICÍCOLA

3.1.1. Análisis microbiológico ambiental de granja de helicícola destinada a la reproducción de caracoles.

- a. Evaluación microbiológica de distintas salas de reproducción.
- b. Análisis microbiológico de agua de red y de pozo.
- c. Análisis microbiológico del pienso almacenado.

3.1.2. Evaluación del estado microbiológico de caracoles provenientes de distintas granjas de engorde.

- a. Análisis microbiológico de porciones del tracto gastrointestinal de caracoles.
- b. Análisis microbiológico de heces de caracoles.

3.2. MEJORAR LA PRODUCCIÓN DE LA CEPA PROBIÓTICA DESTINADA A LA APLICACIÓN EN CARACOLES.

3.2.1. Evaluar el efecto de modificaciones de parámetros de incubación que permitan incrementar la concentración de la cepa probiótica en el proceso productivo.

- Evaluación de parámetros de incubación y de modificaciones en la composición del medio de cultivo base.

3.2.2. Evaluar modificaciones de parámetros involucrados en el proceso de liofilización que permitan incrementar la concentración de la cepa probiótica en el proceso productivo.

- a. Evaluar la temperatura de pre-liofilización y su efecto en la concentración de la cepa liofilizada.
- b. Evaluar una condición de estrés para mejorar la estabilidad la cepa liofilizada en el tiempo.
- c. Evaluar la maltodextrina como alternativa a la leche descremada como crioprotector.

3.3. MODIFICAR Y EVALUAR NUEVAS VÍAS DE ADMINISTRACIÓN DEL PROBIÓTICO EN GRANJAS DE CARACOLES.

3.3.1. Administración de la cepa probiótica a caracoles mediante la incorporación en el pienso.

- a. Producción de la biomasa destinada al pienso.
- b. Estabilidad a temperatura ambiente de la cepa probiótica liofilizada.

3.3.2. Administración de la cepa a caracoles mediante la incorporación en el agua de riego.

3.3.3. Desarrollo de una alternativa de administración del probiótico a través de la implementación de un sistema de agitación y distribución en agua de riego.

- a. Estabilidad del cultivo reciente en el sistema de agitación.
- b. Estabilidad del cultivo liofilizado en el sistema de agitación.

3.4. EVALUAR ALTERNATIVAS PARA EL CONTROL DE CONTAMINACIÓN MICROBIOLÓGICA.

3.4.1. Evaluar aplicaciones de la cepa probiótica para el control de contaminación microbiológica.

- a. Utilización del sobrenadante de cultivos como posible control de microorganismos.
 - i. Capacidad inhibitoria de sobrenadante procedente del cultivo.
 - ii. Evaluar incorporar el sobrenadante al proceso de liofilizado de la cepa probiótica como adyuvante al control de microorganismos patógenos en el pienso.
- b. Capacidad de formación de biopelículas.
- c. Capacidad de disrupción y/o inhibición de formación de biopelículas.

3.4.2. Efecto de antifúngicos y acidificantes como control de contaminación microbiológica en piensos.

- Evaluar concentraciones óptimas de acidificantes y fungicidas para su aplicación en piensos de caracoles.

3.5. ESTUDIAR EL EFECTO EN CARACOLES DE LA ADMINISTRACIÓN DE *Lactobacillus* *plantarum* Ca7 A ESCALA DE LABORATORIO.

- Evaluar en laboratorio el efecto probiótico de distintas preparaciones de pienso sobre el crecimiento de caracoles provenientes de granjas.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. EVALUAR EL ESTADO SANITARIO DE UNA GRANJA HELICÍCOLA

4.1.1. Análisis microbiológico ambiental de granja helicícola destinada a la reproducción de caracoles

4.1.1.1. Evaluación microbiológica de distintas salas de reproducción

La evaluación microbiológica contempló determinar la presencia o ausencia de microorganismos en superficies, la existencia de biopelículas bacterianas, y la contaminación ambiental en diversas zonas de una nave helicícola.

I. Materiales

- Escobillones estériles, en tubo de polipropileno. Deltalab®.
- Medios de cultivo en placas Petri para el crecimiento y aislamiento de microorganismos:
 - o Agar Mac Conkey (MK). (Ref: 610028, Liofilchem®, Italia).
 - o Agar Tripticasa de Soja (TSA). (Ref: 610052, Liofilchem®, Italia).
 - o Agar dextrosa Saboraud con cloranfenicol (SAB). (Ref: 610103, Liofilchem®, Italia).
 - o Agar Man Rogosa Sharpe (MRS). (Ref: 610.024, Liofilchem®, Italia).
 - o Agar Baird Parker (BP). (Ref: 610004, Liofilchem®, Italia) + Suplemento (Ref: 80122, Liofilchem®, Italia).
- Placas RODAC con medios sólidos para el aislamiento y desarrollo de microorganismos:
 - o Agar Tripticasa de Soja (TSA). (Ref: 610052, Liofilchem®, Italia).
 - o Agar dextrosa Saboraud con cloranfenicol (SAB). (Ref: 610103, Liofilchem®, Italia).
- Estufa de cultivo a $37^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$.
- Estufa de cultivo a $42^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$.
- Estufa de cultivo a $37^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ en condición de microaerofilia (5% CO_2).
- Estufa de cultivo a $28^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

II. Área de estudio

El área de estudio son las salas de reproducción de caracoles. Físicamente estas se encuentran en el interior de una nave ubicada en la provincia de Lleida (Catalunya) y propiedad de la empresa helicícola Cal Jep (Fotografía núm. 3).

Se analizaron cuatro salas:

- 2 salas limpias: sin caracoles.
- 2 salas con caracoles diferenciadas por el tipo de pienso utilizado:
 - o pienso base.
 - o pienso base con adición de un probiótico.



Fotografía 3. Salas de reproducción en nave helicícola empresa Cal Jep. Izquierda nave limpia, y derecha nave en uso con caracoles.

III. Análisis microbiológico

i. Estudio de la presencia de microorganismos en superficies

Se evaluaron microbiológicamente distintas superficies de cada sala de reproducción mediante hisopos estériles y con placas de contacto RODAC (Replicate Organisms Direct Agar Contact).

a. Mediante hisopos estériles

La recolección de las muestras para detectar la presencia de biopelículas se realizó mediante el uso de hisopos estériles, que tras el muestreo fueron transportadas al laboratorio y sembrados en medios de crecimiento.

Las superficies estudiadas incluyen: equipo de aire acondicionado, pared, suelo bajo las jaulas de caracoles, barandillas de jaulas de caracoles, interior caja de engorde y reproducción, exterior caja de engorde y reproducción, ventana de la nave, grifo de la red de agua.

Las analíticas realizadas incluyeron:

- Detección y recuento semicuantitativo de Enterobacteriaceae.
- Detección de *Escherichia coli*.
- Detección y recuento semicuantitativo de bacterias aerobias mesófilas incubadas a $37^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$.
- Detección y recuento semicuantitativo de Bacterias Ácido Lácticas (BAL).
- Detección y recuento semicuantitativo de *Staphylococcus aureus*.
- Detección y recuento semicuantitativo de hongos miceliares.
- Detección y recuento semicuantitativo de levaduras.

Los resultados para el muestreo fueron expresados según el grado de crecimiento en las placas, indicándose de forma semicuantitativa como:

- Ausencia de crecimiento: <10 UFC/placa.
- Recuento bajo: $10 - 100$ UFC/placa.
- Recuento medio: $>10^2 - 10^5$ UFC/placa.
- Recuento alto: $>10^5$ UFC/placa.

b. Método por placa de contacto (placa RODAC)

El medio de cultivo de la placa RODAC, se puso en contacto directo con las distintas superficies de las salas en la nave analizada: suelo, pared, e interior de las cajas de engorde y reproducción.

Las analíticas realizadas para este análisis incluyen:

- Recuento de bacterias aeróbicas mesófilas incubadas a $37^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$.
- Recuento de hongos miceliares.
- Recuento de levaduras.

Los resultados para este muestreo fueron expresados en UFC/placa.

ii. Muestreo ambiental por sedimentación

Se evaluaron los microorganismos presentes en el ambiente de las cuatro salas de reproducción, mediante el método sedimentación o gravimétrico.

Se utilizaron placas de Petri que contenían medios de cultivo y fueron expuestas durante 30 minutos en diversas zonas de las salas de reproducción.

Las analíticas realizadas para este análisis incluyeron:

- Recuento de bacterias aerobias mesófilas incubadas a $37 \pm 2^{\circ}\text{C}$.
- Recuento de hongos miceliares.
- Recuento de levaduras.

Los resultados para este muestreo se expresan como UFC/placa.

4.1.1.2. Análisis microbiológico de agua de red y de pozo

El agua utilizada en el sector helicícola proviene principalmente de dos orígenes:

- Red de agua potable
- Pozos naturales.

Se evaluaron microbiológicamente 8 muestras de agua de red y 10 muestras de agua de pozo provenientes de diversas granjas y naves de reproducción del sector helicícola.

I. Materiales

- Medios sólidos selectivos en placas Petri para el crecimiento y aislamiento bacteriano:
 - o Agar Mac Conkey (MK). (Ref: 610028, Liofilchem ®, Italia).
 - o Agar Tripticasa de Soja (TSA). (Ref: 610052, Liofilchem ®, Italia).
 - o Agar Azida sódica. (Ref: 610003, Liofilchem ®, Italia).
 - o Agar Triptona Sulfito Neomicina (TSN). (Ref: 610074, Liofilchem ®, Italia).
- Jarra de anaerobiosis y sistema Anaerocult A (Ref: 1.13829.0001, Merck ®, Alemania).
- Estufa bacteriológica a $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$.
- Estufa bacteriológica a $37 \pm 2^{\circ}\text{C}$.

II. Análisis microbiológico

Las analíticas realizadas para estas muestras incluyeron el recuento y evaluación de:

- Recuento de bacterias aerobias mesófilas incubadas a $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ y a $37 \pm 2^{\circ}\text{C}$.
- Recuento de Enterobacteriaceae totales.
- Recuento y evaluación de *Escherichia coli*.
- Recuento y evaluación de *Enterococcus faecalis*.
- Recuento y evaluación de *Clostridium perfringens*.

Se sembraron 100 μL de cada muestra en los medios de cultivo específicos para cada grupo de microorganismos evaluados. Las placas se incubaron a las temperaturas específicas a lo largo de 24-48 horas.

Para el recuento y detección de *C. perfringens*, se depositó 1 mL de la muestra en la placa de Petri a la que se añadió el medio de TSN licuado, para poder obtener un crecimiento por inclusión. Las placas fueron incubadas en jarra de anaerobiosis. Todos los recuentos se expresan en UFC/mL.

4.1.1.3. Análisis microbiológico del pienso almacenado

Con el objetivo de conocer la contaminación microbiológica de muestras de piensos de caracoles, se procedió a analizar microbiológicamente distintas formulaciones de piensos que actualmente son utilizadas en granjas helicícolas de Catalunya.

Las analíticas realizadas para estas muestras incorporaron:

- Recuento de bacterias aerobias mesófilas incubadas a $37^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$.
- Recuento de Enterobacteriaceae, que incluyen a Enterobacterias totales (ET) y/o Enterobacterias lactosa positivas (coliformes, COL).
- Evaluación de *Escherichia coli*.
- Recuento de bacterias ácido lácticas (BAL).
- Recuento de anaerobios sulfito reductores (ASR).
- Evaluación de *Clostridium perfringens*, expresado en presencia/ausencia.
- Recuento de hongos miceliares (HM).
- Recuento de hongos levaduriformes (HL).
- Evaluación de *Salmonella* spp.

I. Materiales

- Mechero Bunsen
- Solución de Ringer. (Ref: 06-073, Sharlab ®, España).
- Tubos *ependorf* estériles.
- Balanza analítica. (Mod: APX-203, Denver Instrument ®, EEUU).
- Medios solidos selectivos en placas Petri para el crecimiento y aislamiento de microorganismos:
 - o Agar Mac Conkey (MK). (Ref: 610028, Liofilchem ®, Italia).
 - o Agar Trypticase de Soja (TSA). (Ref: 610052, Liofilchem ®, Italia).
 - o Agar dextrosa Saboraud con cloranfenicol (SAB). (Ref: 610103, Liofilchem ®, Italia).
 - o Agar de Man Rogosa Sharpe (MRS). (Ref: 610024, Liofilchem ®, Italia).

- o Agar Sulfito Polimixina Sulfadiazina (SPS). (Ref: 610148, Liofilchem ®, Italia).
- o Agar Triptona Sulfito Neomicina (TSN). (Ref: 610074, Liofilchem ®, Italia).
- o Agar XLT-4. (Ref: BK156HA, Biokar Diagnostic ®, Francia).
- o Agar Levine EMB (Ref: 01-068, Charlau ®, España).
- Medio líquido para el enriquecimiento y selección de *Salmonella* spp.
 - o Caldo Rappaport Vassiliadis peptona de soja (Ref: BK148HA, Biokar Diagnostic ®, Francia).
- Estufa de cultivo a $37^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$.
- Estufa de cultivo a $28^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$.
- Estufa de cultivo a $42^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$.
- Estufa de cultivo a $37^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ en condición de microaerofilia (5% CO_2).
- Jarra de anaerobiosis y sistema Anaerocult A (Ref: 1.13829.0001, Merck ®, Alemania).

II. Muestras de pienso

Las muestras analizadas fueron piensos recién preparados y mantenidos a temperatura ambiente en las granjas helicólicas.

El número total de muestras fue de 20 con las siguientes formulaciones:

- Pienso (P): pienso base compuesto principalmente por componentes nutricionales, sin adición de aditivos (n = 4).
- Pienso + probiótico (PP): pienso base con adición del probiótico liofilizado (n = 4).
- Pienso + Ajo + Canela (PAC): Pienso base con adición de ajo y canela a concentración 1,5% (p/p) (n = 4).
- Pienso + Ajo + Canela + Probiótico (PACP): Pienso base con adición de ajo, canela y probiótico (n = 4).
- Pienso + Ajo + Canela + Probiótico + Fungicida (PACPF): Pienso base con adición de ajo, canela, probiótico y fungicida (n = 4).

III. Procedimiento

A partir de 25 gramos (grs) de cada muestra, pesadas en balanza analítica y en condiciones de esterilidad, se preparó un banco de diluciones seriadas en tubos *eppendorf* estériles que contenían 900 μL de solución de Ringer. Posteriormente se sembraron 100 μL en las distintas placas de agar con los medios de cultivo. Las placas fueron incubadas según las condiciones óptimas de crecimiento para cada grupo de microorganismo, para el posterior recuento de las unidades formadoras de colonias (UFC), expresado como unidades formadoras de colonias por gramo de muestra (UFC/gr)

4.1.2. Evaluación del estado microbiológico de caracoles provenientes de distintas granjas de engorde

4.1.2.1. Estudio microbiológico de porciones del tracto gastrointestinal de caracoles

Se evaluó la microbiota total de caracoles, asociada a distintas porciones del tracto digestivo de caracoles provenientes de granjas de engorde con y sin problemas sanitarios. Se establecieron los recuentos de los microorganismos presentes, así como la evaluación de microorganismos pertenecientes a grupos representativos de la microbiota presente en los helícidos, y que pueden estar asociados a la manifestación de patologías de etiología bacteriana y/o fúngica.

I. Materiales

- Material de disección estéril (tijeras, pinzas, etc.).
- Mechero Bunsen.
- Tubos *ependorf* estériles.
- Balanza analítica. (Mod: APX-203, Denver Instrument ®, EEUU).
- Medios de cultivo en placas Petri para el desarrollo y aislamiento de microorganismos:
 - o Agar Mac Conkey (MK). (Ref: 610028, Liofilchem ®, Italia).
 - o Agar Tripticasa de Soja (TSA). (Ref: 610052, Liofilchem ®, Italia).
 - o Agar dextrosa Saboraud con cloranfenicol (SAB). (Ref: 610103, Liofilchem ®, Italia).
 - o Agar de Man Rogosa Sharpe (MRS). (Ref: 610.024, Liofilchem ®, Italia).
 - o Agar Sulfito Polimixina Sulfadiazina (SPS). (Ref: 610148, Liofilchem ®, Italia).
 - o Agar Triptona Sulfito Neomicina (TSN). (Ref: 610074, Liofilchem ®, Italia).
 - o Agar XLT-4. (Ref: BK156HA, Biokar Diagnostic ®, Francia).
 - o Agar Levine EMB (Ref: 01-068, Charlau ®, España).

- Medio líquido para el enriquecimiento y selección de *Salmonella* spp.
 - o Caldo Rappaport Vassiliadis peptona de soja (Ref: BK148HA, Biokar Diagnostic ®, Francia).
- Estufa de cultivos a $37 \pm 2^{\circ}\text{C}$.
- Estufa de cultivos a $42 \pm 2^{\circ}\text{C}$.
- Estufa de cultivos a $37 \pm 2^{\circ}\text{C}$ en condición de microaerofilia (5% CO_2).
- Jarra de anaerobiosis y sistema Anaerocult A (Ref: 1.13829.0001, Merck ®, Alemania).

II. Preparación de las muestras de caracoles.

En el estudio se analizaron 20 caracoles en estado adulto, provenientes de granjas ubicadas en Castelfollit y Almacelles (Catalunya) en las que los caracoles se alimentan con piensos, de los cuales:

- 10 caracoles no presentaban problemas sanitarios aparentes (caracoles sanos)
- 10 animales presentaban signos de alteración del estado sanitario: presencia de letargo, pérdida de turgencia y/o olores desagradables (caracoles enfermos).

La disección del animal se inició removiendo la concha en condiciones asépticas mediante el uso de material de disección estéril, y las diversas porciones del tracto digestivo fueron identificadas mediante la descripción aportada por Charrier (1990) y por Charrier y Brune (2003). Para el estudio de la microbiota, la masa visceral se dividió en dos porciones: porción anterior y porción posterior (Figura núm. 3).

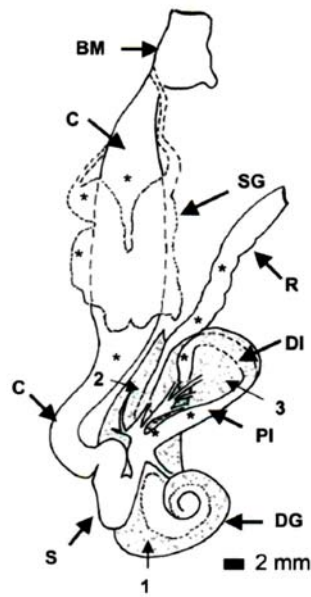


Figura 3. Esquema representativo de la morfo-anatomía del tracto digestivo del caracol. La masa bucal (BM), buche (C), y el estómago (S), junto con las glándulas salivales (SG) constituyen la porción anterior del tracto; el intestino proximal (PI), intestino distal (DI), y el recto (R), junto con la glándula digestiva (DG) forman la porción posterior.

Adaptado de: Charrier y Brune, (2003).

Una vez obtenidas las muestras de los caracoles, se depositaron en tubos *ependorf* estériles, para posteriormente pesar en balanza, macerar y diluir a proporción 1/10 en solución de Ringer estéril.

III. Análisis microbiológico

A partir de la dilución en proporción 1:10 se realizó un banco de diluciones seriadas en tubos *ependorf* estériles que contenían 900 μL de solución de Ringer, y 100 μL de cada dilución fueron sembrados en medios de cultivo con el fin de establecer la microbiota presente en las muestras.

Las analíticas realizadas para estas muestras fueron:

- Recuento de bacterias aerobias mesófilas incubadas a $37 \pm 2^\circ\text{C}$.
- Recuento de Enterobacteriaceae, que incluyen a Enterobacterias totales (ET) y/o Enterobacterias lactosa positivas (coliformes, COL).
- Evaluación de *Escherichia coli*.

- Recuento de bacterias ácido lácticas (BAL).
- Recuento de anaerobios sulfito reductores (ASR).
- Evaluación de *Clostridium perfringens*, expresado en presencia/ausencia.
- Recuento de hongos miceliares (HM).
- Recuento de hongos levaduriformes (HL)
- Evaluación de *Salmonella* spp.

La incubación de las placas se realizó según las condiciones óptimas de crecimiento para cada grupo de microorganismo ($28 \pm 2^\circ\text{C}$, $37 \pm 2^\circ\text{C}$, $42 \pm 2^\circ\text{C}$, en aerobiosis, anaerobiosis, o en microaerofilia con 5% CO_2).

Los recuentos obtenidos se expresan en UFC/gr, mientras que evaluación de microorganismos se aporta como Presencia o Ausencia.

Los datos obtenidos como UFC/gr estadísticamente siguen una distribución asimétrica, por lo que es necesaria una transformación previa a fin de realizar el análisis estadístico. Para ello los datos fueron transformados y expresados en Log_{10} UFC/gr.

Para la creación de gráficas se utilizó el programa computacional *Sigma Plot*®.

4.1.2.2. Análisis microbiológico de heces de caracoles

Se caracterizó la microbiota asociada a las heces de caracoles provenientes de granjas de engorde, para lograr establecer un diagnóstico del estado sanitario de los animales.

I. Materiales

- Mechero Bunsen.
- Solución de Ringer. (Ref: 06-073, Sharlab ®, España).
- Tubos *ependorf* estériles.
- Balanza analítica. (Mod: APX-203, Denver Instrument ®, EEUU).
- Medios solidos selectivos en placas Petri para el crecimiento y aislamiento de microorganismos:
 - o Agar Mac Conkey (MK). (Ref: 610028, Liofilchem ®, Italia).
 - o Agar Tripticasa de Soja (TSA). (Ref: 610052, Liofilchem ®, Italia).
 - o Agar dextrosa Saboraud con cloranfenicol (SAB). (Ref: 610103, Liofilchem ®, Italia).
 - o Agar de Man Rogosa Sharpe (MRS). (Ref: 610.024, Liofilchem ®, Italia).
 - o Agar Sulfito Polimixina Sulfadiazina (SPS). (Ref: 610148, Liofilchem ®, Italia).
 - o Agar Triptona Sulfito Neomicina (TSN). (Ref: 610074, Liofilchem ®, Italia).
 - o Agar XLT-4. (Ref: BK156HA, Biokar Diagnostic ®, Francia).
 - o Agar Levine EMB (Ref: 01-068, Charlau ®, España).
- Medio líquido para el enriquecimiento de *Salmonella* spp.
 - o Caldo Rappaport Vassiliadis peptona de soja (Ref: BK148HA, Biokar Diagnostic ®, Francia).
- Estufa de cultivos a $37 \pm 2^{\circ}\text{C}$.
- Estufa de cultivos a $42 \pm 2^{\circ}\text{C}$.
- Estufa de cultivos a $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$.
- Estufa de cultivos a $37 \pm 2^{\circ}\text{C}$ en condición de microaerofilia (5% CO_2).
- Jarra de anaerobiosis y sistema Anaerocult A (Ref: 1.13829.0001, Merck ®, Alemania).

II. Origen de los caracoles y preparación de las muestras

Se analizaron 89 muestras, recolectadas en frascos estériles, que contenían heces de caracoles provenientes de diversas naves reproducción y granjas de engorde de Catalunya y en los que la alimentación de los animales incluye la administración de piensos para caracoles.

Las muestras fueron divididas en:

- 34 muestras de heces de caracoles provenientes de animales sanos.
- 16 muestras de heces de animales enfermos.
- 39 muestras de heces de animales con algún tratamiento del tipo antibiótico (enrofloxacin) y/o antifúngico (acidificante) incorporado en el pienso.

III. Análisis microbiológico

Para el análisis microbiológico cada muestra de heces fue pesada en balanza analítica para ser resuspendida en una solución estéril de Ringer a dilución 1:10, posteriormente se realizó un banco de diluciones seriadas en tubos *ependorf* estériles que contenían 900 μ L de solución de Ringer. 100 μ L de cada dilución se sembraron en placas de Petri que contenían los medios de cultivo específicos para el desarrollo y aislamiento de los microorganismos evaluados. La incubación de las placas se realizó según las condiciones óptimas de crecimiento para cada grupo de microorganismos ($28 \pm 2^\circ\text{C}$, $37 \pm 2^\circ\text{C}$, $42 \pm 2^\circ\text{C}$, en aerobiosis, anaerobiosis, o en microaerofilia con 5% CO_2).

Las analíticas realizadas para estas muestras incorporaron.

- Recuento de bacterias aerobias mesófilas incubadas a $37 \pm 2^\circ\text{C}$.
- Recuento de Enterobacteriaceae, que incluyen a Enterobacterias totales (ET) y/o Enterobacterias lactosa positivas (coliformes, COL).
- Evaluación de *Escherichia coli*.
- Recuento de bacterias ácido lácticas (BAL).
- Recuento de anaerobios sulfito reductores (ASR).

- Evaluación de *Clostridium perfringens*, expresado como presencia/ausencia.
- Recuento de hongos miceliares (HM).
- Recuento de hongos levaduriformes (HL).
- Evaluación de *Salmonella* spp.

Los recuentos obtenidos se expresan como UFC/gr. La evaluación de microorganismos se aporta como Presencia o Ausencia.

Los datos obtenidos como UFC/gr estadísticamente siguen una distribución asimétrica, por lo que es necesaria una transformación previa a fin de realizar el análisis estadístico. Para ello los datos fueron transformados y expresados en Log_{10} UFC/gr.

Para la creación de gráficas se utilizó el programa computacional *Sigma Plot*®.

4.2. MEJORAR LA PRODUCCIÓN DE LA CEPA PROBIÓTICA DESTINADA A LA APLICACIÓN EN CARACOLES

4.2.1. Evaluar el efecto de modificaciones de parámetros de incubación que permitan incrementar la concentración de la cepa probiótica en el proceso productivo

4.2.1.1. Evaluación de parámetros de incubación y de modificaciones en la composición del medio de cultivo base

En base a revisión bibliográfica previa, se propuso evaluar la óptima concentración de la solución tensioactiva Tween 80 adicionada al medio de cultivo tradicional para el crecimiento de bacterias ácido lácticas capaz de promover un mejor desarrollo de *Lactobacillus plantarum* Ca7, así como las condiciones óptimas de incubación.

Se evaluaron las siguientes condiciones:

- a) Incubación de la cepa en condición de aerobiosis.
 - o Medio de cultivo MRS con ausencia de Tween 80.
 - o Medio de cultivo MRS con presencia de Tween 80 a concentración 0,1% v/v.
- b) Incubación de la cepa en condición de microaerofilia (5%CO₂).
 - o Medio de cultivo MRS con ausencia de Tween 80.
 - o Medio de cultivo MRS con presencia de Tween 80 a concentración 0,1% v/v.
- c) Modificación de la concentración de Tween en el medio de cultivo tradicional.

I. Materiales

- Crecimiento axénico de *Lactobacillus plantarum* Ca7.
- Medio líquido para el crecimiento de BAL.
 - o Caldo Man Rogosa Sharpe (MRS). (Ref: 610025, Liofilchem ®, Italia).
- Medio sólido para el crecimiento de BAL.
 - o Agar MRS. (Ref: 610.024, Liofilchem ®, Italia).
- Tween 80. (Ref: A4743, Applichem ®, Alemania).
- Estufa de cultivos a $37 \pm 2^{\circ}\text{C}$.
- Estufa de cultivos a $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$.
- Estufa de cultivos a $37 \pm 2^{\circ}\text{C}$ en condición de microaerofilia (5% CO_2).
- Tubos *ependorf* estériles.
- Solución de Ringer. (Ref: 06-073, Sharlab ®, España).
- Equipo pH-metro. (Mod: HI 2211, HANNA Instruments ®, España).

II. Procedimiento

A partir de un cultivo axénico de *L. plantarum* Ca7, se procedió a resembrar las colonias desarrolladas en caldo MRS estéril, incubándose por 16 ± 2 horas a $37^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

Desde este crecimiento *overnight*, se traspasaron alícuotas de 500 μL a 2 frascos que contenían 50 mL de caldo MRS con Tween 80 estéril, y a dos frascos que contenían 50 mL de caldo MRS sin adición de Tween 80 a concentración de 0,1% propuesta por el fabricante comercial del medio de cultivo.

Un frasco con Tween 80 y otro sin Tween 80 se incubaron a 37° por 24 horas en condición de microaerofilia (5% CO_2) y los otros dos en condición de aerobiosis, para posteriormente continuar con el análisis microbiológico de las muestras de crecimiento bacteriano. Finalizado el tiempo de incubación se realizó medición del pH al contenido de los frascos.

El ensayo fue realizado en triplicado para determinar la existencia de diferencias significativas entre los resultados obtenidos.

La modificación de la concentración de Tween 80, incluyó evaluar: 0%, 0,25%, 0,5% y 1% v/v en el medio de cultivo tradicional, con incubación en condición de aerobiosis a 37°C.

III. Análisis microbiológico

Una vez obtenidos los crecimientos microbianos en los distintos frascos, se realizó un recuento de UFC/mL.

Se prepararon bancos de diluciones seriadas en tubos *ependorf* con solución de Ringer estéril, procediéndose a sembrar 100 µL de las distintas diluciones en placas Petri que contenían agar MRS, para ser incubados en microaerofilia por espacio de 24-48 horas.

Para la elaboración de gráficas se utilizó el programa computacional *Sigma Plot* ®.

4.2.2. Evaluar modificaciones de parámetros involucrados en el proceso de liofilización que permitan incrementar la concentración de la cepa probiótica en el proceso productivo

4.2.2.1. Evaluar la temperatura de pre-liofilización y su efecto en la concentración de la cepa liofilizada

En el proceso de liofilización es fundamental la etapa inicial de congelación de la muestra, que puede influir directamente en el aspecto y la calidad del producto final. No se ha establecido una regla general para la fase de congelamiento de todos los productos que pueden ser liofilizados, por lo que es imprescindible evaluarlo experimentalmente para cada producto. En la liofilización de bacterias ácido lácticas no existe la definición de este parámetro, y en algunas publicaciones se indican temperaturas de -80°C, -50°C o -20°C (Kasper y Friess, 2011). En este estudio se evaluó la etapa de congelación a -80°C y -20°C (asociado a los equipamientos disponibles en el laboratorio), utilizando como crioprotector celular leche descremada (15%) y sacarosa (5%).

I. Materiales

- Cultivo axénico de *Lactobacillus plantarum* Ca7.
- Caldo de cultivo MRS estéril. (Ref: 610025, Liofilchem®, Italia).
- Placas de agar MRS. (Ref: 610.024, Liofilchem®, Italia).
- Tubos de centrifuga cónico de boca ancha de 175 mL (Nalgene, Thermo Scientific®, EEUU).
- Centrifuga para tubos. (Mod: Digtor 21, RT192, Ortoarlesa®, España).
- Congelador horizontal de -80°C (Mod: Ultra Low MFD393, Sanyo®, Japón).
- Congelador horizontal de -20°C (Mod: FZC636WAP, Zanussi®, Italia).
- Equipo liofilizador. (Mod: Alpha 1-2 LD, Ref: 101021, Fisher Scientific®, España).
- Viales de vidrio transparentes con tapa de goma. Capacidad 4 mL. (Ref: 212FIB16040, Sudelab®, España).

- Estufa de cultivo a $37^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ en condición de microaerofilia (5% CO_2).
- Tubos *ependorf* estériles.
- Solución de Ringer. (Ref: 06-073, Sharlab ®, España).
- Crioprotector: Leche descremada (15%), sacarosa (5%). Esterilizado a 115°C por 13 minutos.

II. Procedimiento

A partir de un cultivo axénico de *Lactobacillus plantarum* Ca7, se inocularon tubos que contenían 5 mL de caldo MRS estéril. Se procedió a la incubación por espacio de 18 ± 2 horas (cultivo *overnight*). Posteriormente los cultivos fueron centrifugados a 3000 rpm durante 10 minutos. Se descartó el sobrenadante y se obtuvo el contenido celular, que fue lavado dos veces con solución de Ringer con un último paso de centrifugación.

El contenido celular lavado se resuspendió en una solución crioprotectora constituida por leche descremada (15% p/v) y sacarosa (5%), y posteriormente 1 mL de este contenido fue traspasado a viales de vidrio estériles. Un lote de cinco viales fue congelado a -20°C y otro lote de cinco viales a -80°C por espacio de 24 ± 2 hrs. Pasado el proceso de congelación se prosiguió con la etapa de liofilización de los viales. El tiempo de secado fue de 24-48 horas.

Se determinó la concentración de microorganismos en los viales antes de la congelación, finalizada la congelación, y al final del proceso de liofilización, determinando las unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL). El procedimiento consistió en rehidratar las muestras incorporando 1 mL de caldo MRS estéril en cada vial, desde el cual se tomó una alícuota de 100 μL para proceder a realizar un banco de diluciones seriadas en tubos *ependorf* estériles que contenían 900 μL de solución de Ringer. 100 μL de cada dilución fue sembrada en placas de agar MRS, las que fueron incubadas por espacio de 24-48 a 37°C en condición de microaerofilia (5% CO_2), para finalmente realizar los recuentos de las unidades formadoras de colonias (UFC) que son expresados como UFC/mL.

Los resultados de UFC/mL fueron transformados a Log_{10} UFC/mL y se aportan en las Tablas correspondientes.

4.2.2.2. Evaluar una condición de estrés para mejorar la estabilidad de la cepa liofilizada en el tiempo

Con el objetivo de lograr una mejor estabilidad a través del tiempo de la concentración de *Lactobacillus plantarum* Ca7 posterior al proceso liofilización, se evaluó la cepa en condición de estrés salino en presencia de NaCl. En la bibliografía (Carvalho *et al.*, 2003; Gouesbet *et al.*, 2001) se indica que esta condición mejora la estabilidad en el tiempo de determinadas cepas de bacterias ácido lácticas liofilizadas.

Asimismo, se verificó si una condición de estrés puede afectar ciertas características de la cepa antes y después del proceso de liofilización. Las características evaluadas han sido:

- a) Capacidad de desarrollo de la cepa y/o acidificación del medio.
- b) Capacidad de inhibición frente a otros microorganismos.

I. Materiales

- Cultivo axénico de *Lactobacillus plantarum* Ca7.
- Cultivos axénicos de: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Bacillus cereus*.
- Caldo de cultivo MRS estéril. (Ref: 610025, Liofilchem®, Italia).
- Placas de agar MRS. (Ref: 610.024, Liofilchem®, Italia).
- NaCl (Ref: 141659.1211, PRS Panreac, España).
- Equipo liofilizador. (Mod: Alpha 1-2 LD, Ref: 101021, Fisher Scientific, España).
- Equipo pH metro. (Mod: HI 2211, HANNA instruments, España)
- Viales de vidrio transparentes con tapa de goma. Capacidad 4 mL. (Ref: 212FIB16040, Sudelab, España).
- Congelador horizontal de -20°C (Mod: FZC636WAP, Zanussi, Italia).
- Estufa de cultivo a 37° ± 2°C.
- Estufa de cultivo a 37° ± 2°C en condición de microaerofilia (5% CO₂).
- Tubos *ependorf* estériles.

- Solución de Ringer. (Ref: 06-073, Sharlab ®, España).
- Crioprotector: Leche descremada (15%), sacarosa (5%). Esterilizado a 115°C por 13 minutos.

II. Evaluación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

Inicialmente se realizó una prueba para determinar la concentración mínima de NaCl (%p/v) que no altera el crecimiento de la cepa. Para esta evaluación se ensayó un gradiente de concentración entre 1% y 10% de NaCl en tubos con MRS que fueron incubados por 24 horas a $37^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ en condición de microaerofilia (5% CO_2) y aerobiosis.

Transcurrido el período de tiempo indicado, se sembró una alícuota de cada concentración en placa de agar MRS que se incubaron en condiciones de microaerofilia (5% CO_2) por espacio de 24 a 48 horas a $37 \pm 2^{\circ}\text{C}$. Posteriormente se realizó el recuento de UFC (expresados en Log_{10} UFC/mL) con el fin de determinar la concentración de NaCl que no altera el crecimiento en comparación con el ensayo control.

III. Verificación de características de la cepa

a. Desarrollo de la cepa y/o capacidad de acidificación del medio

Se evaluó el desarrollo de la cepa en condición de estrés bajo las siguientes condiciones: ausencia de Tween 80 en el medio de cultivo tradicional, e incubación en aerobiosis o en microaerofilia.

Se preparó caldo MRS según las indicaciones del fabricante (MRS normal), caldo MRS sin Tween 80, y caldo MRS con concentración de NaCl (%p/v) añadida, que fueron dispensados en tubos para posterior esterilización.

Posteriormente, y a partir de un cultivo *overnight* de *Lactobacillus plantarum* Ca7 se inocularon 100 µL a cada uno de los tubos mencionados que fueron incubados en las condiciones indicadas por espacio de 24-48 horas.

Finalizada la incubación se midió el pH de los cultivos y se realizaron diluciones seriadas en tubos *eppendorf* para poder establecer el recuento microbiológico (UFC/mL), mediante la siembra en placas de agar MRS. Los resultados obtenidos fueron transformados a Log₁₀ UFC/mL y graficados.

b. Capacidad de inhibición de otros microorganismos

Se evaluó la capacidad inhibitoria del sobrenadante obtenido por filtrado del cultivo de *Lactobacillus plantarum* Ca7 desarrollada en condición de estrés, frente a microorganismos de interés en el ámbito de la alimentación: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Bacillus cereus*.

Tras la incubación de la cepa, el sobrenadante se obtuvo por filtración del cultivo *overnight*, utilizando filtros estériles de celulosa de 0,22 µm.

La capacidad inhibitoria fue evaluada mediante el método de difusión en pocillos (Magaldi *et al.*, 2004; Balouiri *et al.*, 2016), sobre las cepas bacterianas seleccionadas. La técnica consistió en depositar un volumen de 100 µL del sobrenadante en pocillos de 6 mm de diámetro, obtenidos en las placas Petri preparadas con agar tripticasa de soya. Cada placa se sembró previamente por agotamiento en superficie con cada uno de los microorganismos preparados a una concentración del orden de 0,5 de la escala de Mc Farland. Las placas se incubaron en estufa a 37° ± 2°C por espacio de 24 horas y posteriormente se procedió a la lectura de los diámetros de los halos de inhibición.

Los resultados se expresan en función del diámetro del halo de inhibición. El tamaño del pocillo se incluye en el valor de inhibición.

c. Estabilidad de las cepas liofilizadas

Una vez determinada la concentración óptima de NaCl capaz de provocar estrés a *Lactobacillus plantarum* Ca7, se preparó un cultivo de la cepa desarrollada en MRS con adición de NaCl para ser incubado a $37^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por espacio de 18 ± 2 horas (cultivo *overnight*) en condición de aerobiosis, para continuar con el proceso de liofilización y la evaluación de la estabilidad de los preparados durante 60 días. Una parte de los cultivos liofilizados se almacenó a temperatura ambiente y otra en refrigeración a 5°C . Como control se utilizó la cepa no sometida a condición de estrés.

El procedimiento para la liofilización de las muestras consistió en la centrifugación del cultivo a 3000 revoluciones por minuto (rpm) durante 10 minutos, para descartar el sobrenadante y se obtener el contenido celular, que fue lavado dos veces con solución de Ringer estéril con un último paso de centrifugación. El *pellet* obtenido se resuspendió en una solución crioprotectora constituida por leche descremada y sacarosa, y posteriormente 1 mL de este contenido fue traspasado a viales de vidrio estériles, que fueron congelados a -20°C por espacio de 24 ± 2 hrs para proceder con la liofilización, por espacio de 24-48 horas.

Para la evaluación de la estabilidad el procedimiento consistió en rehidratar las muestras incorporando 1 mL de caldo MRS estéril en cada vial, desde el cual se tomó una alícuota de 100 μL para proceder a realizar un banco de diluciones seriadas en tubos *ependorf* estériles que contenían 900 μL de solución de Ringer. 100 μL de cada dilución fueron sembrados en placas de MRS, que fueron incubadas por espacio de 24-48 horas a 37°C en condición de microaerofilia (5% CO_2), para finalmente realizar los recuentos de las unidades formadoras de colonias (UFC) que son expresados como UFC/mL.

Los resultados de concentración obtenidos son expresados como porcentaje de reducción de la estabilidad, según la siguiente fórmula:

$$\% \text{ reducción} = 100 - \left(\frac{\text{concentración obtenida en } t_n \times 100}{\text{Concentración inicial } t_0} \right)$$

4.2.2.3. Evaluar la maltodextrina como alternativa a la leche descremada como crioprotector

Se evaluó la utilización de maltodextrina con sacarosa como crioprotector de base no láctea para *Lactobacillus plantarum* Ca7 en el proceso de liofilización.

Se ensayaron cepas desarrolladas en medio MRS sin Tween 80 y en condición de estrés salino al 6%. Los viales liofilizados fueron almacenados en refrigeración y temperatura ambiente.

I. Materiales

- Cultivo axénico de *L. plantarum* Ca7.
- Caldo de cultivo MRS estéril con adición de 6% de NaCl.
- Caldo de cultivo MRS estéril sin adición de Tween 80.
- Placas de agar MRS. (Ref: 610.024, Liofilchem ®, Italia).
- Equipo liofilizador. (Mod: Alpha 1-2 LD, Fisher Scientific ®, España).
- Viales de vidrio transparentes con tapa de goma. Capacidad 4 mL. (Ref: 212FIB16040, Sudelab ®, España).
- Congelador horizontal de -20°C (Mod: FZC636WAP, Zanussi ®, Italia).
- Estufa de cultivo a 37° ± 2°C.
- Estufa de cultivo a 37° ± 2°C en condición de microaerofilia (5% CO₂).
- Tubos *ependorf* estériles.
- Solución estéril de Ringer. (Ref: 06-073, Sharlab ®, España).
- Crioprotector: Maltodextrina (12%), sacarosa (5%).

II. Procedimiento

A partir de un cultivo *overnight* de *L. plantarum* Ca7, se inocularon 100 µL en tubos con caldo MRS con adición de 6% de NaCl (condición de estrés) y en tubos con caldo MRS sin adición de Tween 80. Los tubos fueron incubados en aerobiosis a 37°±2°C por 24 horas. Posteriormente los tubos fueron

centrifugados para obtener el contenido celular que fue resuspendidos en solución estéril de maltodextrina (12%) con sacarosa (5%).

La suspensión fue traspasada a viales de vidrio estériles a razón de 1 mL por vial, para congelar por 24 horas a -20°C. Finalmente se realizó el proceso de liofilización por espacio de 12-24 horas.

Según el origen del cultivo (presencia de NaCl o ausencia de Tween 80), se separaron en lotes de 25 viales liofilizados que fueron almacenados a temperatura ambiente o en refrigeración (5°C), para evaluar a través del tiempo la concentración de microorganismos viables, expresada en UFC/mL.

Se determinó la concentración de las muestras previa a la congelación, posterior a la congelación, y finalizado al proceso de liofilización, determinando las unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL), según procedimientos descritos anteriormente en el apartado 4.2.2.2 para evaluación de estabilidad de cepas liofilizadas. Los resultados de concentración obtenidos se expresan como porcentaje de reducción de la estabilidad, aplicando la fórmula indicada en este mismo apartado.

4.3. MODIFICAR Y EVALUAR NUEVAS VÍAS DE ADMINISTRACIÓN DEL PROBIÓTICO EN GRANJAS DE CARACOLES

4.3.1. Administración de la cepa probiótica a caracoles mediante la incorporación en el pienso

4.3.1.1. Producción de la biomasa destinada al pienso

A nivel de aplicación del probiótico en granjas, se hace necesario aumentar considerablemente los volúmenes de producción de biomasa probiótica liofilizada, haciendo imprescindible generar un modelo que sea viable y reproducible en el tiempo.

En general los volúmenes de biomasa a producir dependerán de la cantidad de pienso a producir. Habitualmente se necesitan 300 kilos de pienso para alimentar 10 granjas por 1 mes.

Por esta razón el modelo que se propone, está desarrollado para producir una cantidad de biomasa probiótica, que una vez incorporada al pienso, alcance concentraciones óptimas para su administración a los caracoles que oscilan entre 6 Log₁₀ UFC/gr y 9 Log₁₀ UFC/gr.

I. Materiales

- Cultivo axénico de *Lactobacillus plantarum* Ca7.
- 1,8 Litros de caldo de cultivo MRS estéril sin adición de Tween 80.
- Tubos de centrifuga cónico de boca ancha de 175 mL (Nalgene, Thermo Scientific®, EEUU).
- Centrifuga (Mod: Digtor 21 - RT192, Ortoarlesa®, España).

- Crioprotector: Leche descremada (15%), sacarosa (5%). Esterilizado a 115°C por 13 minutos.
- Potes de plástico estériles (Ref: 901164/1, Deltalab ®, España).
- Congelador horizontal de -20°C (Mod: FZC636WAP, Zanussi ®, Italia).
- Equipo liofilizador. (Mod: Alpha 1-2 LD, Fisher Scientific ®, España).
- Mortero de cerámica.
- Tubos *ependorf* estériles.
- Solución de Ringer (Ref: 06-073, Sharlab ®, España).
- Placas de agar MRS. (Ref: 610.024, Liofilchem ®, Italia).
- Estufa de cultivo a 37° ± 2°C en condición de microaerofilia (5% CO₂).

II. Procedimiento

A partir de un cultivo axénico de *Lactobacillus plantarum* Ca7 se inoculó un tubo con 5 mL de caldo MRS estéril, que fue incubado de 18 a 20 horas a 37° ± 2°C. Posteriormente el contenido del tubo fue traspasado a una botella que contenía 1,8 Litros de caldo MRS estéril sin adición de Tween 80. Se procedió a la inoculación en condiciones de aerobiosis por espacio de 24 horas a 37° ± 2°C.

Posterior al desarrollo de la cepa, el cultivo se centrifuga y se descarta el sobrenadante. A cada tubo se adicionaron 150 mL del cultivo que se centrifugaron a 3000 rpm durante 10 minutos. Este paso fue repetido 3 veces hasta centrifugar el contenido total de la botella de MRS.

Seguidamente todo el contenido celular se resuspende y homogeniza en 400 mL de la solución crioprotectora: leche descremada (15%) con sacarosa (5%). Se traspasan 30 mL de esta mezcla a pots de plástico estériles, y se somete al proceso de congelación a -20°C por espacio de 24-48 horas.

Finalizado el tiempo indicado, los pots de plástico se sitúan en el liofilizador por espacio de 72-96 horas, hasta visualizar que el contenido se encuentra completamente liofilizado. Concluido el proceso, el contenido se tritura en mortero en condiciones de esterilidad, hasta reducirlo a polvo homogéneo. El producto final se almacena en nevera a 5°C. Con el fin de establecer la concentración obtenida, se procede al recuento de una alícuota representativa

que se expresa en Log₁₀ UFC/gr y permite calcular la cantidad de biomasa a incorporar al pienso.

Una vez conocida la concentración se calcula el contenido de biomasa a incorporar a 300 kilos de pienso utilizando la siguiente ecuación.

$$\text{Peso (gr) a incorporar} = \frac{\text{Conc. en pienso deseada}}{\text{Conc. biomasa}} \times \text{peso total pienso (gr)}$$

4.3.1.2. Estabilidad a temperatura ambiente de la cepa probiótica liofilizada

Para el estudio de viabilidad a temperatura ambiente de la cepa incorporada, se procedió a evaluar muestras de piensos a las que se incorporó el probiótico y que fueron preparados por una empresa destinada a la elaboración de piensos.

I. Materiales

- Muestras de pienso que incorporan la cepa probiótica *Lactobacillus plantarum* Ca7.
- Caldo de cultivo MRS estéril. (Ref: 610025, Liofilchem ®, Italia).
- Solución estéril de Ringer. (Ref: 06-073, Sharlab ®, España).
- Tubos *ependorf* estériles.
- Placas de agar MRS (Ref: 610.024, Liofilchem ®, Italia).
- Estufa de cultivo a $37^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ en condición de microaerofilia (5% CO_2).

II. Procedimiento

Las muestras de pienso se mantuvieron a temperatura ambiente, y los análisis microbiológicos se realizaron tras finalizada la producción (inicio del proceso), a los 45 días y a los 90 días.

Desde cada muestra se tomó por triplicado una alícuota representativa, para seguidamente realizar la evaluación de concentración de la cepa mediante recuentos microbiológicos (UFC/gr) en placas con agar MRS.

La metodología empleada consistió en pesar 1 gramo (gr) de pienso con probiótico en balanza analítica, que fue resuspendido en solución estéril de Ringer a dilución 1:10. A partir de esta dilución se preparó un banco de diluciones seriadas en tubos *ependorf* estériles que contenían 900 μL de solución de Ringer, para posteriormente sembrar 100 μL en placas de agar MRS e incubadas

por espacio de 24-48 horas a $37^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ en condiciones de microaerofilia (5% CO_2), para el posterior recuento de las unidades formadoras de colonias (UFC), que fueron expresadas por gramo de muestra.

Los resultados obtenidos se expresan como porcentaje de reducción a lo largo del tiempo, aplicando la fórmula indicada en el apartado 4.2.2.2.

4.3.2. Administración de la cepa a caracoles mediante la incorporación en el agua de riego

Con el objetivo de administrar cultivos recientes de *Lactobacillus plantarum* Ca7 a caracoles de granjas de engorde y reproducción, se propuso evaluar la viabilidad de este microorganismo en el agua de riego, cuyo origen puede ser: agua de pozo o agua de red, según la granja.

I. Materiales

- Cultivo axénico de *L. plantarum* Ca7.
- Caldo de cultivo MRS estéril sin adición de Tween 80.
- Placas de agar MRS. (Ref: 610024, Liofilchem ®, Italia).
- Estufa de cultivo a $37^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ en condición de microaerofilia (5% CO_2).
- Tubos *ependorf* estériles.
- Solución de Ringer. (Ref: 06-073, Sharlab ®, España).
- Frascos de vidrio de 250 mL (Shott Duran ®, Alemania).

II. Procedimiento

A partir de un cultivo reciente de *L. plantarum* Ca7 de concentración conocida ($12 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/mL}$), y desarrollada en MRS sin adición de Tween 80 e incubada en condición de aerobiosis, se procedió a diluirla hasta concentración de $9 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/mL}$ en tres matraces que contenían 100 mL de agua de pozo y tres matraces que contenían 100 mL de agua de red (clorada). Todos los matraces se mantuvieron a temperatura ambiente, y se realizaron recuentos de la concentración (UFC/ml) a lo largo de siete horas.

Para realizar los recuentos, se analizaron alícuotas de cada cultivo. Se prepararon bancos de diluciones seriadas en tubos *ependorf* que contenían 900 μL de solución de Ringer estéril. Posteriormente se sembraron 100 μL de las diluciones en placas de agar MRS. Las placas fueron incubadas por espacio

de 24-48 horas en condición de microaerofilia (5% CO₂) a 37° ± 2°C. Las lecturas se expresan como unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL).

Los resultados de concentración obtenidos se expresan como porcentaje de reducción de la estabilidad, según la fórmula indicada en el apartado 4.2.2.2.

4.3.3. Desarrollo de una alternativa de administración del probiótico a través de implementar un sistema de agitación y distribución en agua de riego

4.3.3.1. Estabilidad del cultivo en el sistema de agitación

Una de las alternativas como vías de administración de la cepa probiótica, es a través del agua de riego, obtenida desde un pozo, y utilizada para mantener la hidratación de los caracoles. Por esta razón, se propuso la opción de utilizar un equipo que incorpora un sistema de agitación y temperatura constante y que debe contener un volumen de cultivo reciente por varios días en una granja helicícola. Fue preciso evaluar en laboratorio si esta alternativa era óptima en función de la concentración del probiótico en el equipo y su estabilidad en el tiempo, para su posterior utilización en granjas.

I. Materiales

- Cultivo axénico de *Lactobacillus plantarum* Ca7.
- 10 Litros de caldo de cultivo MRS estéril sin adición de Tween 80.
- Equipo con sistema de agitación y con capacidad de mantener estable la temperatura.

II. Procedimiento

A partir de un cultivo axénico de *L. plantarum* Ca7 se inocularon botellas con caldo MRS sin adición de Tween 80 hasta llegar a un volumen final de 10 litros. Las botellas fueron incubadas en condiciones de aerobiosis por espacio de 24 ± 2 horas a $37^\circ \pm 2^\circ\text{C}$. Posteriormente, el contenido de las botellas fue transferido al equipo de agitación, en el que se reguló la temperatura a $25^\circ \pm 2^\circ\text{C}$ para mantener una condición de temperatura ambiental.

Diariamente, durante 5 días se procedió a obtener 1 litro del cultivo para determinar su viabilidad. Asimismo, para simular lo que se llevará a cabo en las granjas de caracoles, referido a su dilución en el agua de pozo, a partir del volumen del cultivo diario recuperado, se preparó una dilución a proporción 1:1000, para determinar su viabilidad y estabilidad durante 4 horas.

Para la obtención de los recuentos de los cultivos diarios, y aquellos diluidos en agua de pozo, la metodología empleada es la citada en el apartado 4.3.2.

Los resultados de concentración obtenidos se expresan como porcentaje de reducción de la estabilidad, según la fórmula indicada en el apartado 4.2.2.2.

4.3.3.2. Estabilidad del cultivo liofilizado en el sistema de agitación

Se evaluó el empleo de una solución preparada a partir de la biomasa liofilizada de *Lactobacillus plantarum* Ca7 en el sistema de agitación como alternativa de administración a los caracoles a través del agua de riego.

I. Materiales

- Biomasa liofilizada a partir de *L. plantarum* Ca7.
- Solución estéril de Ringer. (Ref: 06-073, Sharlab ®, España).
- Equipo con sistema de agitación y mantención de temperatura.
- Medios de cultivo en placas Petri para el crecimiento y aislamiento de microorganismos:
 - o Agar Mac Conkey (MK). (Ref: 610028, Liofilchem ®, Italia).
 - o Agar Tripticasa de Soja (TSA). (Ref: 610052, Liofilchem ®, Italia).
 - o Agar dextrosa Saboraud con cloranfenicol (SAB). (Ref: 610103, Liofilchem ®, Italia).
 - o Agar Man Rogosa Sharpe (MRS). (Ref: 610024, Liofilchem ®, Italia).
 - o Agar Sulfito Polimixina Sulfadiazina (SPS). (Ref: 610148, Liofilchem ®, Italia).
 - o Agar Triptona Sulfito Neomicina (TSN). (Ref: 610074, Liofilchem ®, Italia).
- Estufa de cultivo a $37^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$.
- Estufa de cultivo a $42^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$.
- Estufa de cultivo a $37^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ en condición de microaerofilia (5% CO_2).

II. Procedimiento

A partir de biomasa liofilizada de la cepa probiótica *L. plantarum* Ca7 obtenida previamente mediante la metodología descrita en el apartado 4.3.1.1, se evaluó a escala de laboratorio su estabilidad en el tiempo, para que posteriormente, y en base a sus resultados obtenidos, sea posible replicar la experimentación en una granja helicícola.

En laboratorio se ensayó la preparación de una dilución en solución de Ringer estéril a proporción 1:10 (1 gramo de biomasa en 9 litros de solución). La suspensión fue mantenida a temperatura ambiente durante cuatro días, y diariamente se evaluó su concentración a través de recuento de unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL). Se ensayó la estabilidad de cultivos liofilizados producidos en base láctea y no láctea, leche descremada y maltodextrina respectivamente.

Una vez determinado el tipo de liófilo que presenta los mejores resultados, se replicó la experimentación *in situ* en una granja helicícola.

Para ello se prepararon 5 litros de la solución en la máquina de agitación a distintas diluciones 1:10, 1:20 y 1:100, utilizando agua de pozo como diluyente con adición de PBS.

En esta experimentación se consideró mezclar 1 litro de la solución de la máquina con 200-300 litros de agua de pozo. Posteriormente, se evaluó la concentración de la máquina (UFC/mL) antes de la mezcla, y la concentración de microorganismos presentes a la salida del aspersor para el riego.

Asimismo, se llevó a cabo el análisis microbiológico de las muestras obtenidas, finalizada la experimentación a los cuatro días. Los grupos de microorganismos evaluados han sido:

- Detección y recuento de Enterobacteriaceae, que incluyen a Enterobacterias totales (ET) y/o Enterobacterias lactosa positivas (coliformes, COL).
- Detección de *Escherichia coli*
- Detección y recuento de bacterias aerobias mesófilas incubadas a $37^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$.
- Recuento de Bacterias Ácido Lácticas (BAL).
- Detección y recuento de hongos miceliares (HM).
- Detección y recuento de hongos levaduriformes (HL).
- Detección y recuento de anaerobios sulfito reductores (ASR).
- Detección y recuento de *Clostridium perfringens*.

Se sembraron 100 μ L de cada muestra en los medios de cultivo específicos para cada grupo de microorganismos evaluados. Las placas se incubaron a las temperaturas específicas a lo largo de 24-48 horas.

Para el recuento y detección de *Clostridium perfringens*, se depositó 1 mL de la muestra en una placa de Petri a la que se añadió el medio de TSN licuado, para poder obtener un crecimiento por inclusión. Las placas fueron incubadas en jarra de anaerobiosis por espacio de 48 ± 2 horas. Todos los recuentos se expresan en UFC/mL.

4.4. EVALUAR ALTERNATIVAS PARA EL CONTROL DE CONTAMINACIÓN MICROBIOLÓGICA

4.4.1. Evaluar aplicaciones de la cepa probiótica para el control de contaminación microbiológica

4.4.1.1. Utilización del sobrenadante de cultivos como posible control de microorganismos

4.4.1.1.1. Capacidad inhibitoria del sobrenadante procedente del cultivo

Se evaluó la capacidad inhibitoria del sobrenadante obtenido por filtrado y del sobrenadante concentrado por liofilización desde el cultivo de *Lactobacillus plantarum* Ca7, frente a microorganismos de potencial patógeno en el ámbito veterinario.

I. Materiales

- Crecimiento axénico de *L. plantarum* Ca7.
- Escala Mc Farland (Ref: 70900, Biomerieux, Francia).
- Caldo MRS. (Ref: 610025, Liofilchem ®, Italia).
- Agar MRS. (Ref: 610024, Liofilchem ®, Italia).
- Agar Tripticasa de soja. (Ref: 610052, Liofilchem ®, Italia).
- Equipo liofilizador. (Mod: Alpha 1-2 LD, Fisher Scientific ®, España).
- Viales de vidrio transparentes con tapa de goma. Capacidad 4 mL. (Ref: 212FIB16040, Sudelab ®, España).
- Filtros para jeringas de 25 mm estériles con tamaño de poro de 0,22 µm (Ref: JPES022025K, Filter-Lab ®, España).
- Congelador horizontal de -20°C (Mod: FZC636WAP, Zanussi ®, Italia).

- Estufa de cultivos a $37 \pm 2^{\circ}\text{C}$.
- Estufa de cultivos a $37 \pm 2^{\circ}\text{C}$ en condición de microaerofilia (5% CO_2).
- Tubos *ependorf* estériles.
- Solución de Ringer (Ref: 06-073, Sharlab ®, España).

II. Procedimiento

A partir de una placa de agar MRS con crecimiento axénico de la cepa probiótica, se traspasaron colonias a tubos con 5 mL de caldo MRS estéril, para ser incubados por 18-24 horas a 37°C en condición de aerobiosis. Tras la incubación de la cepa, el sobrenadante se obtuvo por filtración del cultivo *overnight*, utilizando filtros estériles de celulosa de $0,22\ \mu\text{m}$.

La capacidad inhibitoria del sobrenadante fue evaluada condición de:

- Sobrenadante obtenido por filtrado.
- Sobrenadante obtenido por filtrado y posteriormente concentrado por liofilización.

Para tal fin, 1 mL del sobrenadante fue depositado en viales estériles que fueron congelados a -20°C para posteriormente liofilizar durante 48 horas. Posterior a la liofilización, para obtener distintas concentraciones del sobrenadante, los viales fueron reconstituidos a distintos volúmenes de caldo MRS estéril, 100 μL (10X) y 500 (5X).

La capacidad inhibitoria fue evaluada mediante el método de difusión en pocillos (Magaldi *et al.*, 2004; Balouiri *et al.*, 2016), sobre cepas bacterianas con importancia patógena, tales como *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. y *Bacillus cereus*. Todas las cepas son parte de la colección de microorganismos del Laboratorio de Microbiología Ambiental y Aplicada de la Universidad Autónoma de Barcelona.

La técnica consistió en depositar un volumen de 100 μL del sobrenadante obtenido posterior al filtrado y del sobrenadante concentrado en pocillos de 6 mm de diámetro, obtenidos en las placas Petri preparadas con agar tripticasa de soya. Cada placa se sembró previamente por agotamiento en superficie con

cada uno de los microorganismos preparados a una concentración del orden de 0,5 de la escala de Mc Farland. Las placas se incubaron en estufa a $37^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por espacio de 24 horas, y posteriormente se procedió a la lectura de los diámetros de los halos de inhibición.

Los resultados se expresan en función del diámetro del halo de inhibición. El tamaño del pocillo se incluye en el valor de inhibición.

4.4.1.1.2. Evaluar incorporar el sobrenadante al proceso de liofilizado de la cepa probiótica como adyuvante al control de microorganismos patógenos en el pienso

Las bacterias ácido lácticas son capaces de producir y acumular una amplia variedad de metabolitos (Silva *et al.*, 1987; Stanton *et al.*, 2005; Olivares *et al.*, 2006), y se concentran principalmente en el sobrenadante, en medios de cultivo líquidos. Estos metabolitos pueden poseer diversas propiedades antagónicas sobre el crecimiento de otros microorganismos. Por esta razón, utilizar esta fracción del metabolismo bacteriano añadida a la cepa liofilizada puede otorgar un importante valor biotecnológico.

En este sentido se ha evaluado la proporción de sobrenadante útil a añadir junto con el crioprotector y que no altere significativamente la concentración del microorganismo liofilizado, así como el efecto inhibitorio por parte del producto final (cepa – crioprotector - sobrenadante) frente a microorganismos que pueden generar problemas de contaminación en piensos.

I. Materiales

- Cultivo axénico de *Lactobacillus plantarum* Ca7.
- Caldo de cultivo MRS estéril sin adición de Tween 80.
- Placas de agar MRS. (Ref: 610.024, Liofilchem ®, Italia).
- Equipo liofilizador. (Mod: Alpha 1-2 LD, Fisher Scientific ®, España).

- Viales de vidrio transparentes con tapa de goma. Capacidad 4 mL. (Ref: 212FIB16040, Sudelab ®, España).
- Congelador horizontal de -20°C (Mod: FZC636WAP, Zanussi ®, Italia).
- Estufa de cultivo a 37° ± 2°C.
- Estufa de cultivo a 37° ± 2°C en condición de microaerofilia (5% CO₂).
- Tubos *ependorf* estériles.
- Solución de Ringer. (Ref: 06-073, Sharlab ®, España).
- Crioprotector: Leche descremada (15% p/v), sacarosa (5% p/v).

II. Procedimiento

A partir de un cultivo *overnight* de *Lactobacillus plantarum* Ca7, se inocularon 100 µL en tubos con caldo MRS con ausencia de Tween 80. Los tubos fueron incubados en aerobiosis a 37 ± 2°C por 24 horas. Posteriormente los tubos fueron centrifugados para obtener la fracción celular y el sobrenadante.

El contenido celular del cultivo fue resuspendidos en la solución crioprotectora, leche descremada (15%) con sacarosa (5%), y se traspasaron a los viales las siguientes fracciones de crioprotector y cepa (C), más la fracción de sobrenadante (S):

- 1:1 (1C : 1S)
- 1:2 (1C : 2S)
- 1:3 (1C : 3S)
- 2:1 (2C : 1S)
- 3:1 (3C : 1S)

Los volúmenes a dispensar fueron calculados para un volumen final de 1 mL como contenido en los viales de vidrio. Las muestras fueron congeladas por espacio de 24 horas a -20°C, para continuar con el proceso de liofilización durante 12 a 24 horas.

Los cultivos liofilizados obtenidos fueron almacenados en refrigeración a 5°C, y se evaluó a través del tiempo durante 45 días la concentración de microorganismos contenida en los viales.

Se determinó la concentración de las muestras posterior al proceso de liofilización, determinando las unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL), según procedimiento descrito anteriormente en el apartado 4.2.2.2. Las muestras fueron rehidratadas con 1 mL de caldo MRS estéril para los recuentos.

Los resultados de concentración obtenidos se expresan como porcentaje de reducción de la estabilidad, en relación al valor inicial de UFC/mL obtenido, según la fórmula indicada en el apartado 4.2.2.2.

Finalmente se evaluó la capacidad inhibitoria mediante el método de difusión en pocillos (Magaldi *et al.*, 2004; Balouiri *et al.*, 2016) de las distintas preparaciones del cultivo liofilizado de *Lactobacillus plantarum* Ca7 que incorporan fracciones del sobrenadante de la cepa probiótica sobre una cepa de *Escherichia coli*.

La técnica consistió en depositar un volumen de 100 µL de cada una de las fracciones de las preparaciones de los cultivos liofilizados al interior de pocillos de 6 mm de diámetro, obtenidos en las placas Petri preparadas con agar tripticasa de soya. Las placas se sembraron previamente por agotamiento en superficie con una cepa de *Escherichia coli* preparada a una concentración del orden de 0,5 de la escala de Mc Farland. Las placas se incubaron en estufa a $37^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por espacio de 24 horas para proceder a las lecturas de los diámetros de los halos de inhibición.

Los resultados se expresan en función del diámetro del halo de inhibición. El tamaño del pocillo se incluye en el valor de inhibición.

4.4.1.2. Capacidad de formación de biopelículas

Se evaluó la capacidad de adhesión de *Lactobacillus plantarum* Ca7 y cepas de microorganismos de la Familia Enterobacteriaceae como *Escherichia coli* y *Citrobacter kasseri* aisladas desde muestras de caracoles, evaluando la formación de biopelículas mediante el método de adhesión en placas de microtitulación.

I. Materiales

- Cultivo axénico de:
 - o *L. plantarum* Ca7.
 - o cepas de *E. coli* y *C. kasseri*.
 - o cepa de *Staphylococcus aureus*
- Placas de microtitulación de 96 pocillos con fondo plano (Ref: 900011, Deltalab ®, España).
- Caldo de cultivo MRS estéril. (Ref: 610025, Liofilchem ®, Italia)
- Caldo de cultivo Trypticase de soja (TSB) estéril. (Ref: 610052, Liofilchem ®, Italia).
- Caldo de cultivo Infusión cerebro corazón (BHI) estéril. (Ref: Cat.1400.00, Conda ®, España).
- NaCl (Ref: 141659.1211, PRS Panreac ®, España).
- Glucosa (Ref: GL01250500, Scharlau ®, España).
- Escala Mc Farland (Ref: 70900, Biomerieux ®, Francia).
- Solución de PBS (Ref: A9202.0010, Applichem ®, Italia).
- Espectrofotómetro. Lector ELISA (Mod: Type 351, Labsystems ®, India)
- Estufa de cultivo a $37^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$.
- Solución de cristal violeta al 0,1%.

II. Procedimiento. Ensayo de formación de biopelículas

El procedimiento consistió inicialmente en evaluar el crecimiento microbiano en pocillos de placas de microtitulación, para posteriormente determinar el grado de adhesión y formación de una biopelícula en este soporte.

Para obtener el crecimiento adecuado de las cepas: *Lactobacillus plantarum* Ca 7 (1 cepa), *Escherichia coli* (2 cepas), y *Citrobacter kasseri* (1 cepa), se siguió la siguiente metodología:

A partir de cultivos *overnight* de las cepas a ensayar, estas se ajustaron a concentración 0,5 Mc Farland. En el caso de *L. plantarum* Ca7, un inóculo se resuspendió de caldo MRS, y para las dos cepas de *E. coli* y la de *C. kasseri* se resuspendió en caldo TSB y BHI. Como control positivo se utilizó una cepa de *Staphylococcus aureus*, microorganismo definido como buen formador de biopelículas (González, 2013).

Posteriormente y por triplicado se inocularon 200 µL en cada pocillo de la placa de microtitulación. Tras tapar la placa, se incubó en condición de aerobiosis a 37°C durante 24 horas. Finalizado el período de incubación se midió la densidad óptica (DO) en espectrofotómetro (Lector ELISA) a 492 nanómetros (nm), con el fin de establecer el crecimiento microbiano obtenido.

Para evaluar la presencia de biopelículas se procedió según las metodologías descritas por Christensen *et al.*, (1982) y por Stepanović *et al.*, (2007). Para ello, una vez obtenido el crecimiento a las 24 horas, se eliminó el contenido de los pocillos y se realizaron tres lavados con 200 µL de *buffer* fosfato salino (PBS). En el último lavado se invirtió la placa de microtitulación en papel absorbente. La biopelícula se fijó mediante aire caliente (60°C) por espacio de 60 minutos.

Posteriormente se procedió a la tinción del biofilm, añadiendo 200 µL de cristal violeta (0,1%). La tinción se mantuvo 15 minutos. Posteriormente, se eliminó el exceso del colorante mediante 3 o 4 lavados con PBS. Al final de los lavados se eliminó exceso de *buffer* volteando la placa en papel absorbente. Seguidamente se añadió suavemente 200 µL de etanol (95%) para solubilizar el

cristal violeta adherido al biofilm. Finalmente se procedió a la lectura en el espectrofotómetro a 492 nm.

Para la interpretación de los resultados del crecimiento microbiano y formación de biopelícula se confeccionaron tablas y gráficos.

4.4.1.3. Capacidad de disrupción y/o inhibición de formación de biopelículas

A partir del sobrenadante obtenido por filtrado, y sobrenadante concentrado por liofilización, de *Lactobacillus plantarum* Ca7 se evaluó su capacidad de:

- a) Inhibir la formación de una biopelícula por el microorganismo *Staphylococcus aureus*.
- b) Destruir la biopelícula madura formada por el microorganismo *Staphylococcus aureus*.

I. Materiales

- Cultivo axénico de:
 - o *L. plantarum* Ca7.
 - o cepa de *S. aureus*.
- Placas de microtitulación de 96 pocillos con fondo plano. (Ref: 900011, Deltalab ®, España).
- Caldo de cultivo MRS estéril. (Ref: 610025, Liofilchem ®, Italia).
- Caldo de cultivo Trypticase de soja (TSB) estéril. (Ref: 610052, Liofilchem ®, Italia).
- Sobrenadante liofilizado.
- Glucosa (Ref: GL01250500, Scharlau ®, España).
- Escala Mc Farland (Ref: 70900, Biomerieux ®, Francia).
- Solución de PBS (Ref: A9202.0010, Applichem ®, Italia).
- Lector ELISA. (Labsystems Multiscan RC, Thermo ®, Finlandia).
- Estufa de cultivo a $37 \pm 2^{\circ}\text{C}$.
- Solución de cristal violeta al 0,1%.

II. Procedimiento. Ensayo inhibición

Este ensayo consistió en poner en contacto directo el sobrenadante de *Lactobacillus plantarum* Ca7 a concentraciones 1X, 5X, y 10X, con el inóculo de la cepa de *Staphylococcus aureus*, para posteriormente incubar a 37°C. Las distintas concentraciones del sobrenadante son obtenidas a partir de cultivos liofilizados preparados con anterioridad.

La metodología utilizada tras la incubación, y que permite la visualización de la biopelícula formada en la placa de microtitulación, es similar a la descrita en el apartado 4.4.1.2.

III. Procedimiento. Ensayo de destrucción o disrupción

Este ensayo consistió en poner en contacto directo el sobrenadante de *Lactobacillus plantarum* Ca7 a concentraciones 1X, 5X, y 10X con una biopelícula ya formada por la cepa de *S. aureus*, durante 24 horas a temperatura ambiente. Para la formación previa de la biopelícula, se utilizó la metodología descrita en el apartado 4.4.1.2, y las distintas concentraciones del sobrenadante fueron obtenidas a partir de cultivos liofilizados preparados con anterioridad.

La metodología a utilizar posterior a la interacción sobrenadante / biopelícula, y que permite la visualización de la biopelícula formada en la placa de microtitulación, es similar al ya presentado en el apartado 4.4.1.2.

4.4.2. Efecto de antifúngicos y acidificantes como control de contaminación microbiológica en piensos

4.4.2.1. Evaluar concentraciones óptimas de antifúngicos y acidificantes para su aplicación en piensos de caracoles

Con el objetivo de evaluar las concentraciones óptimas en el uso de acidificantes y/o antifúngico que faciliten el control de la presencia de microorganismos contaminantes en el pienso, y que a la vez no ejerza un efecto negativo sobre la cepa probiótica *Lactobacillus plantarum* Ca7 que se incorpora, se desarrolló en laboratorio un ensayo de dosis-respuesta por aplicación de dos acidificantes y un fungicida. Los compuestos de cada uno son detallados a continuación:

I. Materiales

- Acidificante 1: APSACID ®. Es una pre-mezcla aditiva conservante compuesta principalmente de ácido láctico, formiato amónico, ácido ortofosfórico, butirato sódico, glutamato monosódico y excipiente natural, la concentración de uso en pienso es de 0,1 – 0,2%.
- Acidificante 2: FORTACID ®. Es una pre-mezcla aditiva conservante compuesta por ácido láctico, ácido cítrico, ácido ortofosfórico y excipientes. La concentración de utilización en pienso es de 0,3%.
- Antifúngico: BIOBAC ®. Pre-mezcla aditiva conservante, compuesta por propionato amónico y ácido propiónico excipientado en aceites esenciales de Lauráceas. El empleo en piensos es al 0,1%.
- Estufa de cultivo a $37^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$.
- Estufa de cultivo a $37^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ en condición de microaerofilia (5% CO_2).
- Estufa de cultivo a $28^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

II. Procedimiento

El ensayo consistió en evaluar el efecto antimicrobiano o antifúngico de seis preparaciones distintas (experimentos) que contenían acidificantes, o mezclas de acidificantes y antifúngico sobre microorganismos inoculados en el pienso para caracoles.

Preparaciones:

- Experimento 1: Compuesto por pienso + Acidificante 1.
- Experimento 2: Compuesto por Pienso + Acidificante 2.
- Experimento 3: Compuesto por Pienso + Antifúngico.
- Experimento 4: Compuesto por Pienso + Acidificante 1 + Antifúngico.
- Experimento 5: Compuesto por Pienso + Acidificante 2 + Antifúngico.
- Experimento 6: Compuesto por Pienso + Acidificante 1 + Acidificante 2 + Antifúngico.
- Control negativo: Compuesto sólo por Pienso.
- Control positivo: Compuesto por Pienso + microorganismos.

Inicialmente se preparó un inóculo que contenía microorganismos previamente aislados de piensos destinados a la alimentación de caracoles. Previo a la inoculación, los piensos fueron higienizados por tratamiento con radiación ultravioleta por espacio de 1 hora.

El inóculo bacteriano consistió en una mezcla de microorganismos de la Familia Enterobacteriaceae aislada desde pienso contaminado. La turbidez del inóculo se ajustó al valor de turbidez 0,5 Mac Farland. En el caso del inóculo fúngico se preparó a partir de cultivos de *Aspergillus niger* y *Fusarium* spp. ajustados a la misma escala de turbidez.

Se pesaron 40 gramos de pienso, y se adicionaron 100 µL de la preparación de los microorganismos. Esta mezcla se mantuvo durante 24 horas a temperatura ambiente para permitir la colonización de los microorganismos.

Transcurridas 24 horas de la inoculación, se realizó un análisis microbiológico para confirmar la colonización de los microorganismos,

posteriormente se adicionó el o los acidificantes y el fungicida, siguiendo las preparaciones anteriormente señaladas.

También se evaluó el efecto de las distintas preparaciones a las 24 y 48 horas, realizando recuentos microbiológicos expresados en unidades formadoras de colonias por gramo de pienso (UFC/gr) para los grupos de: *Enterobacteriaceae*, coliformes y hongos miceliares.

III. Análisis microbiológico

Las analíticas realizadas para las distintas preparaciones de piensos incluyeron el recuento y evaluación de:

- Recuento de *Enterobacteriaceae*, que incluyen a Enterobacterias totales (ET) y/o Enterobacterias lactosa positivas (coliformes, COL).
- Recuento de hongos miceliares (HM).
- Recuento de hongos levaduriformes (HL).

a. Recuento de microorganismos

A partir de cada muestra de pienso se pesaron 10 gramos en balanza analítica, que fueron resuspendidos en solución estéril de Ringer a dilución 1:10. A partir de esta dilución se preparó un banco de diluciones seriadas en tubos *eppendorf* estériles que contenían 900 µL de solución de Ringer, para posteriormente sembrar 100 µL en las distintas placas de agar con los medios de crecimiento. Finalmente, estas fueron incubadas según las condiciones óptimas de crecimiento para cada grupo de microorganismo, para el posterior recuento de las unidades formadoras de colonias (UFC), que fueron expresadas por gramo de muestra (UFC/gr).

b. Evaluación de capacidad inhibitoria

Mediante el método de difusión en pocillos (Magaldi *et al.*, 2004; Balouiri *et al.*, 2016) se evaluó la capacidad inhibitoria de las distintas preparaciones sobre *Lactobacillus plantarum* Ca7.

La técnica consistió en depositar porciones de las preparaciones en pocillos de 6 mm de diámetro, obtenidos de las placas Petri preparadas con agar MRS. Las placas se sembraron previamente por agotamiento en superficie con un cultivo axénico de la cepa Ca7 a una concentración del orden de 0,5 de la escala de Mc Farland. Las placas se incubaron en estufa a $37^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por espacio de 24 horas y posteriormente se procedió a la lectura de los diámetros de los halos de inhibición

Los resultados se expresan en función del diámetro del halo de inhibición. El tamaño del pocillo se incluye en el valor de inhibición.

4.5. EFECTO EN CARACOLES DE LA ADMINISTRACIÓN DE *Lactobacillus plantarum* Ca7 A ESCALA DE LABORATORIO

4.5.1. Evaluar en laboratorio el efecto probiótico de distintas preparaciones de pienso sobre el crecimiento de caracoles provenientes de granjas

Se evaluó *in vivo* en laboratorio el efecto producido en el tiempo por la administración de una nueva fórmula de piensos para helícidos, mediante el control y medición de parámetros de crecimiento en caracoles de distintas edades.

I. Materiales

- Mechero Bunsen
- Solución de Ringer. (Ref: 06-073, Sharlab ®, España).
- Tubos *ependorf* estériles.
- Balanza analítica. (Mod: APX-203, Denver Instrument ®, EEUU).
- Medios solidos selectivos en placas Petri para el crecimiento y aislamiento de microorganismos:
 - o Agar Mac Conkey (MK). (Ref: 610028, Liofilchem ®, Italia).
 - o Agar Tripticasa de Soja (TSA). (Ref: 610052, Liofilchem ®, Italia).
 - o Agar dextrosa Saboraud con cloranfenicol (SAB). (Ref: 610103, Liofilchem ®, Italia).
 - o Agar de Man Rogosa Sharpe (MRS). (Ref: 610.024, Liofilchem ®, Italia).
 - o Agar Sulfito Polimixina Sulfadiazina (SPS). (Ref: 610148, Liofilchem ®, Italia).
 - o Agar Triptona Sulfito Neomicina (TSN). (Ref: 610074, Liofilchem ®, Italia).

- o Agar Levine EMB (Ref: 01-068, Charlau ®, España).
- Estufa de cultivo a $37^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$.
- Estufa de cultivo a $28^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$.
- Estufa bacteriológica a $37^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ en condición de microaerofilia (5% CO_2).
- Jarra de anaerobiosis y sistema Anaerocult A (Ref: 1.13829.0001, Merck ®, Alemania).

II. Procedimiento

Se evaluaron **2 grupos** de animales:

- Caracoles de 1 año, que pasaron por proceso de hibernación durante 6 meses.
- Caracoles de 3 meses sin período de hibernación.

Para la alimentación de los animales se propuso evaluar 3 tipos de preparaciones de piensos:

- **Pienso 1:** Fórmula nueva** + acidificante + fungicida + probiótico + ajo + canela
- **Pienso 2:** Fórmula nueva + acidificante + fungicida
- **Pienso 3:** Fórmula antigua + acidificante + fungicida.

Fórmula nueva**: es una nueva formulación del pienso, que varía de la anterior composición principalmente por la incorporación de fibra de alfalfa al 5%.

En el laboratorio los caracoles fueron mantenidos en cajas de plástico, a razón de 12 animales en cada una (Fotografía núm. 4). Los animales diariamente fueron hidratados, alimentados con las distintas preparaciones de piensos y mantenidos a temperatura ambiente con fotoperíodo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad.



Fotografía 4. Caracoles en ensayo de laboratorio.

Diariamente a partir de cada caja se recuperaron las heces (Fotografía núm. 4), que fueron depositadas en pots estériles de plástico para posterior análisis microbiológico. Asimismo, los habitáculos fueron higienizados con alcohol al 70%.

Las analíticas realizadas para estas muestras de heces incluyeron el recuento y evaluación de:

- Recuento de bacterias aerobias mesófilas incubadas a $37^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$.
- Recuento de Enterobacteriaceae, que incluyen a Enterobacterias totales (ET) y/o Enterobacterias lactosa positivas (coliformes, COL).
- Recuento de bacterias ácido lácticas (BAL).
- Recuento de anaerobios sulfito reductores (ASR).
- Evaluación de *Clostridium perfringens*, expresado en presencia/ausencia.
- Recuento de hongos miceliares (HM).
- Recuento de hongos levaduriformes (HL).

El procedimiento de las analíticas y tratamiento de los resultados obtenidos son similares los descritos en el apartado 4.1.2.2.

Así también, se evaluó el crecimiento de los animales a través del tiempo, durante los 40 días de experimentación, midiendo semanalmente con un pie de

rey el diámetro de la concha de cada animal y con balanza analítica el peso (gr) alcanzado por cada grupo de caracoles. Los valores obtenidos se expresan como promedio de cada caja o grupo de caracoles.

Asimismo, se evaluó la mortalidad de caracoles durante el transcurso de la experimentación.

Finalmente se realizaron analíticas al pienso, que incluyeron el recuento y evaluación de:

- Recuento de bacterias aerobias mesófilas incubadas a $37^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$.
- Recuento de Enterobacteriaceae, que incluyen a Enterobacterias totales (ET) y/o Enterobacterias lactosa positivas (coliformes, COL).
- Evaluación de *Escherichia coli*.
- Recuento de Bacterias Ácido Lácticas (BAL).
- Recuento de anaerobios sulfito reductores (ASR).
- Evaluación de *Clostridium perfringens*, expresado en presencia/ ausencia.

El procedimiento de las analíticas para las muestras de piensos, así como el tratamiento de los resultados se resumen en el apartado 4.1.1.3.

5. RESULTADOS

5.1. EVALUAR EL ESTADO SANITARIO DE UNA GRANJA HELICÍCOLA

5.1.1. Análisis microbiológico ambiental de granja helicícola destinada a la reproducción de caracoles

5.1.1.1 Resultados de la evaluación microbiológica de distintas salas de reproducción

I. Resultados del estudio microbiológico a partir de hisopos estériles

Los resultados de evaluación microbiológica de las distintas zonas y superficies estudiadas ponen de manifiesto diferencias notables entre las salas limpias y aquellas que contenían caracoles.

Los resultados obtenidos en los medios de cultivo a partir de las muestras procedentes de las salas limpias y de las salas con caracoles, se resumen en las Tablas núms. 5, 6 y 7, respectivamente.

Podemos destacar que no se observaron diferencias entre los resultados obtenidos en función del tipo de alimentación que reciben los caracoles en la nave.

Tabla 5. Detección de microorganismos a partir de muestras obtenidas mediante hisopos estériles en salas limpias.

	Medios sólidos				
	MK	TSA	MRS	SAB	BP
Aire	-	-	-	-	-
acondicionado	-	-	-	-	-
Pared	-	-	-	-	-
Suelo	-	-	-	-	-
Barandilla jaulas	-	-	-	-	-
Interior caja	-	-	-	-	-
Exterior caja	-	-	-	-	-
Ventana	-	-	-	++	-
Grifo	-	-	-	-	-

+: 10-10² UFC/placa; ++: >10²-10⁵ UFC/placa; +++: >10⁵ UFC/placa.

-: ausencia de crecimiento <10 UFC/placa

MK: agar Mac Conkey; TSA: agar Tripticasa de soja; MRS: agar Man Rogosa Sharpe; SAB: agar dextrosa Saboraud con cloranfenicol; BP: agar Baird Parker.

Tabla 6. Detección de microorganismos a partir de muestras obtenidas mediante hisopos estériles en nave en los que los caracoles reciben pienso sin adición de probiótico, en su alimentación.

	Medios sólidos				
	MK	TSA	MRS	SAB	BP
Aire	-	-	-	-	-
acondicionado	-	-	-	-	-
Pared	-	-	-	-	-
Suelo	+++	+++	+++	+++	+
Barandilla jaulas	-	++	-	+	+
Interior caja	+++	+++	+++	+++	+
Exterior caja	-	-	-	-	-
Ventana	-	+	-	++	-
Grifo	-	+	-	+	-

+: 10-10² UFC/placa; ++: >10²-10⁵ UFC/placa; +++: >10⁵ UFC/placa.

-: ausencia de crecimiento <10 UFC/placa

MK: agar Mac Conkey; TSA: agar Tripticasa de soja; MRS: agar Man Rogosa Sharpe; SAB: agar dextrosa Saboraud con cloranfenicol; BP: agar Baird Parker.

Tabla 7. Presencia de microorganismos en hisopado en salas con caracoles alimentados con pienso base con adición de un probiótico.

	Medios sólidos				
	MK	TSA	MRS	SAB	BP
Aire acondicionado	-	-	+	-	+
Pared	-	-	+	+	-
Suelo	+++	+++	+++	+++	+
Barandilla jaulas	-	+	-	-	+
Interior caja	+++	+++	+++	+++	+
Exterior caja	+	++	+	+	+
Ventana	-	-	-	-	-
Grifo	-	++	-	++	-

+: 10-10² UFC/placa; ++: >10²-10⁵ UFC/placa; +++: >10⁵ UFC/placa.

-: ausencia de crecimiento <10 UFC/placa

MK: agar Mac Conkey; TSA: agar Trypticase de soja; MRS: agar Man Rogosa Sharpe; SAB: agar dextrosa Saboraud con cloranfenicol; BP: agar Baird Parker.

II. Resultados del análisis por utilización de placas de contacto (placa RODAC)

Los resultados correspondientes al análisis de superficie mediante placas de RODAC se resumen en Tabla núm. 8.

Tabla 8. Recuento de microorganismos (UFC/placa) a partir de muestras de superficie mediante placas de RODAC en distintas naves.

Salas	Concentración UFC/placa		
	Aerobios mesófilos	Hongos miceliares	Levaduras
<u>Sala limpia</u>			
Suelo	16	0	8
Pared	0	0	1
Interior caja	1	0	0
<u>Sala probiótico*</u>			
Suelo	>100	0	20
Pared	0	0	0
Interior caja	>100	>100	>100
<u>Sala sin probiótico**</u>			
Suelo	>100	0	>100
Pared	0	1	0
Interior caja	>100	>100	>100

*: sala de reproducción con caracoles alimentados con pienso que incorpora la cepa probiótica.

**.: sala de reproducción con caracoles alimentados con pienso que no incorpora la cepa probiótica.

III. Resultados del muestreo ambiental por sedimentación

Los resultados relativos al estudio ambiental mediante exposición de placas Petri conteniendo medio de cultivo se aportan en la Tabla núm. 9.

Tabla 9. Recuento de microorganismos (UFC/placa) en muestras ambientales en las distintas salas de la nave.

Salas	Concentración UFC/placa		
	Aerobios mesófilos	Hongos miceliares	Levaduras
Sala Limpia 1	4	1	0
Sala Limpia 2	11	2	0
Sala probiótico*	70	3	6
Sala sin probiótico**	89	2	4

*: sala de reproducción con caracoles alimentados con pienso que incorpora la cepa probiótica.

** : sala de reproducción con caracoles alimentados con pienso que no incorpora la cepa probiótica.

5.1.1.2. Resultados del análisis microbiológico de agua de red y pozo

En general podemos indicar que el agua de red no indicó contaminación por presencia de microorganismos, y que el agua de pozo sólo el 10% mostró presencia de microorganismos a concentración 1×10^2 UFC/mL. Los resultados de los análisis de las muestras de agua de red y de pozo, se resumen en la Tabla núm. 10.

Tabla 10. Porcentaje de muestras positivas o negativas, y recuento de UFC/mL de microorganismos presentes en muestras de agua de red y de pozo.

	Agua de red (n = 8)			Agua de pozo (n =10)		
	negativos	positivos	recuento	negativos	positivos	recuento
Aerobios mesófilos 22°C	100%	-	-	90%	10%	1×10^2
Aerobios mesófilos 37°C	100%	-	-	90%	10%	1×10^2
Enterobacteriaceae	100%	-	-	90%	10%	1×10^2
<i>Escherichia coli</i>	100%	-	-	100%	0%	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	100%	-	-	100%	0%	-
<i>Clostridium perfringens</i>	100%	-	-	100%	0%	-

5.1.1.3. Resultados del análisis microbiológico del pienso almacenado

En general los resultados microbiológicos de las distintas formulaciones de piensos almacenados a temperatura ambiente indican presencia de variada microbiota de origen bacteriano y fúngico. Los resultados de los análisis se resumen en la Tabla núm. 11.

Tabla 11. Concentraciones de microorganismos (Log_{10} UFC/gr) presentes en distintos tipos de piensos analizados.

Microorganismos	Concentración de microorganismos (Log_{10} UFC/gr)				
	Tipo de Pienso				
	P (n=4)	PP (n=4)	PAC (n=4)	PACP (n=4)	PACPF (n=4)
ET	4.33	4.29	4.85	4.60	4.68
COL	2.90	3.04	1.00	2.95	4.24
AM	4.84	5.02	5.32	4.83	4.46
BAL	3.96	3.95	3.49	4.23	7.00
HM	3.87	3.88	2.60	3.83	3.51
HL	2.00	3.78	1.00	3.96	3.88
ASR	2.22	2.00	2.00	2.60	1.88
CP	2.00	2.00	0.00	2.30	2.35

ET: enterobacterias totales; COL: coliformes; AM: aerobios mesófilos; BAL: bacterias ácido lácticas; ASR: anaerobios sulfito-reductores; HM: hongos miceliares; HL: hongos levaduriformes; CP: *Clostridium perfringens*.

Piensos: P: pienso base; PP: pienso con probiótico; PAC: con ajo y canela; PACP: ajo, canela y probiótico; PACPF: ajo, canela, probiótico y fungicida.

5.1.2. Evaluación del estado microbiológico de caracoles provenientes de distintas granjas de engorde

5.1.2.1. Resultados del estudio microbiológico de porciones del tracto gastrointestinal de caracoles

I. Resultados de la disección de los caracoles

La disección de los animales sanos y enfermos, visualmente indicó diferencias: los caracoles enfermos generalmente presentaron una inflamación o alta vascularización de la porción anterior del intestino, el hepatopáncreas laxo o necrosado, o bien desprendían olor desagradable (Fotografía núm. 5B y 5C). En el caso de los caracoles sanos no presentaban estas características, ya que el intestino no presentaba inflamación y la coloración era normal en animales sin alteración (Fotografía núm. 5A). Asimismo, siguiendo el esquema del tracto digestivo (Figura núm. 3), fue posible la identificación de órganos y separación de las porciones anterior y posterior (Fotografía núm. 6).



Fotografía 5. Órganos de *Helix aspersa* Müller, obtenida por disección del caracol. A) animal sano; B y C) animal enfermo/muerto.



Fotografía 6. Separación de porciones del tracto digestivo en caracol *Helix aspersa* Müller.

II. Resultados del análisis microbiológico

Los resultados indicaron que existen diferencias significativas en las concentraciones de microorganismos para las porciones del tracto digestivo de caracoles sanos, en los que la porción posterior posee los mayores recuentos. Mientras que en los animales enfermos no existen diferencias significativas.

Estos resultados son resumidos en la Figura núm. 4 y Tabla núm. 12. Para los caracoles enfermos los resultados se resumen en Figura núm. 5 y Tabla núm. 13.

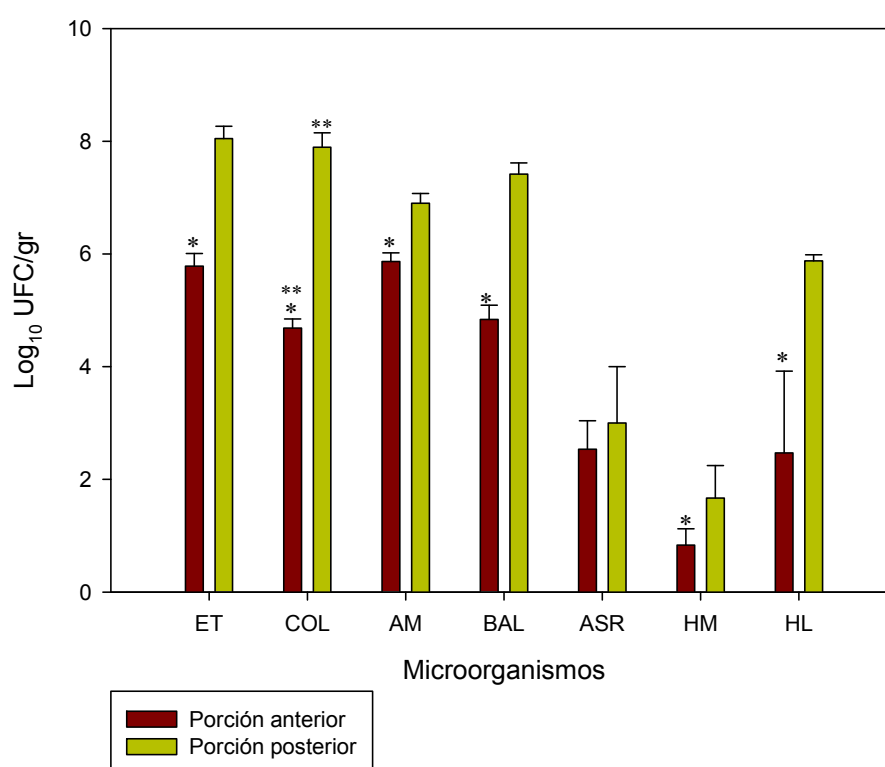


Figura 4. Caracol sano. Concentraciones Log₁₀ UFC/gr de microorganismos presentes en porciones del tracto digestivo. Grupos de microorganismos: ET: enterobacterias totales; COL: coliformes; AM: aerobios mesófilos; BAL: bacterias ácido lácticas; ASR: anaerobios sulfito-reductores; HM: hongos miceliares; HL: hongos levaduriformes.

* $v-p < 0.05$

** : presencia de *E. coli*

Tabla 12. Caracol sano. Valores de concentraciones de microorganismos expresadas en Log₁₀ UFC/gr halladas en porciones del tracto digestivo.

Concentraciones Log ₁₀ UFC/gr					
	Porción anterior		Porción posterior		v-p
	$\bar{X}$	DS	$\bar{X}$	DS	
ET	5.785	0.222	8.049	0.217	0.002902
COL	4.685	0.162	7.893	0.257	0.000203
AM	5.866	0.153	6.900	0.173	0.009636
BAL	4.840	0.251	7.416	0.202	0.005059
ASR	2.534	0.503	3.000	1.000	0.211325
HM	0.833	0.289	1.667	0.577	0.099680
HL	2.468	1.452	5.878	0.107	0.027222

ET: enterobacterias totales; COL: coliformes; AM: aerobios mesófilos; BAL: bacterias ácido lácticas; ASR: anaerobios sulfito-reductores; HM: hongos miceliares; HL: hongos levaduriformes.

$\bar{X}$ = promedio

DS = desviación estándar

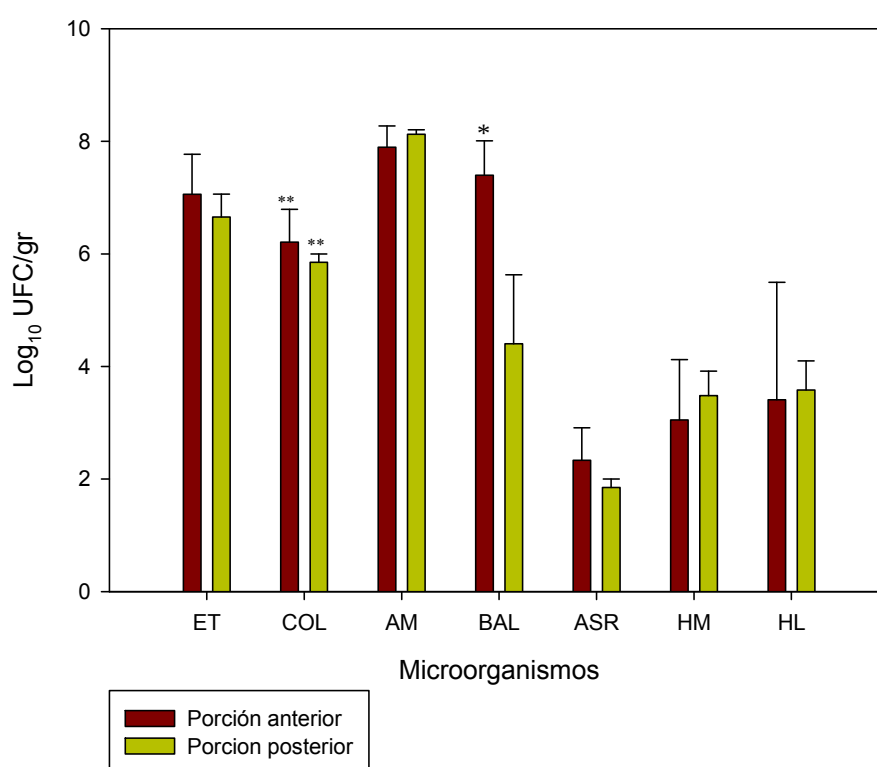


Figura 5. Caracol enfermo. Concentraciones Log₁₀ UFC/gr de microorganismos presentes en porciones del tracto digestivo. Grupos de microorganismos: ET: enterobacterias totales; COL: coliformes; AM: aerobios mesófilos; BAL: bacterias ácido lácticas; ASR: anaerobios sulfito-reductores; HM: hongos miceliares; HL: hongos levaduriformes.

* $v-p < 0.05$

** : presencia de *E. coli*

***: presencia de *Clostridium perfringens*

Tabla 13. Caracoles enfermos. Valores de concentraciones de microorganismos expresadas en Log₁₀ UFC/gr halladas en porciones del tracto digestivo.

Concentraciones Log ₁₀ UFC/gr					
	Porción anterior		Porción posterior		v-p
	$\bar{X}$	DS	$\bar{X}$	DS	
ET	7.062	0.710	6.656	0.409	0.074020
COL	6.208	0.584	5.849	0.151	0.242957
AM	7.896	0.377	8.125	0.081	0.159927
BAL	7.398	0.611	4.404	1.225	0.034895
ASR	2.333	0.577	1.849	0.151	0.180062
HM	3.049	1.074	3.482	0.435	0.324780
HL	3.408	2.086	3.580	0.519	0.454131

ET: enterobacterias totales; COL: coliformes; AM: aerobios mesófilos; BAL: bacterias ácido lácticas; ASR: anaerobios sulfito-reductores; HM: hongos miceliares; HL: hongos levaduriformes.

$\bar{X}$ = promedio

DS = desviación estándar.

5.1.2.2. Resultados del análisis microbiológico de heces de caracoles

Los resultados indicaron que las concentraciones de microorganismos son superiores en aquellos caracoles enfermos o con algún tratamiento, en comparación con las heces de los caracoles sanos. Indicar además que *Escherichia coli* está presente en todos los grupos de caracoles. Los resultados obtenidos de estos análisis se resumen en la Figura núm. 6 y Tabla núm. 14.

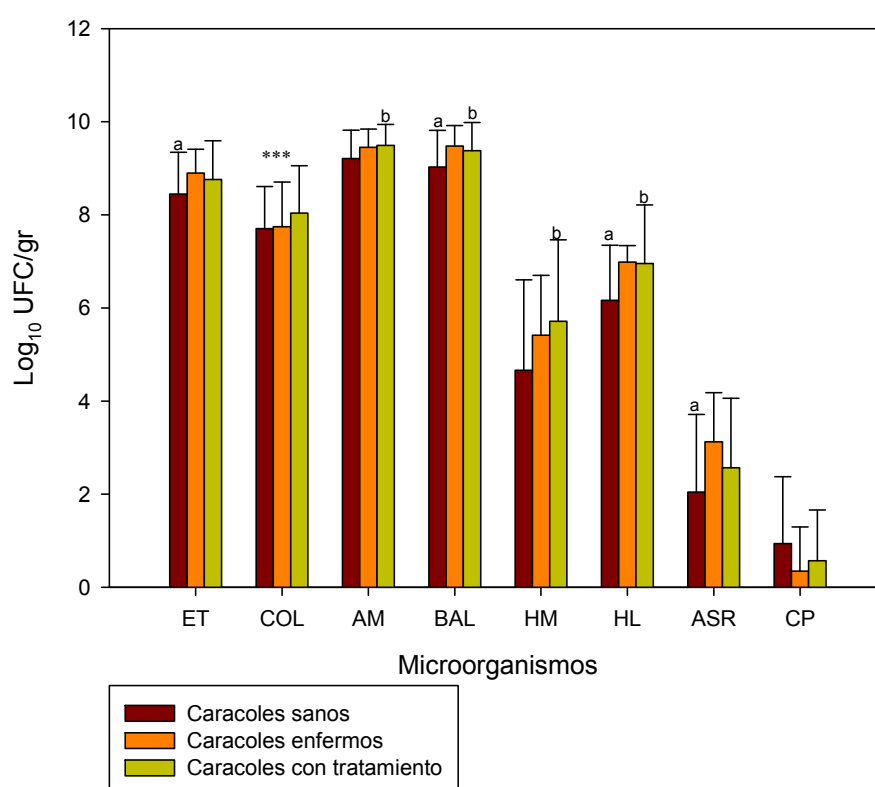


Figura 6. Heces de caracoles. Concentraciones Log₁₀ UFC/gr de microorganismos presentes en los tres grupos de animales analizados. Grupos de microorganismos: ET: enterobacterias totales; COL: coliformes; AM: aerobios mesófilos; BAL: bacterias ácido lácticas; ASR: anaerobios sulfito-reductores; HM: hongos miceliares; HL: hongos levaduriformes.

a = $v-p < 0.05$ entre caracoles sanos y enfermos

b = $v-p < 0.05$ entre caracoles sanos y en tratamiento

***: presencia de *E. coli*.

Tabla 14. Heces de caracoles. Valores de concentraciones de microorganismos expresadas en Log₁₀ UFC/gr presentes en los tres grupos de animales analizados.

	Estado caracol						<i>v-p</i>		
	Sano		Enfermo		Con tratamiento		S-E	S-Trat	En-Trat
	$\bar{X}$	DS	$\bar{X}$	DS	$\bar{X}$	DS			
ET	8.445	0.899	8.894	0.514	8.761	0.828	0.035	0.063	0.276
COL	7.702	0.906	7.744	0.960	8.036	1.018	0.442	0.075	0.165
AM	9.208	0.608	9.450	0.389	9.493	0.449	0.076	0.013	0.369
BAL	9.027	0.788	9.477	0.442	9.376	0.607	0.020	0.028	0.281
HM	4.664	1.940	5.414	1.288	5.713	1.749	0.087	0.012	0.270
HL	6.161	1.183	6.985	0.354	6.954	1.258	0.005	0.004	0.462
ASR	2.043	1.671	3.125	1.055	2.569	1.492	0.012	0.090	0.090
CP	0.939	1.438	0.347	0.949	0.570	1.090	0.074	0.118	0.240

ET: enterobacterias totales; COL: coliformes; AM: aerobios mesófilos; BAL: bacterias ácido lácticas; HM: hongos miceliares; HL: hongos levaduriformes; ASR: anaerobios sulfito-reductores; CP: *C. perfringens*.

$\bar{X}$ = promedio

DS = desviación estándar

S-E = *v-p* entre caracoles sanos y enfermos

S - Trat = *v-p* entre caracoles sanos y con tratamiento

En - Trat = *v-p* entre caracoles enfermos y con tratamiento

5.2. MEJORAR LA PRODUCCIÓN DE LA CEPA PROBIÓTICA DESTINADA A LA APLICACIÓN EN CARACOLES

5.2.1. Evaluar el efecto de modificaciones de parámetros de incubación que permitan incrementar la concentración de la cepa probiótica en el proceso productivo

5.2.1.1. Resultados de la evaluación de parámetros de incubación y de modificaciones en la composición del medio de cultivo base

Los resultados indicaron que la ausencia de Tween 80 en el medio de cultivo MRS produce un incremento del desarrollo de la cepa probiótica *Lactobacillus plantarum* Ca7. Los valores de las concentraciones y del pH son visualizados a continuación en la Figura núm. 7.

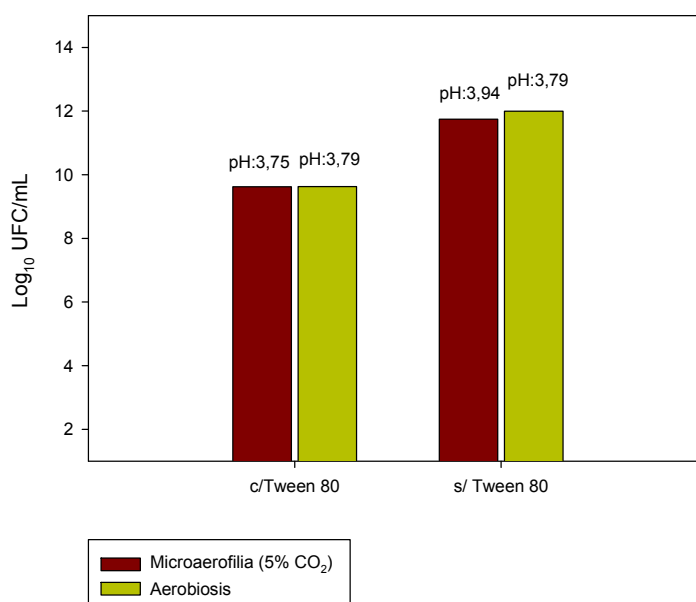


Figura 7. Concentración post-incubación de *Lactobacillus plantarum* Ca7 crecida en medio MRS con y sin adición de Tween 80, e incubada en distintas condiciones.

Los resultados para la evaluación de la modificación de la concentración del Tween 80 en el medio de cultivo MRS, son visualizados en la Figura núm. 8.

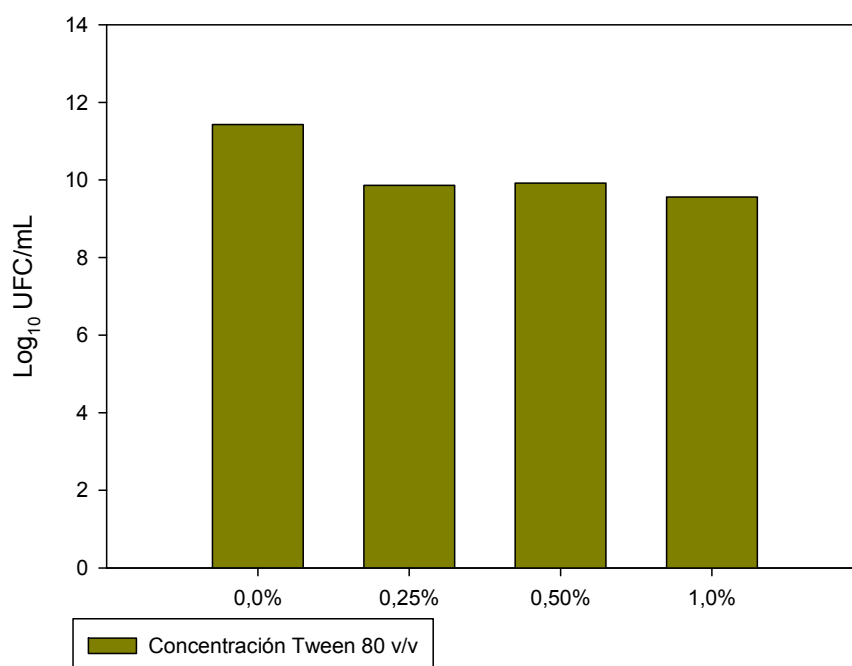


Figura 8. Crecimiento de *Lactobacillus plantarum* Ca7 frente a la presencia de distintas concentraciones de Tween 80.

5.2.2. Evaluar modificaciones de parámetros involucrados en el proceso de liofilización que permitan incrementar la concentración de la cepa probiótica en el proceso productivo

5.2.2.1. Resultados de evaluar la temperatura de pre-liofilización y su efecto en la concentración de la cepa liofilizada

Los resultados obtenidos indican que la diferencia de temperatura de congelación afecta la concentración de los microorganismos previo al proceso de liofilización y finalizado el proceso. Los valores obtenidos son resumidos en la Tabla núm. 15.

Tabla 15. Recuentos obtenidos en viales que contienen la cepa probiótica durante el proceso de congelación y liofilización.

Temperatura	Concentración de la muestra (Log_{10} UFC/mL)		
	Congelada	Liofilizada	% reducción
-20°C	9.688 ± 0.117	9.703 ± 0.097	1%
-80°C	8.895 ± 0.214	8.839 ± 0.178	9%

% reducción: valor en porcentaje de reducción de la muestra final en relación a valor de concentración inicial (9.8 Log_{10} UFC/mL).

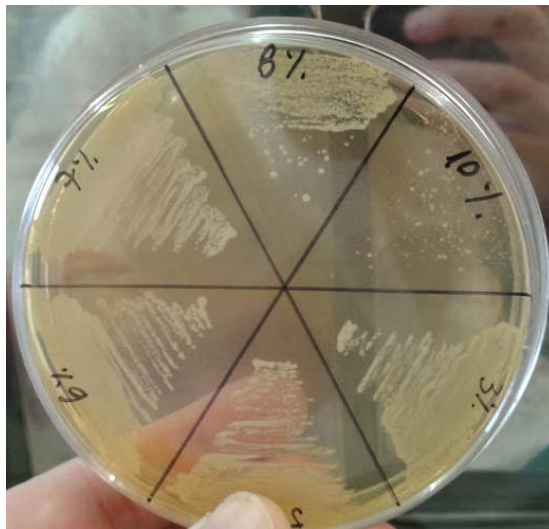
5.2.2.2. Resultados de evaluar una condición de estrés para mejorar la estabilidad de la cepa liofilizada en el tiempo

I. Resultados de la evaluación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

Los resultados de la CMI, indican que sobre 8% de NaCl existe inhibición sobre la cepa probiótica, tal como se visualiza en la Fotografía núm. 7.

Asimismo, los resultados obtenidos de los recuentos de sobrevivencia de la cepa frente a concentraciones de 6% y 7% de NaCl, indican que 6% no afecta

el crecimiento de la cepa. Los valores obtenidos son observados en la Figura núm. 9.



Fotografía 7. Placa Petri de MRS con crecimientos de *Lactobacillus plantarum* Ca7 proveniente del desarrollo del microorganismo a distintas concentraciones de NaCl.

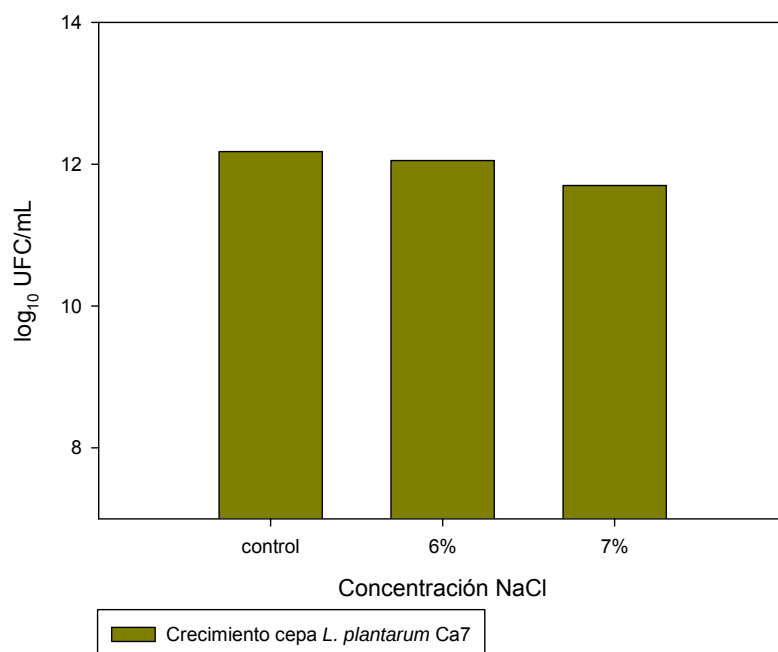


Figura 9. Recuentos Log₁₀ UFC/mL de *L. plantarum* Ca7 crecida en condición de estrés salino.

II. Resultados del crecimiento de la cepa y/o capacidad de acidificación del medio

Los resultados indican que la incubación de la cepa en estrés a distintas condiciones de incubación es similar a la condición control. Asimismo, no hay variación en la acidificación del medio de cultivo. Estos resultados se pueden visualizar en la Figura núm. 10.

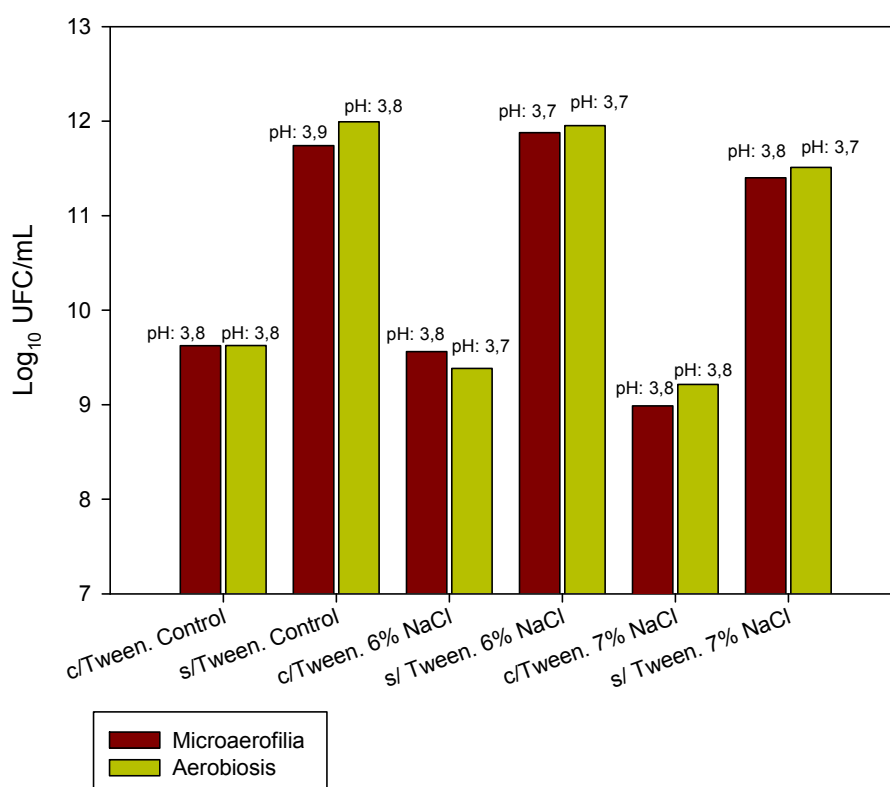


Figura 10. Concentración y valores de pH de cultivos de *Lactobacillus plantarum* Ca7 crecida e incubada en distintas condiciones.

III. Resultados de la capacidad de Inhibición de otros microorganismos

Para este ensayo se observó que la incubación en microaerofilia (5% CO₂) de la cepa en condición de estrés, afecta las propiedades inhibitorias del microorganismo. Los resultados son resumidos en la Tabla núm. 16 y Fotografía núm. 8.

Tabla 16. Resultados de ensayo de interacción en placa, entre el sobrenadante obtenido de la cepa crecida e incubada a distintas condiciones. Valores de diámetro de inhibición en milímetros (mm).

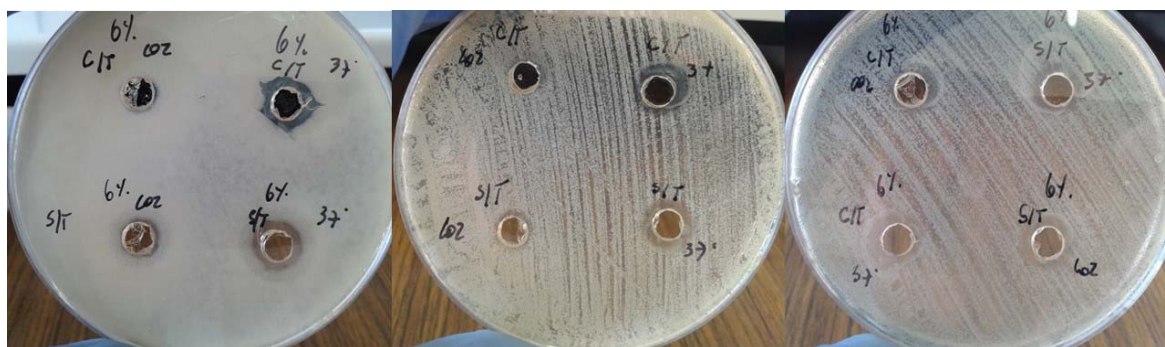
Microorganismo	s/ NaCl				c/ NaCl			
	Aerobiosis		Microaerofilia		Aerobiosis		Microaerofilia	
	c/Twn	s/Twn	c/Twn	s/Twn	c/Twn	s/Twn	c/Twn	s/Twn
<i>Escherichia coli</i>	11	11	11	11	9	9	neg	neg
<i>Staphylococcus aureus</i>	9	9	9	8	8	8	neg	neg
<i>Bacillus cereus</i>	8	10	9	10	9	9	neg	neg

s/ NaCl: sin NaCl en el medio de cultivo.

c/ NaCl: con NaCl en el medio de cultivo

c/Twn: con Tween 80 en el medio de cultivo.

s/Twn: sin Tween 80 en el medio de cultivo.



Fotografía 8. Visualización de efecto inhibitorio de *Lactobacillus plantarum* Ca7 crecida en condición de estrés salino (6% de NaCl).

IV. Resultados de la evaluación de estabilidad en el tiempo de la cepa liofilizada

Podemos indicar que la estabilidad en condición de refrigeración (5°C) permite obtener menores reducciones en la concentración de los cultivos liofilizados preparados en condición de estrés, en comparación con el almacenamiento a temperatura ambiente. Los resultados para la cepa en condición de estrés se pueden visualizar en la Figura núm. 11.

Asimismo, en comparación con cultivos liofilizados preparados sin estrés salino los resultados no indicaron diferencias, como podemos observar en grafica de porcentaje de reducción de la Figura núm. 12.

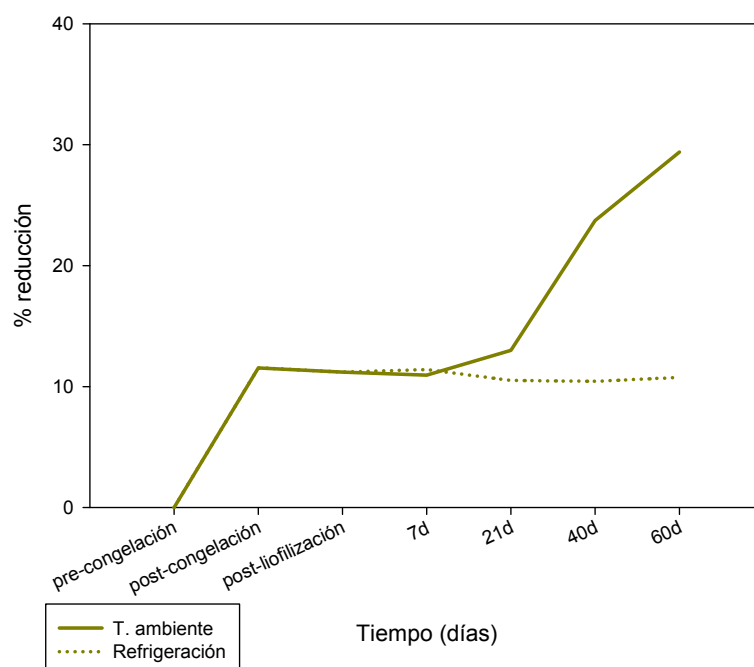


Figura 11. Porcentaje de reducción de estabilidad de *Lactobacillus plantarum* Ca7 crecida en condición de estrés salino y liofilizada.

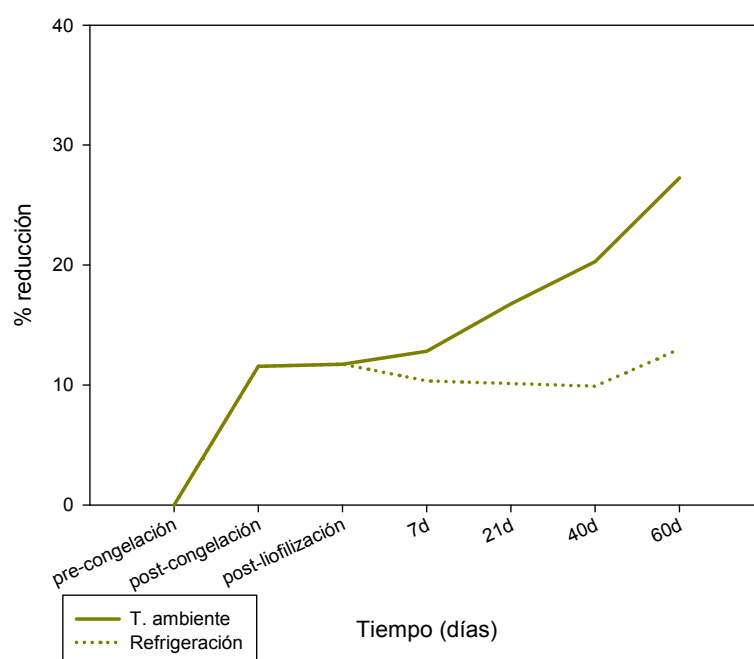


Figura 12. Porcentaje de reducción de estabilidad de *L. plantarum* Ca7 crecida en condición normal y liofilizada.

5.2.2.3. Resultados de la evaluación de la maltodextrina como alternativa a la leche descremada como crioprotector

Los resultados obtenidos indicaron que el tipo de almacenamiento, temperatura ambiente o refrigeración a 5°C no influye en la estabilidad de los preparados liofilizados. Asimismo, aquellos cultivos liofilizados preparados en medio de cultivo sin Tween 80 tienen menos porcentaje de reducción que aquellos crecidos en la condición contraria. Estos resultados pueden ser observados en las gráficas de las Figuras núms. 13 y 14.

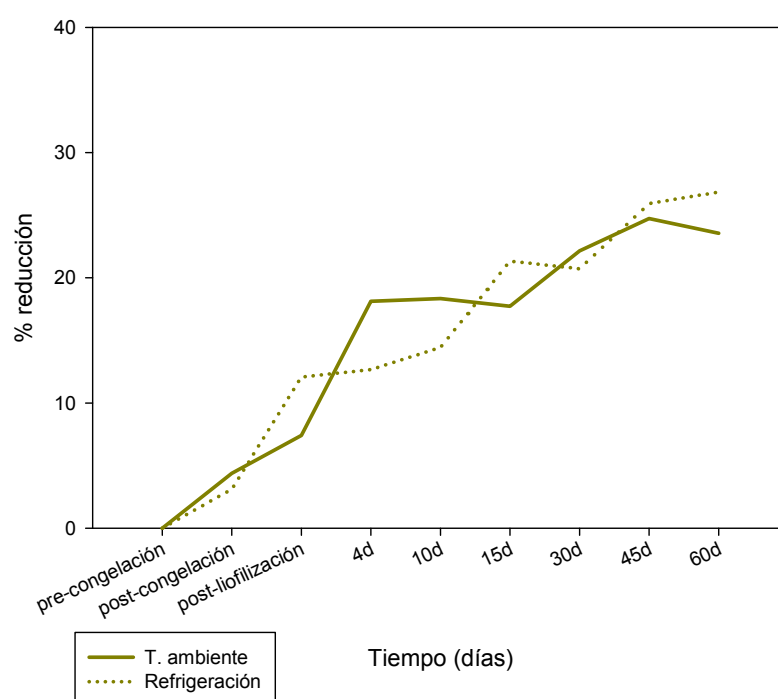


Figura 13. Porcentaje de reducción de estabilidad para *Lactobacillus plantarum* Ca7 liofilizada proveniente de crecimiento en condición de estrés salino y utilización de maltodextrina como crioprotector

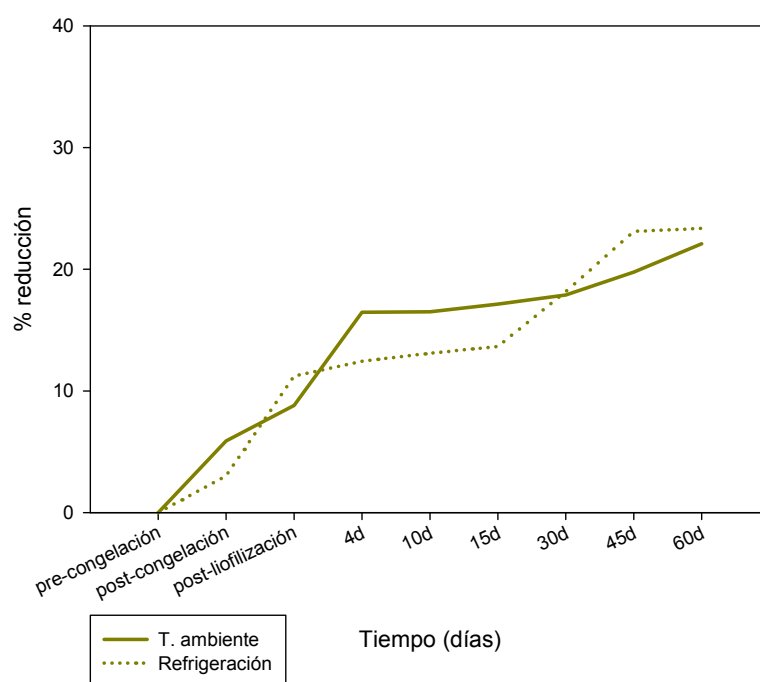


Figura 14. Porcentaje de reducción de estabilidad para *L. plantarum* Ca7 liofilizada proveniente de crecimiento en MRS sin Tween 80 y utilización de maltodextrina como crioprotector.

5.3. MODIFICAR Y EVALUAR NUEVAS VÍAS DE ADMINISTRACIÓN DEL PROBIÓTICO EN GRANJAS DE CARACOLES

5.3.1. Administración de la cepa probiótica a caracoles mediante la incorporación en el pienso

5.3.1.1. Resultados de la producción de la biomasa destinada al pienso

I. Proceso de obtención de biomasa

Los resultados obtenidos indican que bajo nuestra metodología la cepa logra un buen desarrollo durante su incubación (Fotografía núm. 9), obteniendo concentraciones de $13 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/gr}$ cuando la cepa es liofilizada (Tabla núm. 17). Los resultados para el cálculo de biomasa a incorporar a 300 kilos de pienso se pueden observar en la Tabla núm. 17.



Fotografía 9. Botellas con crecimiento bacteriano de *Lactobacillus plantarum* Ca7.

Tabla 17. Resumen de parámetros a considerar en el cálculo de gramos a pesar de biomasa probiótica a incorporar al pienso.

Cantidad de Pienso	Concentración liófilo	Concentración en pienso	Gramos a pesar
300 Kg	13 Log ₁₀ UFC/gr	9 Log ₁₀ UFC/gr	30

5.3.1.2. Resultados de la estabilidad a temperatura ambiente de la cepa probiótica liofilizada

Los resultados indican que los cultivos liofilizados incorporados en el pienso presentan una reducción inicial para continuar una estabilidad en el tiempo. Los valores de concentración obtenidos, son resumidos en la Tabla núm. 18 y Figura núm. 15.

Tabla 18. Valores de estabilidad de la concentración y porcentaje de reducción de *Lactobacillus plantarum* Ca7 incorporado en pienso.

Días	Concentración de <i>L. plantarum</i> Ca7 en pienso	
	Log ₁₀ UFC/gr	% reducción
0	7.447 ± 0.168	-
45	5.415 ± 0.203	27.29
90	5.279 ± 0.236	29.12

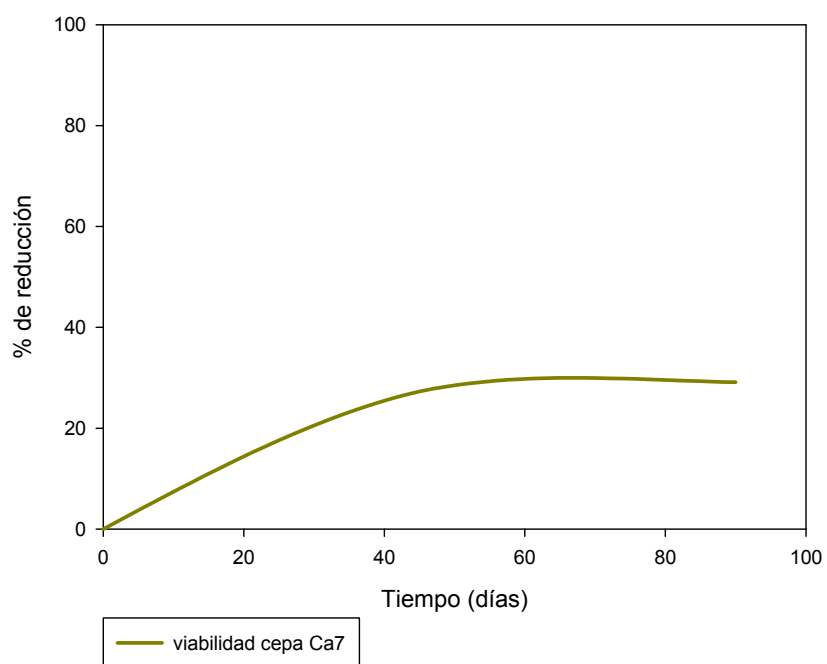


Figura 15. Comportamiento del porcentaje de reducción de viabilidad en *Lactobacillus plantarum* Ca7 incorporada al pienso durante 90 días.

5.3.2. Administración de la cepa a caracoles mediante la incorporación en el agua de riego

5.3.2.1. Resultados de la administración de la cepa a caracoles mediante la incorporación en el agua de riego

I. Viabilidad de la cepa incorporada en agua de riego

Los resultados de viabilidad de la cepa no liofilizada indican que existe sobrevivencia en ambos tipos de agua pasada siete horas. Los valores de los recuentos son resumidos en la Tabla núm. 19.

Tabla 19. Concentración de *Lactobacillus plantarum* Ca7 obtenida a partir de muestras de agua de red y pozo

horas	Log ₁₀ UFC/mL	
	Agua de red	Agua de pozo
0	9.643	9.041
1	9.550	8.875
3	8.628	7.836
7	7.860	7.573

II. Porcentaje de reducción de la cepa incorporada en agua de riego

Pasada las siete horas los valores de porcentaje de reducción son mayores en el agua de red. Estos valores son resumidos en la Tabla núm. 20 y Figura núm. 16.

Tabla 20. Porcentaje de reducción a través del tiempo de *Lactobacillus plantarum* Ca7 diluida.

horas	% reducción	
	Agua de red	Agua de pozo
1	0.97	1.84
3	10.53	13.34
7	18.49	16.24

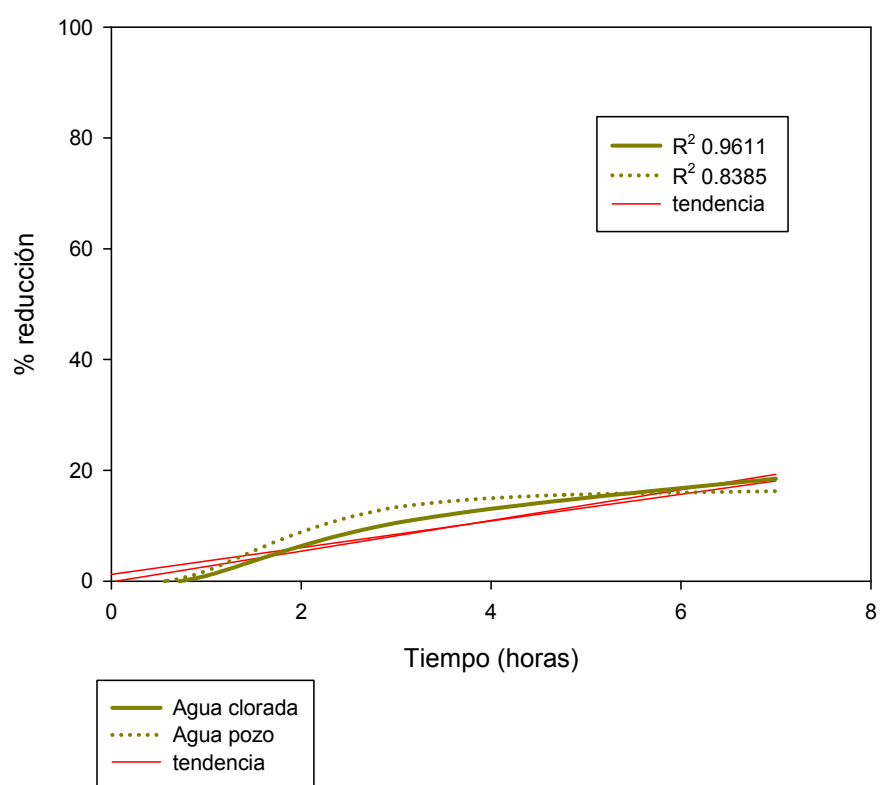


Figura 16. Comportamiento del porcentaje de reducción de viabilidad de *Lactobacillus plantarum* Ca7 diluida en agua de red y agua de pozo

5.3.3 Desarrollo de una alternativa de administración del probiótico a través de la implementación de un sistema de agitación y distribución en agua de riego

5.3.3.1. Resultados de la estabilidad del cultivo reciente en el sistema de agitación

I. Viabilidad en máquina de agitación y dilución en agua de pozo

La Fotografía núm. 10 muestra el cultivo en la máquina de agitación. Podemos señalar que la cepa posee buena estabilidad durante cinco días. Los valores de las concentraciones y los porcentajes de reducción son resumidos en la Tabla núm. 21 y Figura núm. 17.



Fotografía 10. Equipo de agitación y mantención de temperatura con cultivo de *Lactobacillus plantarum* Ca7.

Tabla 21. Valores de concentración y porcentaje de reducción de *Lactobacillus plantarum* Ca7 incorporado en equipo de agitación.

Tiempo (días)	Concentración cepa <i>L. plantarum</i> Ca7 en equipo agitación	
	Log ₁₀ UFC/mL	% reducción
0	12.82	-
1	12.51	2.40
2	12.04	6.07
3	11.23	12.40
4	10.97	14.41
5	10.82	15.60

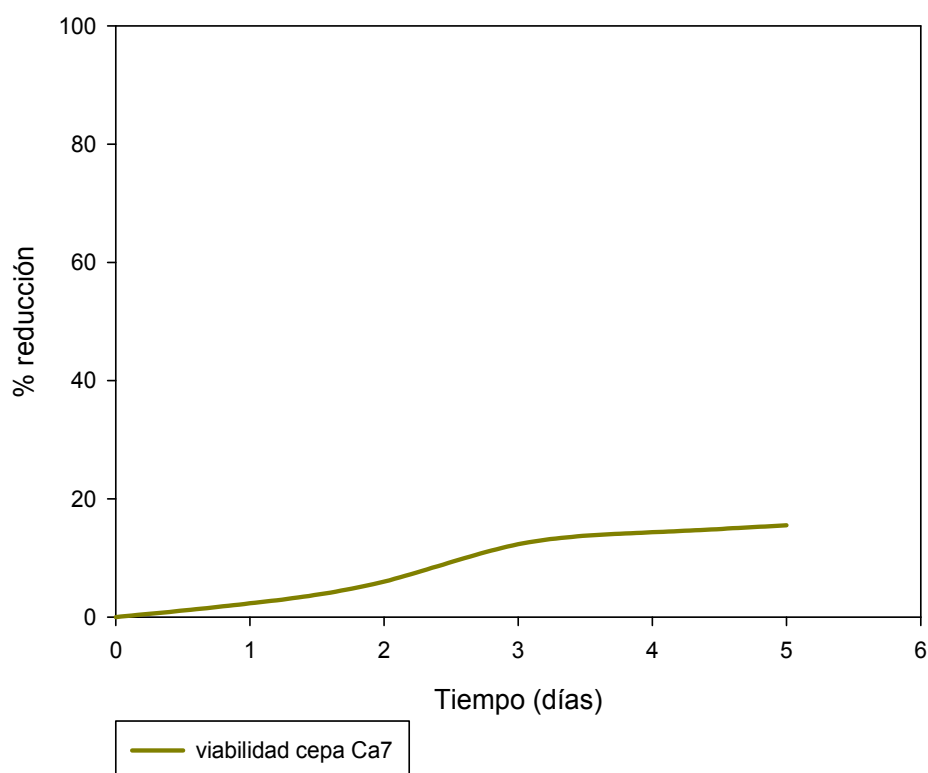


Figura 17. Comportamiento del porcentaje de reducción de viabilidad de *L. plantarum* Ca7 incorporada en equipo de agitación durante cinco días.

Para la dilución en agua de pozo, los valores de los recuentos diarios indican una reducción de la cepa. Los valores correspondientes de reducción son resumidos en la Figura núm. 18.

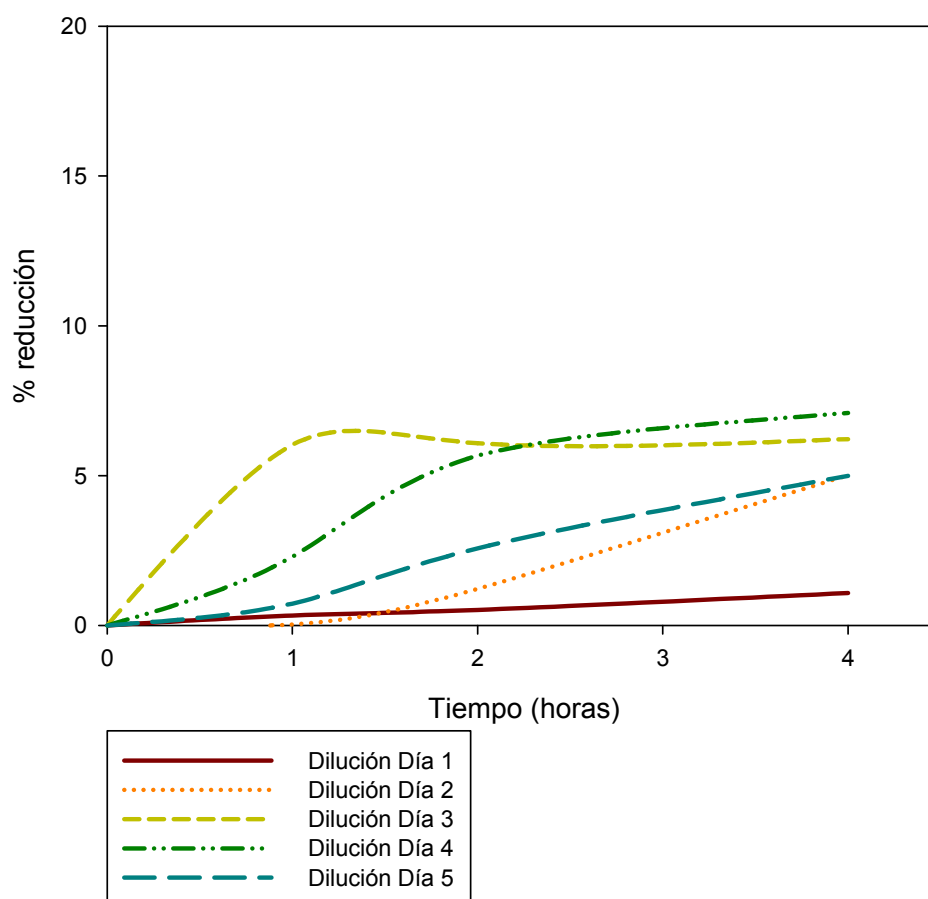


Figura 18. Porcentajes de reducción de viabilidad de *Lactobacillus plantarum* Ca7 durante cuatro horas y diluida en agua de pozo. Evaluación realizada por cinco días.

5.3.3.2. Resultados de la estabilidad del cultivo liofilizado en el sistema de agitación

Para el estudio previo de estabilidad con cultivos liofilizados de base láctea y maltodextrina realizado en el laboratorio, los resultados indicaron que aquellos preparados en base láctea poseen concentraciones más elevadas y menor

porcentaje de reducción durante cuatro días. Los resultados son resumidos en la Tabla núm. 22 y Figura núm. 19.

Tabla 22. Valores de concentración (Log_{10} UFC/mL) de viabilidad en el tiempo, de cultivos liofilizados preparados con distintas bases y diluidos en solución de Ringer a proporción 1:10.

Base de liofilización	Tiempo (días)				
	0	1	2	3	4
no láctea	13.22	13.11	10.48	9.60	9.60
láctea	13.10	12.68	11.87	11.90	11.28

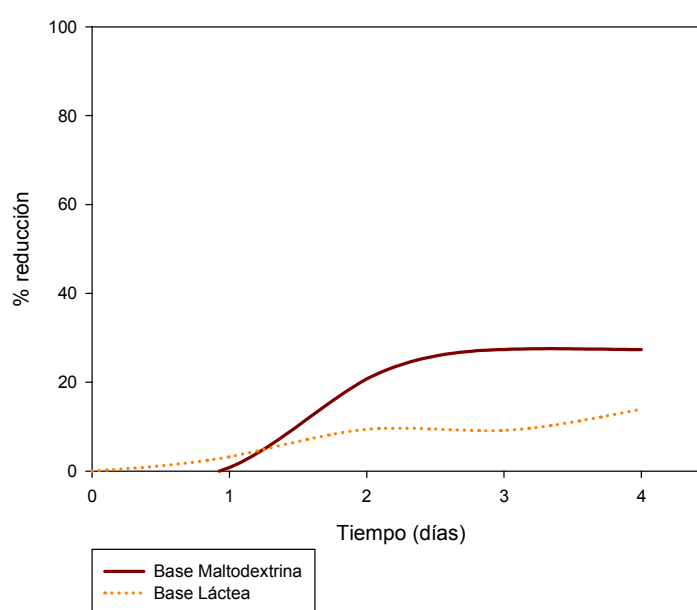


Figura 19. Porcentajes de reducción de viabilidad de cultivos liofilizados de *Lactobacillus plantarum* Ca7, y diluidos en solución de Ringer a proporción 1:10 durante 4 días.

Una vez determinado en laboratorio que la base láctea presentó mejores resultados, se replicó la experimentación *in situ* en una granja helicícola, como indican la Fotografías núms. 11 y 12.



Fotografía 11. Instalación de máquina de agitación conectada a estanques con agua de pozo para realizar la mezcla.



Fotografía 12. Máquina de agitación instalada en granja helicícola.

Para el análisis de la viabilidad en el tiempo de las soluciones preparadas en la granja helicícola, los resultados indicaron que las proporciones 1:10 y 1:20 permiten obtener los mayores valores de concentración del microorganismo tanto en la máquina de agitación como a su salida en el agua de riego. Estos resultados son resumidos en la Tabla núm. 23.

Tabla 23. Valores de concentración de *Lactobacillus plantarum* Ca7 en las distintas concentraciones utilizadas en la solución de máquina y su respectivo valor a la salida en el agua de riego.

Tiempo	Concentración Log ₁₀ (UFC/mL)					
	1:10		1:20		1:100	
	Máquina	Riego	Máquina	Riego	Máquina	Riego
< 10 minutos	12.26	7.3	11.28	6.40	8.61	< 3.0
2 horas	11.04	8.08	-	-	-	-
1 día	9.64	5.32	-	-	-	-
3 días	5.00	< 2.0	-	-	-	-
4 días	-	-	5.60	4.97	-	-
5 días	5.73	2.43	-	-	-	-

Por último, el análisis de otros microorganismos potencialmente patógenos, indicó la presencia de una variada microbiota. Los resultados son resumidos en la Tabla núm. 24.

Tabla 24. Evaluación y presencia de otros microorganismos contaminantes en la solución de la máquina y el agua de la mezcla.

Tiempo	<i>E. coli</i>		ASR		HL	
	Máquina	Riego	Máquina	Riego	Máquina	Riego
minutos	-	-	-	-	-	-
2 horas	-	-	-	-	-	-
1 día	+	-	+	-	+	-
3 días	+	+	+	-	+	-
4 días	+	-	-	-	+	-
5 días	+	+	-	+	+	-

E. coli: *Escherichia coli*

ASR: anaerobios sulfito reductores.

HL: hongos levaduriformes.

+ = presencia.

- = ausencia.

5.4. EVALUAR ALTERNATIVAS PARA EL CONTROL DE CONTAMINACIÓN MICROBIOLÓGICA

5.4.1. Evaluar aplicaciones de la cepa probiótica para el control de contaminación microbiológica

5.4.1.1. Resultados de la utilización del sobrenadante de cultivos como posible control de microorganismos

I. Capacidad inhibitoria de sobrenadante procedente del cultivo

Los resultados indicaron que la liofilización del sobrenadante da como resultado un producto con características higroscópicas, de dificultosa recuperación, tal como se observa en la Fotografía núm. 13.



Fotografía 13. Vial de vidrio con sobrenadante liofilizado de *Lactobacillus plantarum* Ca7.

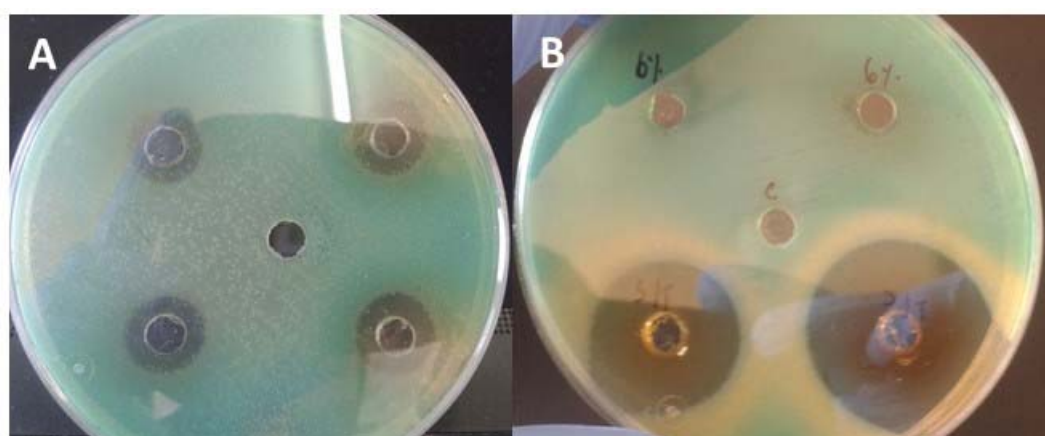
Para Las lecturas de los halos de inhibición del sobrenadante a distintas concentraciones, los resultados indicaron la presencia de una acción inhibitoria frente a todos los microorganismos ensayados, observándose mayor actividad con la mayor concentración del sobrenadante. Los valores de los halos de inhibición son resumidos en la Tabla núm. 25.

El microorganismo *Pseudomonas aeruginosa* resultó ser el patógeno con mayor sensibilidad, como se puede observar en la Fotografía núm. 14.

Tabla 25. Diámetros de los halos de inhibición de cinco patógenos frente a la presencia de sobrenadante de *Lactobacillus plantarum* Ca7 a diferentes concentraciones.

Microorganismos	Concentración del sobrenadante		
	1X	5X	10X
<i>E. coli</i>	9 mm	13 mm	16 mm
<i>Salmonella</i> spp.	9 mm	18 mm	24 mm
<i>B. cereus</i>	9 mm	12 mm	15 mm
<i>P. aeruginosa</i>	9 mm	22 mm	30 mm
<i>S. aureus</i>	9 mm	12 mm	15 mm

E. coli: *Escherichia coli*; *B. cereus*: *Bacillus cereus*; *P. aeruginosa*: *Pseudomonas aeruginosa*; *S. aureus*: *Staphylococcus aureus*.



Fotografía 14. Visualización de los halos de inhibición sobre *Pseudomonas aeruginosa*. A) adición del sobrenadante a concentración 1X; B) sobrenadante a concentración 5X y 10X.

II. Incorporar el sobrenadante al proceso de liofilizado de la cepa probiótica como adyuvante al control de microorganismos patógenos en el pienso

Se observó que la proporción 2:1 (2 partes de crioprotector-cepa, más 1 parte de sobrenadante obtenido por filtración) permite obtener las concentraciones más elevadas, tener buena estabilidad en almacenamiento a 5°C, y poseer propiedades inhibitorias si es incorporada en el pienso. Los resultados son resumidos en la Figura núm. 20, en la Tabla núm. 26, y en la Fotografía núm. 15.

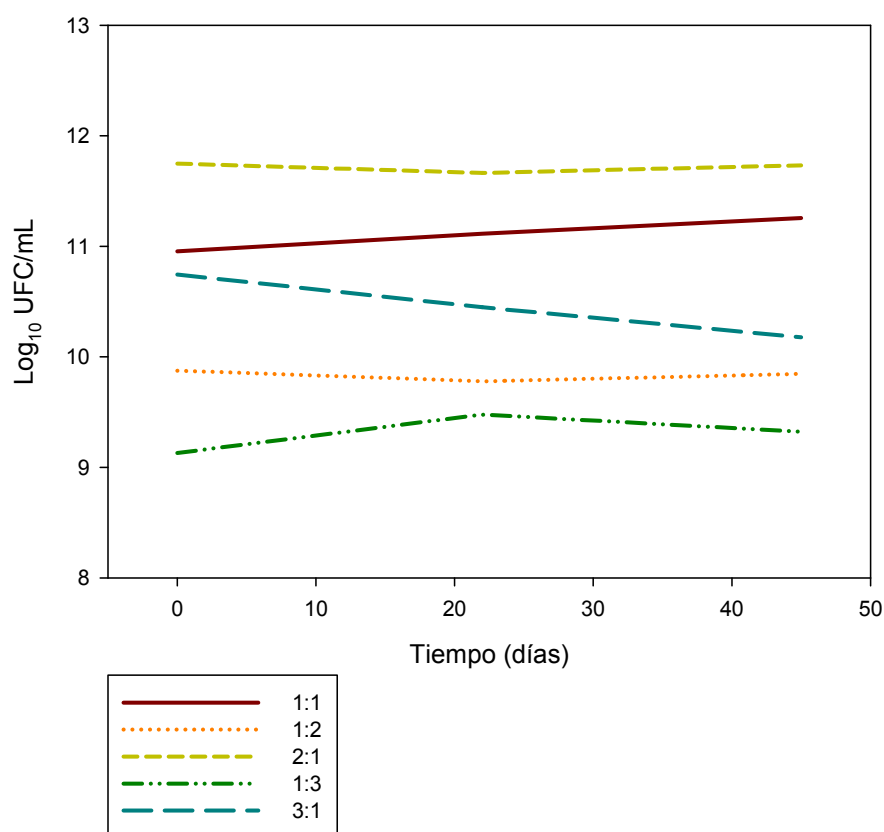


Figura 20. Recuentos y estabilidad en el tiempo de las distintas preparaciones de cultivos liofilizados que contienen una porción de sobrenadante almacenadas a 5°C.

Tabla 26. Valores de diámetro de inhibición obtenidos en el ensayo de interacción en placa entre preparaciones de cultivos liofilizados que contienen una porción de sobrenadante y *Escherichia coli*.

Patógeno	Proporción de cepa y sobrenadante				
	1:1	1:2	2:1	1:3	3:1
<i>E. coli</i>	9	8	8	9	7



Fotografía 15. Ensayo de interacción en placa, con la utilización del producto obtenido finalizado el proceso de liofilización a partir de distintas preparaciones de cultivos liofilizados que contienen una porción de sobrenadante.

5.4.1.2 Resultados de la capacidad de formación de biopelículas

I. Determinación del crecimiento microbiano

En general los resultados indicaron que todas las cepas ensayadas son capaces de desarrollarse en los medios de cultivo ensayados sobre la placa de microtitulación. Los valores de densidad óptica obtenidos son resumidos en la Tabla núm. 27.

Tabla 27. Valores de Densidad óptica (DO) obtenidos a las 24 horas de incubación.

Microorganismos / Medio de cultivo	DO (492 _{nm})	
	$\bar{X}$	DS
<i>S. aureus</i>		
TSB	2.095	0.140
<i>Lactobacillus plantarum</i> Ca7		
MRS	1.954	0.028
<i>E. coli</i> 1		
TSB	0.949	0.009
BHI	0.831	0.011
<i>E. coli</i> 2		
TSB	1.002	0.038
BHI	0.799	0.021
<i>C. kasseri</i>		
TSB	0.889	0.037
BHI	0.737	0.039

TSB, MRS, BHI: Medios de cultivo microbiológico.

$\bar{X}$: promedio

DS: desviación estándar.

II. Formación de la biopelícula

Los resultados obtenidos indicaron que ninguna cepa posee propiedades de adhesión a la placa de microtitulación. Los valores de densidad óptica obtenidos son resumidos en la Tabla núm. 28 y la Fotografía núm. 16 muestra parte del procedimiento realizado.

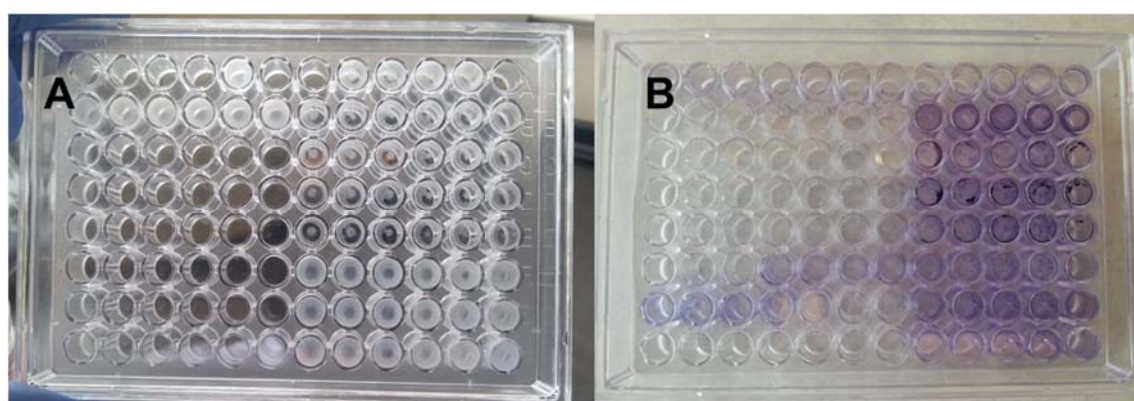
Tabla 28. Valores de Densidad óptica (DO) relacionados con la formación de la biopelícula.

Microorganismos / Medio de cultivo	DO (492 _{nm})	
	$\bar{X}$	DS
<i>S. aureus</i> TSB	1.269	0.156
<i>Lactobacillus plantarum</i> Ca7 MRS	0.057	0.030
<i>E. coli</i> 1 TSB	0.097	0.005
BHI	0.081	0.050
<i>E. coli</i> 2 TSB	0.115	0.042
BHI	0.084	0.035
<i>C. kasseri</i> TSB	0.109	0.031
BHI	0.088	0.021

TSB, MRS, BHI: Medios de cultivo microbiológico.

$\bar{X}$: promedio.

DS: desviación estándar.

**Fotografía 16.** Placas de microtitulación de 96 pocillos utilizadas para el ensayo de determinación de biopelícula. Imagen A indica la adhesión a la placa posterior a los lavados después de la incubación; imagen B indica la visualización de la placa posterior a la fijación del colorante.

5.4.1.3. Resultados de la capacidad de disrupción y/o inhibición de formación de biopelículas

I. Inhibición de la formación de la biopelícula

Los resultados obtenidos indican que las concentraciones del sobrenadante ensayadas fueron capaces inhibir la adhesión del microorganismo control. Los valores de densidad óptica y porcentaje de reducción de la biopelícula son resumidos en la Tabla núm. 29 y visualizados en la Figura núm. 21.

Tabla 29. Valores de DO y porcentaje reducción de la biopelícula en ensayo de inhibición.

	DO (492nm)		% reducción biopelícula
	$\bar{X}$	DS	
<i>S. aureus</i> (C+)	1.20	0.0704	0%
Sobrenadante 1X	0.04	0.0062	96%
Sobrenadante 5X	0.00	0.0017	100%
Sobrenadante 10X	0.00	0.0082	100%

S. aureus (C+): *Staphylococcus aureus* control positivo

$\bar{X}$: promedio.

DS: desviación estándar.

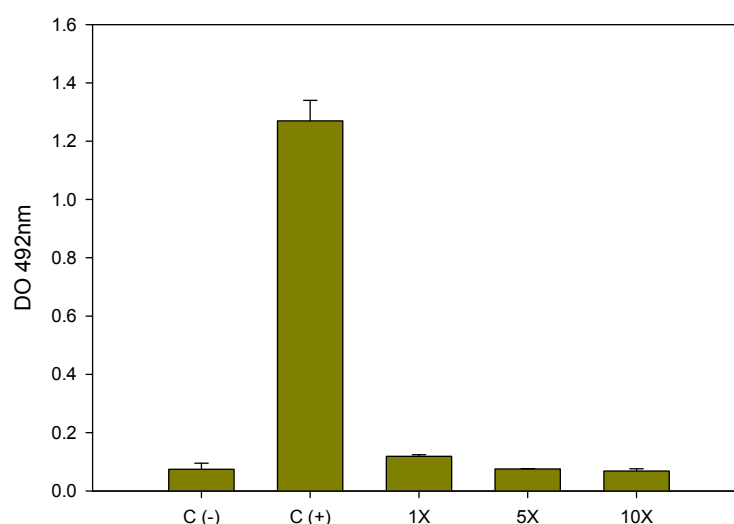


Figura 21. Gráfico con los valores de DO obtenidos en el ensayo de inhibición de formación de una biopelícula de *Staphylococcus aureus*.

C (-) = control negativo; C (+) = control positivo.

1X: sobrenadante sin concentrar; 5X: sobrenadante 5 veces concentrado; 10X: sobrenadante 10 veces concentrado.

II. Resultados de la disrupción de una biopelícula madura.

Los resultados de este ensayo indicaron que las tres concentraciones del sobrenadante poseen algún efecto en la disrupción de la biopelícula. Los porcentajes de reducción de la biopelícula son resumidos en la Tabla núm. 30 y observados en la Figura núm. 22.

Tabla 30. Valores de DO y porcentaje reducción de la biopelícula en ensayo de disrupción.

	DO (492nm)		% reducción biopelícula
	$\bar{X}$	DS	
<i>S. aureus</i> (C+)	1.196	0.070	0%
Sobrenadante 1X	0.837	0.120	30%
Sobrenadante 5X	1.006	0.291	16%
Sobrenadante 10X	1.175	0.229	2%

C+: control positivo, *Staphylococcus aureus*.

$\bar{X}$: promedio.

DS: desviación estándar.

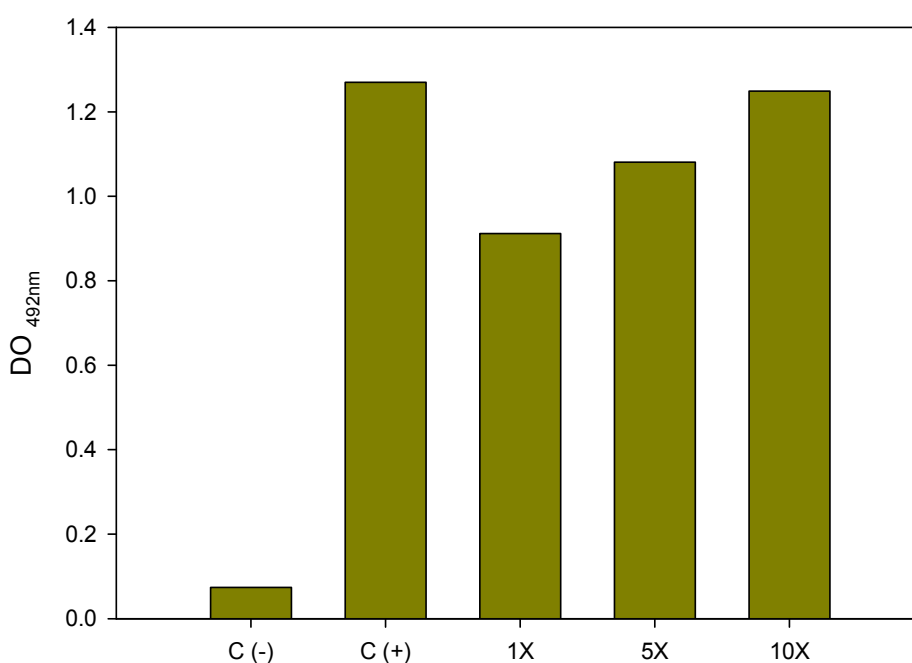


Figura 22. Gráfico con los valores de DO obtenidos en el ensayo de disrupción de una biopelícula madura formada por *Staphylococcus aureus*.

C (-) = control negativo; C (+) = control positivo.

1X: sobrenadante sin concentrar; 5X: sobrenadante 5 veces concentrado; 10X: sobrenadante 10 veces concentrado.

5.4.2. Efecto de antifúngicos y acidificantes como control de contaminación microbiológica en piensos

5.4.2.1. Resultados de evaluar concentraciones óptimas de antifúngicos y acidificantes para su aplicación en piensos de caracoles

Los resultados de los recuentos de la Familia Enterobacteriaceae indican que la preparación que contiene el pienso y el acidificante (Experimento 2) presentó los menores recuentos en comparación a las otras preparaciones. Para los hongos miceliares, el pienso que mezcla los acidificantes 1 y 2, más la aplicación del fungicida comercial (Experimento 6) presentó el mejor efecto sobre este grupo. Los resultados pueden ser observados en las Figuras núms. 23 y 24.

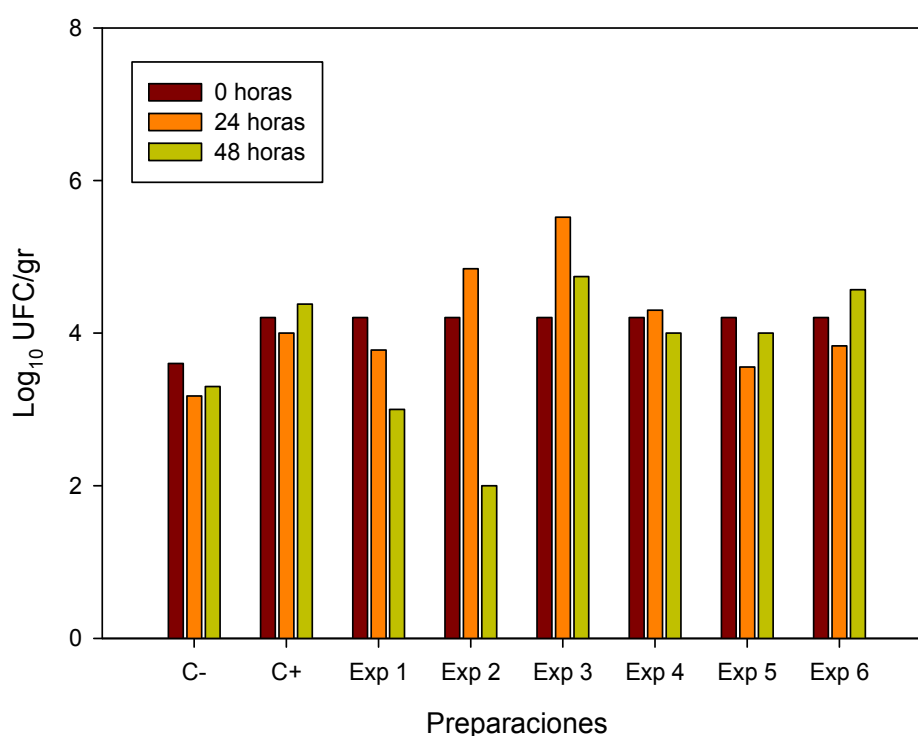


Figura 23. Recuento de enterobacterias de diversas preparaciones de pienso y aditivos acidificantes.

C (-) = control negativo; C (+) = control positivo; Exp = experimento.

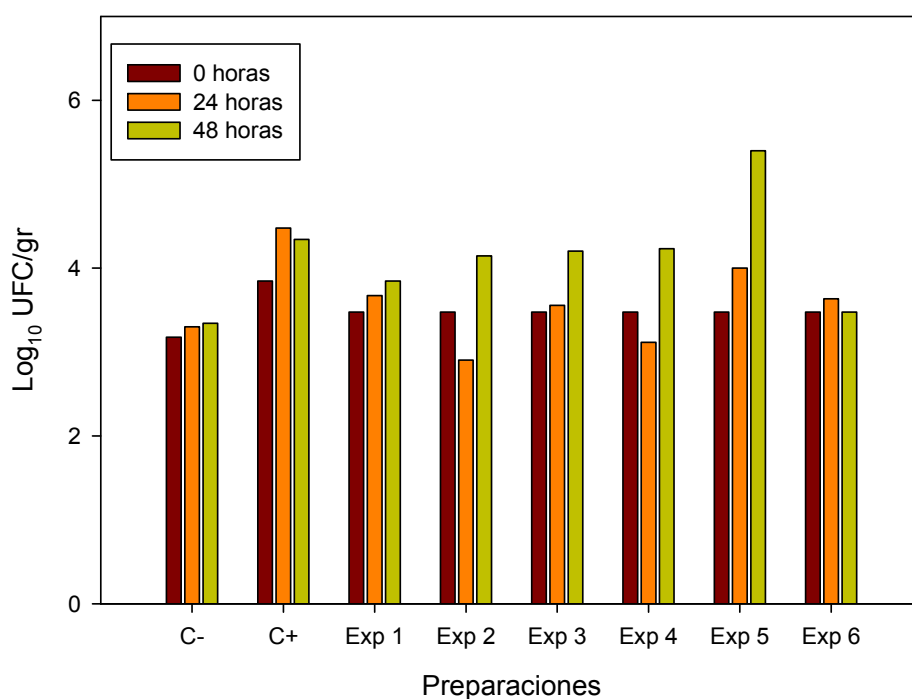


Figura 24. Recuento hongos miceliares de diversas preparaciones de pienso y aditivos acidificantes.

C (-) = control negativo; C (+) = control positivo; Exp = experimento.

Asimismo, los distintos piensos preparados con los acidificantes y/o fungicidas no tienen un efecto inhibitorio en *Lactobacillus plantarum* Ca7, tal como se puede observar en la Fotografía núm. 17.



Fotografía 17. Visualización del efecto de preparaciones de piensos que incorporan antifúngicos y/o acidificantes sobre *Lactobacillus plantarum* Ca7.

5.5. EFECTO EN CARACOLES DE LA ADMINISTRACIÓN DE *Lactobacillus plantarum* Ca7 A ESCALA DE LABORATORIO

5.5.1. Evaluar en laboratorio el efecto probiótico de distintas preparaciones de pienso sobre el crecimiento de caracoles provenientes de granjas

I. Medición del crecimiento de la concha.

Los resultados indicaron que los caracoles de un año de vida y alimentados con el pienso 1 (Fórmula nueva + acidificante + fungicida + probiótico + ajo + canela) presentan un diámetro de concha mayor. Los resultados obtenidos son resumidos en la Tabla núm. 31 y se pueden observar en la Figura núm. 25.

Tabla 31. Valores de diámetro de concha (mm) de caracoles de 1 año de vida al inicio y final del experimento.

Pienso	Diámetro de concha de caracoles (mm)		
	Inicio	Final	Crecimiento
Pienso 1	17,4 ± 2,77	18,53 ± 2,41	1,13
Pienso 2	17,25 ± 2,60	17,66 ± 3,18	0,41
Pienso 3	16,0 ± 2,798	16,85 ± 2,26	0,846

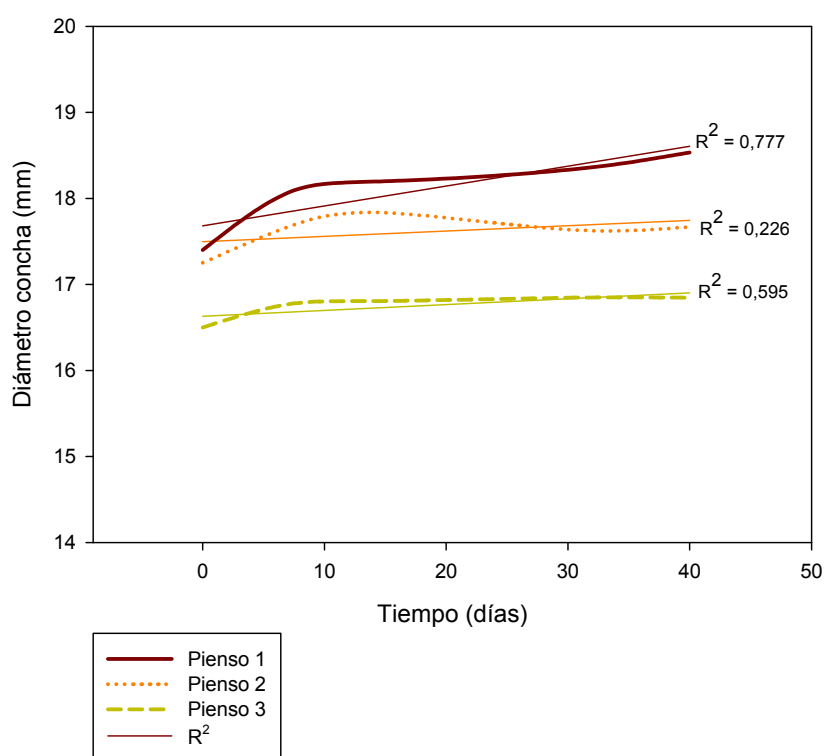


Figura 25. Efecto de distintas formulaciones de piensos sobre el crecimiento de la concha en caracoles de 1 año.

En los caracoles de tres meses de vida no se observaron diferencias en el crecimiento de la concha por la administración de los distintos piensos. Los valores del diámetro de concha obtenidos son resumidos en la Tabla núm. 32, y la curva de crecimiento en la Figura núm. 26.

Tabla 32. Valores de diámetro de concha (mm) de caracoles de 3 meses de vida al inicio y final del experimento

Pensos	Diámetro de concha de caracoles (mm)		
	Inicio	Final	Crecimiento
Pienso 1	14,46 ± 1,61	18,23 ± 1,74	3,77
Pienso 2	13,92 ± 2,53	18,00 ± 2,12	4,08
Pienso 3	12,36 ± 1,94	17,38 ± 2,72	5,03

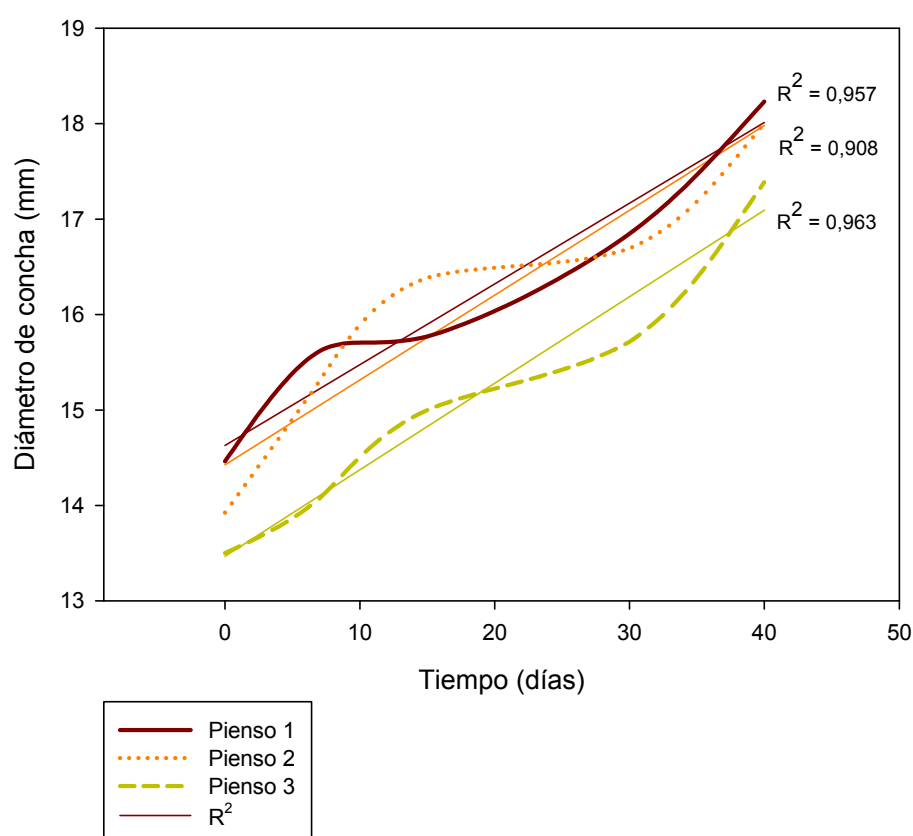


Figura 26. Efecto de distintas formulaciones de piensos sobre el crecimiento de la concha en caracoles de tres meses de vida.

II. Análisis microbiológico de las heces

Para los grupos de caracoles alimentados con los distintos piensos, los resultados indicaron presentar diversas tendencias a la disminución o incremento de los grupos de microorganismos evaluados (Tabla núm. 33). Las distintas concentraciones obtenidas son resumidas en las Figuras núms. 27 y 28 para los alimentados con el pienso 1; Figuras núms. 29 y 30 para los alimentados con el pienso 2; y las Figuras núms. 31 y 32 para los caracoles alimentados con el pienso 3.

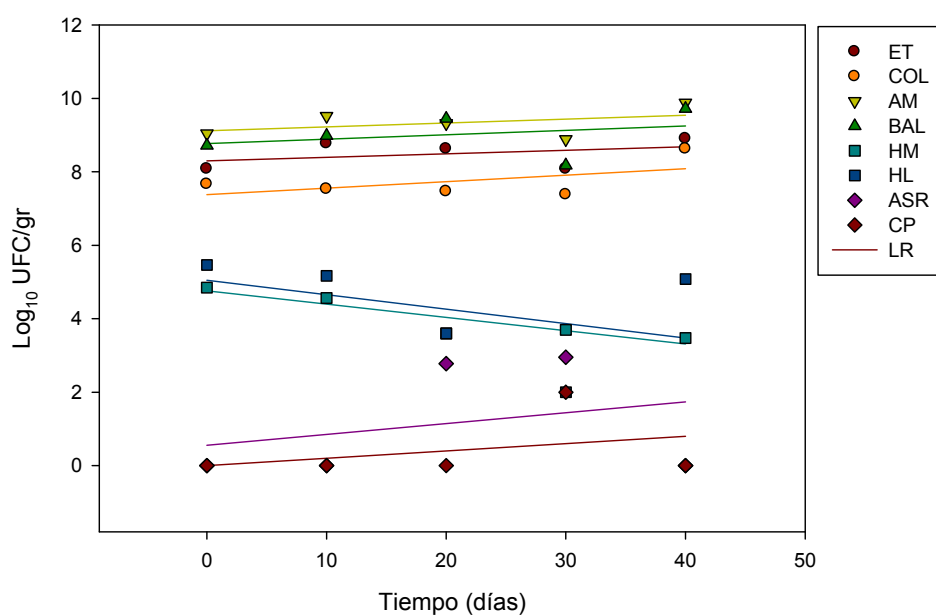


Figura 27. Recuentos en el tiempo y línea de regresión de cada grupo de microorganismos analizados desde las heces de caracoles con 3 meses de edad y alimentados con el pienso 1.

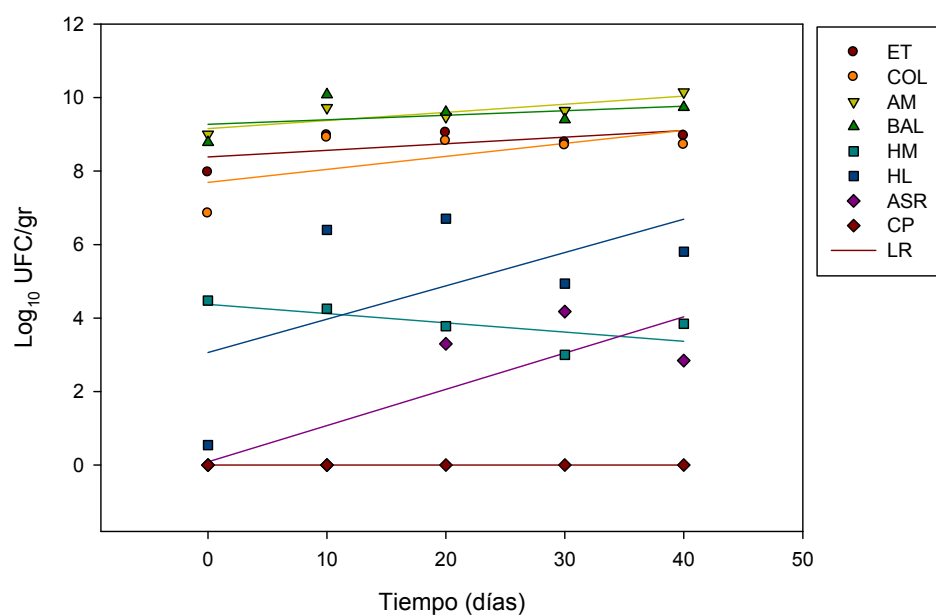


Figura 28. Recuentos en el tiempo y línea de regresión de cada grupo de microorganismos analizados desde las heces de caracoles con 1 año de edad y alimentados con el pienso 1.

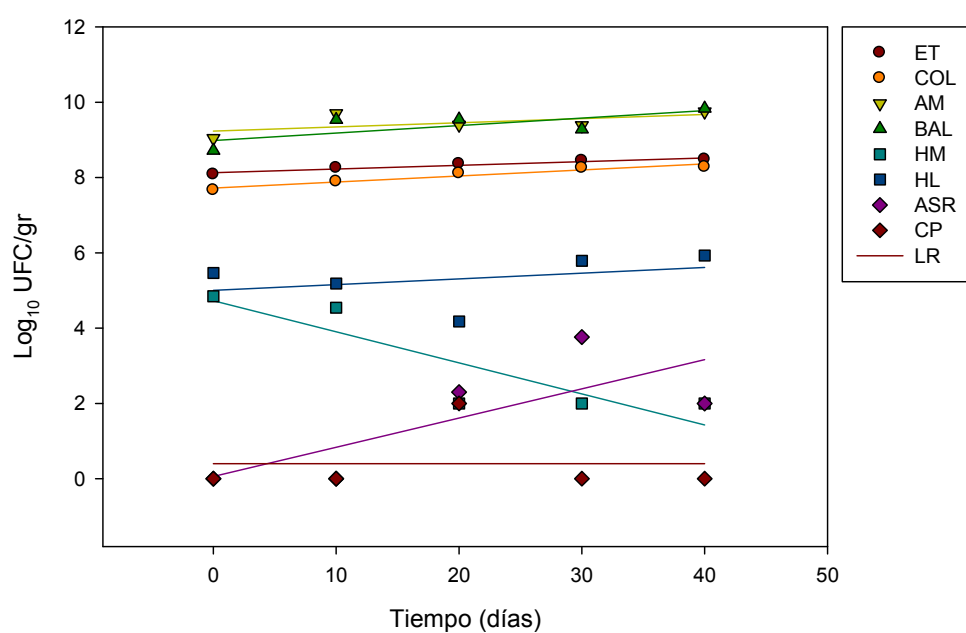


Figura 29. Recuentos en el tiempo y línea de regresión de cada grupo de microorganismos analizados desde las heces de caracoles con 3 meses de edad y alimentados con el pienso 2.

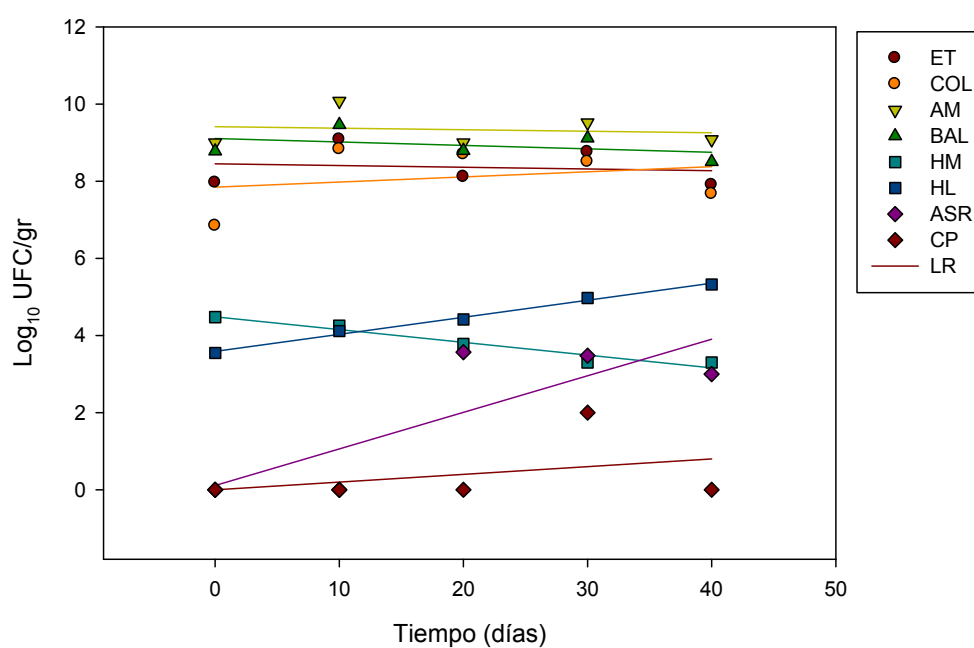


Figura 30. Recuentos en el tiempo y línea de regresión de cada grupo de microorganismos analizados desde las heces de caracoles con 1 año de edad y alimentados con el pienso 2.

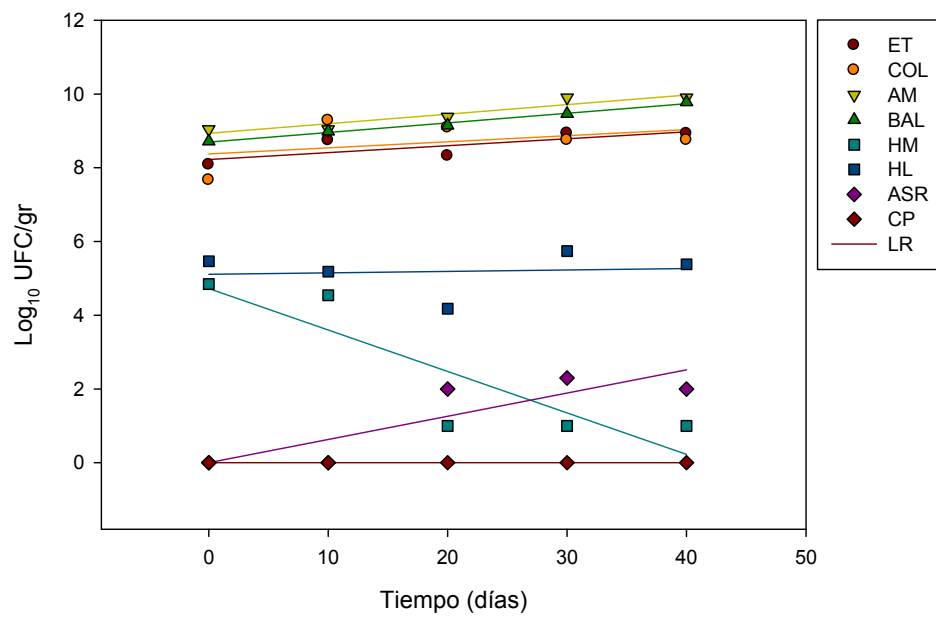


Figura 31. Recuentos en el tiempo y línea de regresión de cada grupo de microorganismos analizados desde las heces de caracoles con 3 meses de edad y alimentados con el pienso 3.

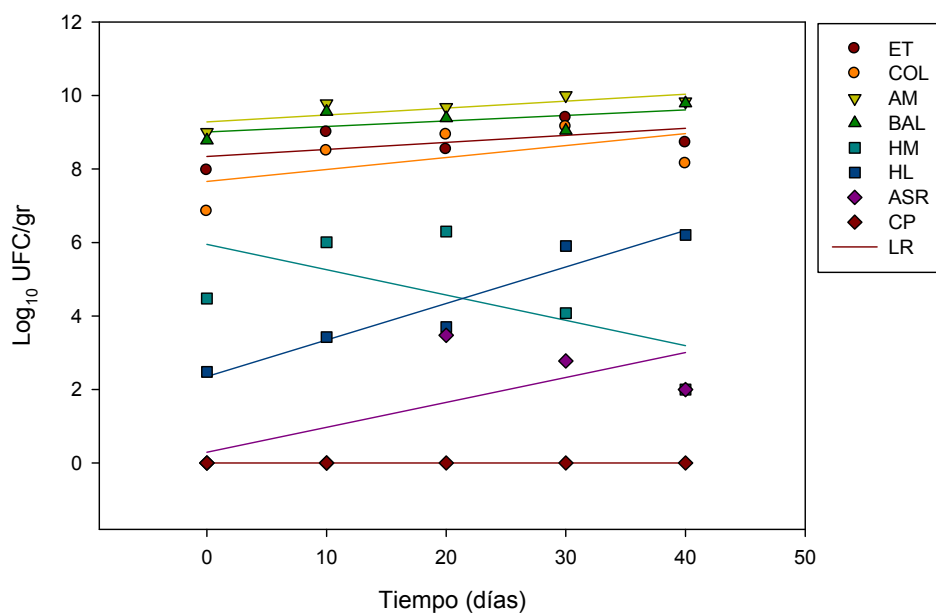


Figura 32. Recuentos en el tiempo y línea de regresión de cada grupo de microorganismos analizados desde las heces de caracoles con 1 año de edad y alimentados con el pienso 3.

Tabla 33. Valores de R^2 de los distintos grupos de microorganismos para cada grupo de caracoles, y de cada preparación de pienso evaluado.

	Pienso 1		Pienso 2		Pienso 3	
	3 meses	1 año	3 meses	1 año	3 meses	1 año
ET	0.151	0.401	0.932	0.018	0.607	0.316
COL	0.302	0.411	0.934	0.063	0.172	0.322
AM	0.177	0.708	0.368	0.018	0.892	0.598
BAL	0.097	0.162	0.556	0.148	0.988	0.348
HL	0.837	0.495	0.774	0.941	0.768	0.398
HM	0.183	0.325	0.121	0.991	0.011	0.928
ASR	0.088	0.644	0.577	0.658	0.742	0.451
CP	0.125	0.000	0.000	0.125	0.000	0.000

ET: enterobacterias totales; COL: coliformes; AM: aerobios mesófilos; BAL: bacterias ácido lácticas; HM: hongos miceliares; HL: hongos levaduriformes; ASR: anaerobios sulfito-reductores; CP: *Clostridium perfringens*.

III. Mortalidad de caracoles alimentados con los piensos

Los resultados de mortalidad indicaron que sólo el pienso 2 mostró un efecto negativo en los animales de 1 año. En los animales de 3 meses no se observó mortalidad durante la experimentación. Los valores obtenidos son resumidos en la Tabla núm. 34.

Tabla 34. Número de caracoles muertos durante el ensayo.

Días	Caracoles 1 año			Caracoles 3 meses		
	Pienso 1	Pienso 2	Pienso 3	Pienso 1	Pienso 2	Pienso 3
0	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0
20	0	0	0	0	0	0
30	0	1	0	0	0	0
40	0	5	0	0	0	0

IV. Análisis microbiológico del pienso

El análisis microbiológico durante la experimentación mostró un aumento en la concentración de enterobacterias y aerobios mesófilos, y una disminución de los coliformes, con presencia de anaerobios al final del ensayo. Los valores

obtenidos de los distintos piensos son visualizados en las Figuras núms. 33, 34 y 35.

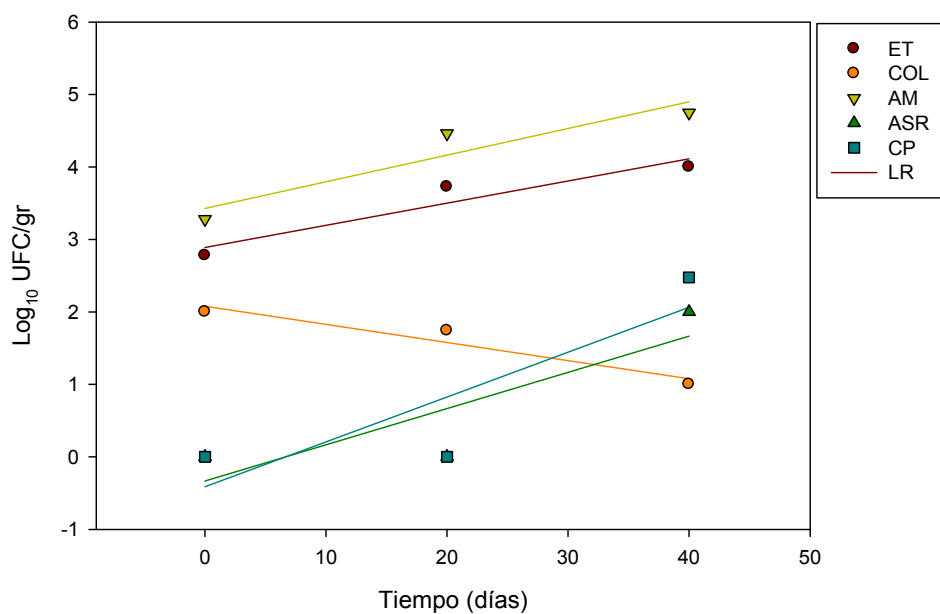


Figura 33. Análisis microbiológico del pienso 1 a través del tiempo.

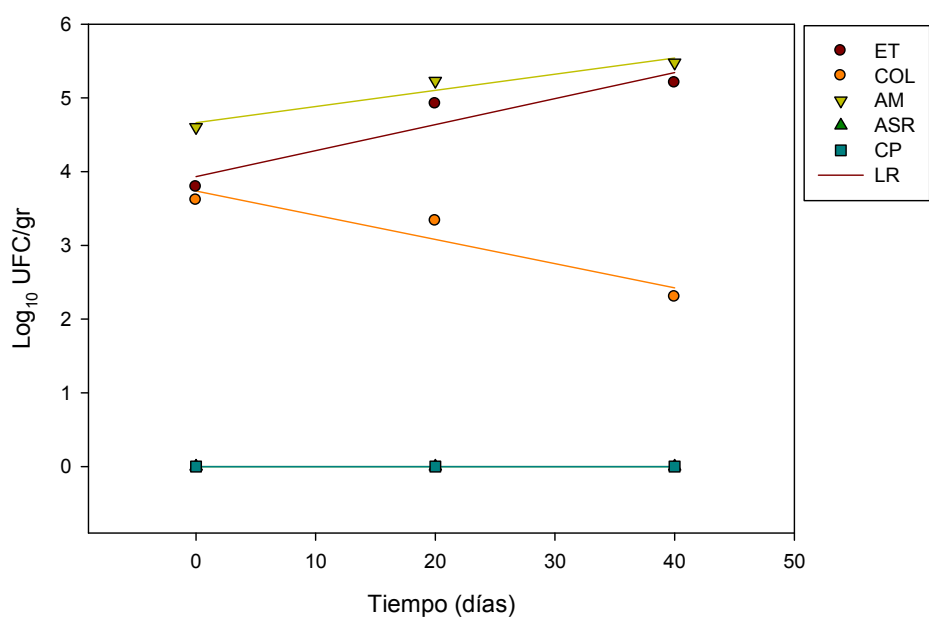


Figura 34. Análisis microbiológico del pienso 2 a través del tiempo.

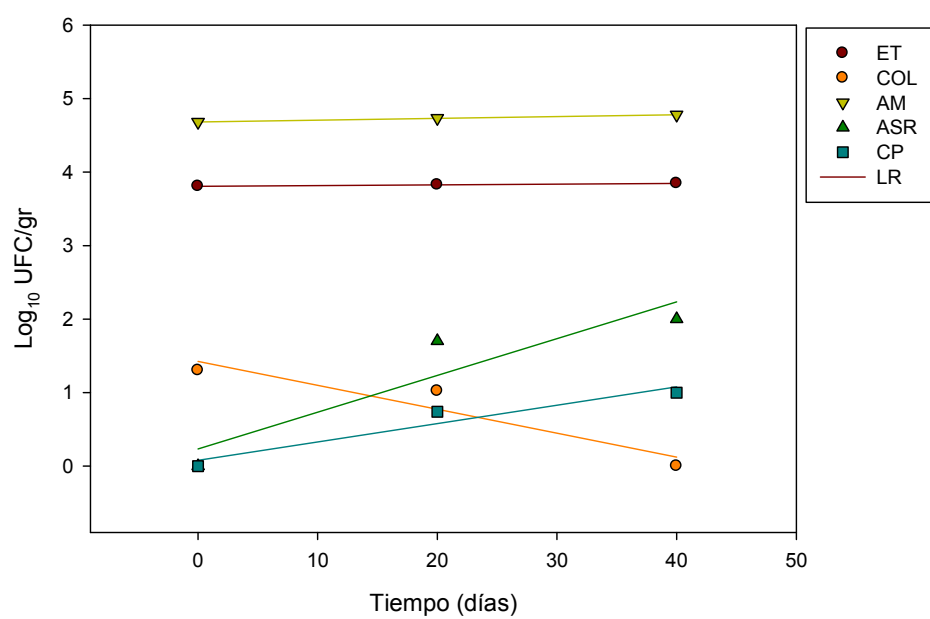


Figura 35. Análisis microbiológico del pienso 3 a través del tiempo.

6. DISCUSIÓN

6.1. EVALUACIÓN DEL ESTADO SANITARIO DE UNA GRANJA HELICÍCOLA

6.1.1. Discusión de la evaluación microbiológica de distintas salas de reproducción

La Guía de Prácticas Correctas de Higiene en Helicicultura (MARM, 2009) indica que las instalaciones destinadas a la reproducción de caracoles, deben ser adecuadas para conseguir parámetros medioambientales que faciliten la reproducción animal, y en que la densidad de población debe ser la adecuada para garantizar el bienestar animal y el correcto manejo de los animales. Estas instalaciones deberán estar construidas, en la medida de lo posible, con materiales lisos, duros y de fácil limpieza y desinfección. Las instalaciones se deberán limpiar con la frecuencia necesaria en las zonas en las que se mantienen los animales, con el fin de eliminar el polvo y los detritus o excrementos acumulados en los suelos y otras zonas y evitando que la suciedad afecte al hábitat de los animales o al mantenimiento de las puestas.

En nuestro estudio la evaluación microbiológica ambiental se realizó en salas de reproducción de caracoles, que se encuentran instaladas en una nave cerrada, en la que se controlan las condiciones medioambientales, tales como humedad relativa, temperatura y fotoperíodo, con el objetivo de favorecer la estimulación del caracol a alimentarse, reproducirse, favorecer la puesta y obtener alevines, que posteriormente pasarán a la fase de engorde en granjas destinadas a ello, según los distintos tipos de crianza existentes.

Los resultados del muestreo ambiental, indicaron la existencia de una variada diversidad microbiana en aquellas salas que se encontraban en uso para la reproducción y engorde de caracoles, principalmente en zonas donde habitan los caracoles y zonas donde se acumulan y recogen las heces. Mientras que en aquellas salas limpias o sin uso, la presencia de microorganismos es baja, tal

como lo indican los resultados del análisis por uso de hisopos estériles, placas de contacto, y el muestreo por sedimentación.

Y el hecho de que los grupos de microorganismos hallados en las distintas placas de cultivo tienen una estrecha similitud a los encontrados en las heces, indicaría que estas son la principal fuente de contaminación al interior de una nave helicícola.

No existen estudios previos con información relativa a los microorganismos presentes en las superficies de instalaciones de una granja helicícola, por lo que los resultados obtenidos son relevantes frente a futuros análisis ambientales y posible presencia de patógenos que pudiesen ocasionar problemas de contaminación y su posible origen. La elevada presencia de microorganismos integrados en la Familia de las Enterobacteriaceae pone de manifiesto la relación directa entre la contaminación detectada y la elevada presencia de heces de los caracoles en la nave.

6.1.2. Discusión de los resultados obtenidos del análisis microbiológico de agua de red y pozo

El agua que se suministre a los caracoles, tanto si es a través de pulverización como para su limpieza deberá ser agua potable. Si no es de red pública se deberá hacer un análisis anual para contrastar su potabilidad y componentes, guardando los resultados durante un período de dos años. Se debe garantizar el aporte adecuado de agua, tanto en calidad como en cantidad, independientemente de las condiciones de la explotación. Los equipos para el suministro de agua deben estar diseñados, contruidos y ubicados de manera que se reduzca al mínimo el riesgo de contaminación del agua y se garantice el acceso de todos los animales a la misma. A su vez, dichos dispositivos deben diseñarse de forma estanca para prevenir la contaminación y el acceso de animales extraños. Se limpiarán y desinfectarán los dispositivos con la

frecuencia adecuada para que permanezcan en buenas condiciones de higiene, y siempre con productos que garanticen entre otros, la eliminación de hongos (MARM, 2009).

De forma general, el agua de bebida para los animales debe ser agua limpia, con una calidad microbiológica y físico-química adecuada. Se considerará adecuada para el consumo, si cumple las siguientes características:

- Ausencia de malos olores, de sabores extraños, de color y sin turbidez.
- Ausencia de materia orgánica.
- Ausencia de sustancias químicas de síntesis.
- Ausencia de bacterias coliformes totales y de en específico de *Escherichia coli*.

Aunque no exista legislación específica para el agua de bebida en Helicicultura, es cada vez más frecuente que se asuman los límites del recuento de microorganismos establecidos en la legislación del agua para consumo humano, a través del Real Decreto 140/2003, por el que se establecen los criterios sanitarios de la calidad del agua para consumo humano (Llena, 2011).

En relación a los resultados obtenidos a partir de las muestras de agua de red y pozo utilizadas en la granja de estudio, podemos indicar que ambos tipos de agua son aptos bajo el punto de vista microbiológico ya que cumplen los requisitos exigidos por la legislación.

6.1.3. Discusión de los resultados del análisis microbiológico del pienso almacenado

Dado que los alimentos destinados a la nutrición animal constituyen un importante canal de introducción de peligros en la cadena alimentaria humana, debe evaluarse su inocuidad antes de suministrarlos a los animales. Las evaluaciones de la inocuidad son polifacéticas. Suelen contemplar tanto la seguridad de los animales, consumidores directos del pienso, como la seguridad

de los seres humanos, consumidores indirectos de los residuos que pudieran permanecer en los alimentos de origen animal. En algunos casos, se evalúa también el riesgo para las personas que trabajan moviendo o mezclando los piensos y para el medio ambiente (FAO/OMS, 2008). La adopción de medidas de protección, control y corrección junto con la implantación del concepto de calidad en todas las fases de producción deben ser los principales objetivos en la fabricación actual de piensos (Laguna, 2005).

Los resultados obtenidos en nuestro estudio no pusieron de manifiesto diferencias entre los distintos tipos de piensos evaluados, indicando que los distintos aditivos incorporados, tales como ajo, canela, fungicida o el probiótico, no ejercen un control microbiológico de los microorganismos que contaminan el pienso. Para el ajo y canela la concentración presente en estos alimentos es de 1,5% p/p, y para el fungicida 0,1%. Estas concentraciones serían bajas para permitir un control microbiológico. En el caso del ajo y canela, sólo presentarían efectos sensoriales como el olor del pienso, el que a la vez pudiese incorporarse al animal durante la alimentación, como lo reportó Cross *et al.*, (2011), quienes alimentaron pollos con extractos de plantas, aceites esenciales y taninos condensados, hallando que además de efectos fisiológicos sobre estos animales modificó el sabor de la carne.

No existen antecedentes previos de análisis de piensos destinados a la Helicicultura, sin embargo, por el tipo de formulación nutricional del alimento éste sería similar al utilizado en la nutrición de aves, y donde *Salmonella enterica* es el que más destaca por su patogenicidad, según estudios de microorganismos en estos alimentos. Ya a partir del año 1950 se reportaba la transmisión de *S. entérica* (Edwards *et al.*, 1948; Elli, 1968), y hasta las fechas actuales se sigue documentando (Molina *et al.*, 2016). En nuestros resultados este patógeno no fue detectado.

Otros patógenos como *Escherichia coli* se ha reportado en piensos destinados a la nutrición de ganado vacuno, destacando el serotipo *E. coli* O:157 por su importancia de transmisión y patogenicidad en humanos (Lynn *et al.*, 1998). Éste patógeno tampoco fue detectado en los piensos analizados.

Del resto de microorganismos analizados, sólo el pienso fabricado con adición de ajo y canela presenta ausencia de *Clostridium perfringens*. Este microorganismo es un contaminante común de los granos y harinas que se utilizan para la alimentación de los animales. Su presencia en los piensos se ha implicado en brotes de intoxicación por alimentos en animales de granja, lo que resulta en la pérdida de peso, disminución de la reproductividad y muertes (McClane *et al.*, 2006).

En relación a las bacterias ácido lácticas halladas en los análisis de los piensos, los resultados indicaron que el pienso fabricado con ajo, canela y fungicida, fue la única formulación del alimento que contenía la cepa probiótica viable, esto quedó de manifiesto en las concentraciones, debido a que el valor obtenido fue mayor en 3 ciclos logarítmicos en comparación con los otros piensos. Indicando por tanto que la cepa liofilizada presenta estabilidad y resistencia al proceso de fabricación del pienso.

Para *Pseudomonas aeruginosa*, microorganismo descrito como patógeno de caracoles (Martínez, 2001), podemos indicar que éste no fue detectado en los análisis microbiológicos realizados en los piensos.

Otro de los resultados obtenidos, fue la presencia de micobiota, principalmente de hongos miceliares. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Vera *et al.*, (2016) quien evaluó materias primas y piensos destinados a la nutrición animal y donde destaca la presencia de hongos miceliares como *Aspergillus flavus*, *A. niger* y *Fusarium*. La importancia de la presencia de estos hongos, radica en la posibilidad de acumulación de micotoxinas en los alimentos, lo que podría generar micotoxicosis en los caracoles.

6.1.4. Discusión de los resultados del estudio microbiológico de porciones del tracto gastrointestinal de caracoles

Para las porciones del sistema gastrointestinal en los caracoles, los resultados indicaron que, en animales sanos, estas porciones presentan notables diferencias en las concentraciones de microorganismos, y donde la porción anterior (Figura núm. 6) acumularía los valores más elevados. Mientras que en caracoles enfermos y/o con signo de enfermedad, estas concentraciones no indican diferencias entre ambas porciones. Este hallazgo indicaría que los caracoles enfermos presentan una disbiosis o alteración de su microbiota intestinal a lo largo de todo el tracto digestivo.

En general los escasos estudios sobre microbiota intestinal del caracol se han realizado sin la diferenciación de las porciones que comprenden el sistema digestivo del caracol. Sólo en el estudio realizado por Charrier *et al.*, (1998) se evaluó la microbiota de porciones del tracto digestivo. Sus resultados no coinciden con los hallados en nuestro estudio, debido a que estos autores indican que la porción anterior posee mayor concentración de microorganismos que la posterior. En este estudio sólo se analizó la presencia de la Familia *Enterobacteriaceae*, identificando como predominante a la especie *Enterococcus casseliflavus*. La diferencia entre estos resultados puede tener su explicación en el origen de los animales y el tipo de alimentación que reciben, que no es coincidente.

En relación al análisis de la microbiota aislada en las porciones del tracto digestivo, podemos indicar que no existen estudios similares previos, por lo que la información entregada por este estudio, aportaría información microbiológica para esta especie de caracol.

Es interesante destacar el aislamiento de microorganismos anaerobios, entre los que podemos citar cepas de *Clostridium perfringens* en los animales que presentaron signos de enfermedad. Aunque este microorganismo puede ser aislado como parte de la microbiota normal de animales y del hombre, en ciertas ocasiones puede comportarse como un patógeno oportunista. En la producción

ganadera este hecho es de gran importancia por ser el agente causal de enfermedades como la gangrena gaseosa, la enterotoxemia del ovino y del caprino, la disentería del cordero, entre otras (Brown *et al.*, 2007; McClane *et al.*, 2006; Smedley *et al.*, 2004). En moluscos terrestres no existe información de su aislamiento, sin embargo, en moluscos acuáticos (mariscos) su presencia ha sido documentada con anterioridad (Miller *et al.*, 2006; Lévesque *et al.*, 2010).

6.1.5. Discusión de los resultados del análisis microbiológico de heces de caracoles

Los resultados obtenidos evidenciaron la variada microbiota presente en las heces de los caracoles, que coincide con la obtenida en el análisis de las porciones del tracto digestivo de estos animales.

Es interesante indicar que existieron diferencias en las concentraciones de microorganismos halladas entre los animales sanos y aquellos que presentaron signos patológicos. En general los animales enfermos presentan mayores concentraciones de microorganismos, con mayor predominio de integrantes de la Familia *Enterobacteriaceae* y bacterias ácido lácticas.

Pérez (2011) estudió heces de caracoles provenientes de diversas granjas destinadas al engorde, y halló concentraciones de *Enterobacteriaceae* y bacterias ácido lácticas cercanas a 12 Log₁₀ UFC/gr, estos valores serían superiores a los hallados en nuestro estudio, en el que las concentraciones son cercanas a 9 Log₁₀ UFC/gr. Además, es interesante indicar que Pérez (2011) a partir de la microbiota ácido láctica logró identificar una variada presencia de especies de *Lactobacillus*. En nuestro estudio la identificación morfológica a través de la tinción de Gram indicó que las heces presentan principalmente bacterias de morfología cocoide agrupadas en cadenas. Estudios previos de Švec *et al.*, (2002) y de Charrier *et al.*, (1998) indican la presencia de *Enterococcus casseliflavus* como parte de la microbiota de *Helix aspersa*, así también Lesel *et al.*, (1990) indicó la presencia de microbiota Gram positiva

relacionada con el género *Lactococcus*, que representó además el 40% del total de microbiota cultivable en condiciones anaeróbicas.

Simkiss y Watkins (1990) indicaron que "la mayor parte de la microflora del caracol es recogido del ambiente durante la alimentación, sin discriminación, y pueden ser modificados por variables ambientales como el ayuno y la hibernación", esto podría indicar la variabilidad de los resultados en diversos estudios, debido a que el origen y alimentación de los caracoles utilizados como muestras serían distintos.

En el análisis realizado con las porciones del tracto digestivo, en las heces se detectaron asimismo microorganismos anaerobios. Este resultado no ha sido indicado con anterioridad. González-Núñez y Calvo (2015) evaluaron la presencia de anaerobios en caracoles a través de la misma metodología, sin embargo, no hallaron estos microorganismos.

En relación a la presencia de levaduras, nuestros resultados coinciden con los resultados de Pérez (2011), ya que, a partir de muestras de heces de caracoles, aisló tres especies de levaduras (*Candida norvegensis*, *Candida guilliermondii* y *Cryptococcus humicola*). En relación a la presencia de hongos miceliares son resultados novedosos al no existir información previa en la literatura.

En referencia a la existencia de procesos patológicos en los caracoles, podemos indicar que los resultados obtenidos desde las heces, no evidenciaron la presencia de cepas bacterianas que son citadas como desencadenantes de enfermedad en estos animales, entre los que destaca *Pseudomonas aeruginosa* principalmente (Cuellar y Cuellar, 2002). En el caso de la presencia de hongos miceliares destaca la presencia de especies potencialmente toxigénicas por la producción de micotoxinas, como las del género *Aspergillus*.

En relación al estado de salud de los caracoles, Moure *et al.*, (1981) indica que "la selección zootécnica a fin de obtener animales de altas producciones, se ha hecho a expensas de modificaciones en el sistema endocrino de las especies animales correspondientes, lo que condiciona situaciones hormonales límites y muy próximas a lo patológico. Por ello, cualquier influencia banal desencadena

en estos animales seleccionados un verdadero proceso patológico, como consecuencia del fracaso de su sistema defensivo, es decir, de su capacidad de adaptación”; debido a que los resultados no indicaron la presencia de microorganismos citados como perjudiciales, esta afirmación podría indicar que la condición del estado de salud de los caracoles, pudiese estar condicionada directamente por variaciones ambientales sobre componentes bióticos o abióticos involucrados en la crianza intensiva del caracol, tales como fotoperíodo, hibernación, temperatura, humedad, etc.

6.2. MEJORAR LA PRODUCCIÓN DE LA CEPA PROBIÓTICA DESTINADA A LA APLICACIÓN EN CARACOLES

6.2.1. Discusión de los resultados de la evaluación de parámetros de incubación y de modificaciones en la composición del medio de cultivo base

Durante los últimos años, ha habido un creciente interés en la incorporación de bacterias probióticas en los alimentos no lácteos y en el desarrollo de formulaciones liofilizadas para ser utilizadas en aplicaciones nutraceuticas. Por esta razón se pone énfasis en la investigación y desarrollo de tecnologías para mejorar las productividades de fermentación, mejorar la supervivencia celular durante secado y el almacenamiento, y mantener la funcionalidad del probiótico durante todo el proceso (Siaterlis *et al.*, 2009).

En bacterias ácido lácticas, y principalmente en microorganismos probióticos, los estudios de mejora productiva van encaminados principalmente a mejorar la sobrevivencia celular cuando estos son sometidos a los procesos de liofilización y almacenamiento. Generalmente se adicionan componentes nutricionales a lo largo del cultivo de las cepas probióticas, entre los que destacan: aminoácidos, extracto de levadura, o hidrolizados de caseína, ácido ascórbico o L-cisteína (Desai *et al.*, 2004; Lucas *et al.*, 2004; Dave y Shan, 1997).

En la bibliografía se citan que la adición de Tween 80 incrementa la proporción de ácidos grasos insaturados en la membrana celular, hecho que permitiría mejorar la supervivencia de bacterias ácido lácticas después de un proceso de congelación (Goldberg y Eschar, 1997; Gómez-Zavaglia *et al.*, 2000).

El Monooleato de Polioxietileno Sorbitan, o Tween 80 es un aditivo alimentario con acción detergente que emulsiona y disuelve las grasas. Es una sustancia aprobada por la Unión Europea, para uso en Alimentos e identificada

como Emulsificante, (E-433). Es Miscible con agua, acetato de etilo, etanol y metanol. Insoluble en aceites grasos y en parafina, con ácidos y bases fuertes puede dar lugar a saponificaciones (Cimpa S.A.S, 2016).

Debido a que algunas cepas de *Lactobacillus* requieren Tween 80 para su crecimiento, éste se incluye frecuentemente en el medio comercial MRS (de Man *et al.*, 1960). Sin embargo, estudios sobre algunas especies de lactobacilos indican que la presencia de este compuesto puede alterar la morfología celular, afectando directamente a componentes de la membrana celular (Jacques *et al.*, 1980), incluso sobre algunas cepas lácticas, la presencia de este compuesto en el medio influye sobre la resistencia a la congelación (Smitle *et al.*, 1974) y tolerancia a las sales biliares (Kimoto *et al.*, 2002).

Los resultados obtenidos en nuestro estudio indican que no adicionar Tween 80 al medio de cultivo comercial MRS, y llevar a cabo la incubación en condiciones de aerobiosis permiten aumentar considerablemente el proceso productivo para la obtención de biomasa de *Lactobacillus plantarum* Ca7 evaluada en el estudio y fundamentalmente si debe ser liofilizada posteriormente. Este aumento es de aproximadamente 3 ciclos logarítmicos en comparación con lo indicado por Pérez (2011), quien indica que en fase estacionaria la cepa alcanza una concentración aproximada de 9 Log₁₀ UFC/mL.

6.2.2. Discusión de los resultados de evaluar la temperatura de pre-liofilización y su efecto en la concentración de cultivos liofilizados

La congelación es el primer paso a tener en cuenta al liofilizar, dado que, al disminuir la temperatura del sistema, el agua cristaliza y los demás componentes se concentran en los intersticios que se forman entre los cristales de hielo (Levine y Slade, 1988). Según el producto a congelar, la hiperconcentración en los intersticios puede provocar la disminución de las características biológicas, farmacéuticas o nutricionales de las sustancias

presentes, debido fundamentalmente a la proximidad de los electrolitos a las proteínas (Pikal, 1990).

En las liofilizaciones, la congelación de los productos es la etapa principal, dado que interfiere directamente en el aspecto y en las cualidades de los productos finales. No hay una regla general para la fase de congelamiento de todos los productos que pueden ser liofilizados, por lo que se hace necesario determinar experimentalmente cada producto. En muchos casos, cuando una solución acuosa es enfriada, la cristalización del agua se inicia por debajo de su punto de solidificación, en ese instante, en un sistema con falta de nucleación, el producto se podrá tornar muy frío y la cristalización se realizará precipitadamente por un simple choque físico. Si el sustrato a liofilizar es rápidamente enfriado podrán ocurrir formaciones de cristales irregulares que imposibilitarán un secado uniforme (Ramírez-Navas, 2007).

Usualmente, las temperaturas de congelación oscilan entre los $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ y los $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Kasper y Friess, 2011). Para nuestro estudio se evaluó la congelación de la muestra a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ teniendo en cuenta el equipamiento presente en nuestro laboratorio. Los resultados obtenidos indican que la temperatura de congelación previa al proceso de liofilización afecta la supervivencia de la cepa sometida al proceso de liofilización. Cuando la muestra se congela a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ existe una reducción del 9% en relación con la concentración inicial de la muestra. Para la muestra congelada a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ este valor sería de sólo 1%.

6.2.3. Discusión de los resultados de evaluar una condición de estrés para mejorar la estabilidad de cultivos liofilizados en el tiempo

Generalmente las bacterias ácido lácticas en ambientes industriales son sometidas a diversas condiciones de estrés, como baja temperatura, bajo pH, baja actividad de agua, que llevan a un daño de la membrana celular, en la retención de nutrientes, cambios morfológicos, y pérdida de viabilidad (Bâati *et al.*, 2000). Sin embargo, las bacterias han desarrollado estrategias

adaptativas de cara a los desafíos por los cambios medioambientales y sobrevivir bajo condiciones de estrés (Abee y Wouters, 1999). Estas adaptaciones pueden generar un incremento a la resistencia al estrés, o desarrollar una multitolerancia a diferentes fuentes de estrés (Pichereau *et al.*, 2000).

El estrés osmótico puede llevar a la acumulación de humectantes (por ejemplo, una azúcar) o a la síntesis de compuestos osmoregulatorios para mantener el balance osmótico (Bayles y Wilkinson, 2000). Debido a que ambos procesos de congelación y secado exponen las células a condiciones de baja actividad de agua, aparecen mecanismos de adaptación que implican acumulación de compuestos de estrés osmótico (por ejemplo, sacarosa) y permiten mejorar la supervivencia durante los procesos mencionados (Kets *et al.*, 1996).

Los resultados obtenidos indicaron que la cepa es capaz de crecer bajo una condición de estrés salino, siendo 6% la concentración de NaCl que no afecta la supervivencia celular, y que permite además mantener sus propiedades inhibitorias, sólo si la incubación de la cepa se realiza en condiciones aeróbicas.

Aparte de los efectos sobre el crecimiento y la composición de ácidos grasos de la membrana, también se ha reportado que el crecimiento en un medio de alta osmolalidad afectaría la producción de exopolisacáridos (Liu *et al.*, 1998) y bacteriocinas (Uguen *et al.*, 1999) en algunas cepas lácticas. Esto podría relacionarse con la diferencia de los diámetros de inhibición hallados con la cepa Ca7 desarrollada en condición de estrés en comparación con la obtenida en condición habitual, ya que, aunque existió inhibición los halos obtenidos fueron de menor diámetro.

Linders *et al.*, (1997) indicaron que la presencia de NaCl durante el crecimiento de una cepa de *Lactobacillus plantarum* da como resultado, la obtención de una menor actividad de agua residual, después del secado por convección de lecho fluidizado. Así también se han reportado altas tasas de supervivencia durante el almacenamiento de cepas liofilizadas, cuando éstas se incuban previamente en MRS suplementado con NaCl (Carvalho *et al.*, 2003). Otros estudios (Glaasker *et al.*, 1998; Gouesbet *et al.*, 2001) han indicado que el

estrés por sacarosa y NaCl en cepas de *Lactobacillus plantarum* y *L. bulgaricus* no acumularon compuestos en respuesta al estrés osmótico.

En nuestros resultados, la evaluación de estabilidad de la cepa desarrollada en condición de estrés y posteriormente liofilizada indica que el almacenamiento de los cultivos liofilizados a temperatura de refrigeración permite mejores tasas de supervivencia en comparación al almacenamiento a temperatura ambiente, sin embargo, estos resultados son similares a los hallados para liófilos provenientes de la cepa sin condición de estrés después de 60 días de almacenamiento.

Con estos resultados la condición de estrés no sería la ideal debido a que el comportamiento principalmente en el almacenamiento a temperatura ambiente no sería el esperado si la aplicación de la cepa se lleva a cabo en condiciones de temperatura ambiental.

6.2.4. Discusión de los resultados de evaluar la maltodextrina como alternativa a la leche descremada como crioprotector

La maltodextrina, es una dextrina (azúcar) obtenida a partir de la hidrólisis del almidón proveniente del maíz, y está compuesto por una mezcla de varios oligómeros de glucosa, compuestos por 5 a 10 unidades (Kennedy *et al.*, 1995). Es conocida la incorporación de maltodextrina como *carrier* en el proceso de secado *spray* de polvos higroscópicos como polvos de jugo de fruta y fórmulas infantiles (Goula *et al.*, 2004; Kurozawa *et al.*, 2009; Kothakota *et al.*, 2014).

Son diversos los estudios de secado de cepas lácticas donde se ha utilizado la maltodextrina como *carrier* durante este proceso. Castro *et al.*, (1996) utilizaron maltodextrina al 11% durante la liofilización de una cepa de *Lactobacillus bulgaricus* encontrando que a pesar de su uso igualmente existe daño en la membrana celular de la bacteria. Semyonov *et al.*, (2010) evaluaron la microencapsulación en maltodextrina y trealosa sobre una cepa de

Lactobacillus paracasei sometida al proceso de secado *spray*, hallando sobrevivencias del 60% posterior al proceso. Oldenhof *et al.*, (2005) evaluaron el secado de una cepa de *L. bulgaricus*, hallando que la mezcla de maltodextrina (5%) y sucrosa (5%) obtuvo las mejores tasas de supervivencia (7,8%) en comparación al uso de otros protectores, cuando la cepa es sometida al proceso de secado por aire.

Reddy *et al.*, (2009) hallaron que el uso de maltodextrina como *carrier* para el proceso de secado *spray* de cepas de *L. plantarum* y *L. salivarius* permite obtener buenos índices de supervivencia (55%) en comparación con el uso de leche descremada (50%), a los 60 días de evaluación, y cuando el almacenamiento se realizó a 4°C y 30°C. Además, indicaron que, aunque la leche descremada permite obtener buenos porcentajes de supervivencia, este crioprotector afecta propiedades funcionales del probiótico evaluado.

Nuestros resultados indicaron que la cepa *L. plantarum* Ca7 posee una supervivencia del 70% a los 60 días, independiente del tipo de almacenamiento empleado. Sin embargo, la curva obtenida no indicaría una fase de estabilidad, la pendiente indica que a lo largo del tiempo la reducción iría en aumento, en comparación a nuestros resultados obtenidos por el uso de leche descremada en el proceso de liofilización donde si se observa una estabilidad. Aun así, el valor de supervivencia de nuestro estudio es muy superior al obtenido por los estudios indicados anteriormente (Semyonov *et al.*, 2010; Oldenhof *et al.*, 2005; Reddy *et al.*, 2009).

6.3. MODIFICACIÓN Y EVALUACIÓN DE NUEVAS VÍAS DE ADMINISTRACIÓN DEL PROBIÓTICO EN GRANJAS DE CARACOLES

6.3.1. Discusión resultados de la producción de la biomasa destinada al pienso

Los estudios previos sobre la cinética de crecimiento de *Lactobacillus plantarum* Ca7 realizados por Pérez (2011) determinaron que la concentración máxima que alcanza la cepa es de 9,8 Log₁₀ UFC/mL obtenida a las 16 horas de incubación. Este valor de concentración es menor al obtenido en nuestro estudio, superándolo en $2 \pm 0,2$ ciclos logarítmicos. Entre ambos procedimientos el factor determinante sería la presencia de Tween 80 en el medio de cultivo tradicional MRS.

Asimismo, el concentrar cuatro veces la biomasa en el crioprotector permite obtener a la vez cultivos liofilizados con una mayor concentración, con valores de 13 Log₁₀ UFC/ml, que superan en 1 ciclo logarítmico a lo obtenido finalizada la incubación, y que además tienen buena estabilidad en el tiempo si estos son conservados a temperatura de refrigeración (5°C). En cambio, si la conservación se realiza a temperatura ambiente existe disminución de la viabilidad.

Esta respuesta de disminución en la concentración es perjudicial si se considera su incorporación al alimento de los caracoles. Pérez (2011) evaluó un pienso con adición de la cepa probiótica, hallando que a los tres meses existe una pérdida de 5 ciclos logarítmicos, en relación a la concentración inicial, mientras que nuestro estudio se determinó que existe una reducción de viabilidad de aproximadamente 3 ciclos logarítmicos.

Considerando esta baja en la concentración de la cepa incorporada al pienso, se hace necesario aumentar la concentración inicial hipotética, ya que para nuestro estudio se consideró una concentración de 9 Log₁₀ UFC/gr, y

posterior a la preparación del pienso en una fábrica destinada para este propósito, la concentración disminuyó 1,2 ciclos logarítmicos, probablemente por la existencia de factores presentes como parte del proceso de fabricación.

6.3.2. Discusión de los resultados de la estabilidad a temperatura ambiente de la cepa probiótica liofilizada

Estudios previos de almacenamiento de cultivos lácticos liofilizados (Teixeira *et al.*, 1995; Gardiner *et al.*, 2000; Abadias *et al.*, 2001a) indican que la temperatura es un parámetro crítico para la sobrevivencia celular en líofilos que son almacenados en el tiempo. La estabilidad de la concentración del microorganismo disminuye durante el almacenamiento, y es posible obtener altas tasas de sobrevivencia si el este se realiza a bajas temperaturas. Además de estos factores, las condiciones de almacenamiento, que incluyen la temperatura, atmósfera, exposición a luz y humedad relativa parecen ser muy importantes en la recuperación de las células liofilizadas (Abadias *et al.*, 2001b). Asimismo, ha sido demostrada (Castro *et al.*, 1996; Teixeira *et al.*, 1996) la existencia de cambios en perfil lipídico durante el almacenamiento de cultivos liofilizados de *Lactobacillus bulgaricus*, esto sugiere la existencia de una oxidación en la membrana lipídica.

Con el fin de prevenir o reducir por ejemplo el fenómeno oxidativo, y lograr incrementar la sobrevivencia durante el almacenamiento, los cultivos liofilizados pueden ser guardados bajo condiciones de vacío (Castro *et al.*, 1995) o condiciones que permitan controlar la actividad del agua (Teixeira *et al.*, 1995b).

Nuestros resultados indicaron una reducción del 30% durante el almacenamiento a temperatura ambiente de los cultivos liofilizados preparados a partir de *L. plantarum* Ca7. Castro *et al.*, (1995) evaluó la sobrevivencia de cultivos de *L. bulgaricus* almacenados a 20°C durante tres meses a diferentes porcentajes de humedad relativa, indicando que a un 11% existe una reducción del 22% frente a una reducción total si la humedad es de 59%. Esto indica la

importancia de considerar este factor durante el almacenamiento, recordando además que las naves de reproducción y engorde de caracoles necesitan una alta humedad para la mantención de los animales.

6.3.4. Discusión de los resultados de la administración de la cepa a caracoles mediante la incorporación en el agua de riego

Lograr una buena administración del probiótico, en términos de concentración de microorganismos, es crucial para lograr asegurar su efecto beneficioso. A título orientativo, la Federación Internacional de Lechería o la Asociación Japonesa para los Derivados Lácteos recomiendan 1×10^7 UFC/ml en matrices líquidas (Vidal, 2006). Se han descrito casos de grandes pérdidas de viabilidad, hallando concentraciones menores a 1×10^3 UFC/ml en matrices líquidas o menores a 1×10^6 UFC/g en alimentos que incorporan probióticos, y por lo tanto invalidarían el efecto funcional del probiótico (Tamime, 2002).

El agua, en Helicicultura, se utiliza para el riego e hidratación de los animales. En las salas de engorde el agua es almacenada en estanques y administrada a través del uso de aspersores. Esta agua puede obtenerse de la red de suministro o a partir de pozos.

Los resultados obtenidos al diluir un cultivo *overnight* en los tipos de agua a concentración inicial de 1×10^9 UFC/mL indicaron que la sobrevivencia de *Lactobacillus plantarum* Ca7 después de 7 horas es cercana al 80% en el agua de red y de 85% para el agua de pozo. Este hecho para su aplicación en la granja helicícola es ventajoso debido a que, aunque existe disminución, la concentración es óptima para su aplicación en los caracoles, además podemos considerar que además del contenido celular, la mezcla incorporaría parte de los metabolitos producidos por la cepa probiótica. Pérez (2011) evaluó la administración de la cepa Ca7 en agua destinada al riego de caracoles, determinando además la viabilidad a través del tiempo. En sus resultados indica que la cepa se mantiene estable por 7 días. La diferencia con nuestro estudio se

basa en que la concentración inicial de la solución la realizó a partir del *pellet* bacteriano obtenido por centrifugación, alcanzando concentraciones de 1×10^{11} UFC/ml.

6.3.5. Discusión de los resultados de la estabilidad del cultivo reciente en el sistema de agitación

Siguiendo con la búsqueda de alternativas para la administración de *Lactobacillus plantarum* Ca7, y en base a los resultados de estabilidad del probiótico en agua de red y pozo, se propuso la utilización de un sistema de agitación que contuviera una concentración elevada de cultivo de la cepa Ca7 (10 Litros) y que homogenizara la solución, para posteriormente mezclar alícuotas del probiótico con el agua de riego y administrar a los caracoles.

Los resultados obtenidos indicaron una buena estabilidad del cultivo durante los cinco días de análisis, y también una buena estabilidad durante 4 horas si el cultivo es mezclado con el agua para el riego.

En general la presentación comercial de los probióticos es en forma de un producto granulado seco, por lo que su aplicación puede ser directa en el alimento o diluida en agua utilizada en los bebederos. Los productos probióticos que se presentan en solución generalmente incorporan cepas del género *Bacillus*, que poseen la ventaja de alta persistencia en el tiempo por la formación de esporas, en comparación con probióticos preparados con especies del género *Lactobacillus* (Mazza, 1994).

En nuestra revisión bibliográfica no existe información previa de la utilización de cultivos recientes con especies de *Lactobacillus* spp., por lo que los resultados obtenidos y la utilización de una máquina que permite homogenizar el contenido probiótico es novedoso. Lo interesante y positivo de

este tipo de administración es que se evitaría el paso por el proceso de liofilización de la cepa, que a la vez incrementa los costos de producción.

6.3.6. Discusión de los resultados de la estabilidad del cultivo liofilizado en el sistema de agitación

Como otra alternativa para la administración del probiótico en la granja, se evaluó el uso de cultivos liofilizados preparados en base láctea y en maltodextrina de la cepa Ca7, para preparar distintas soluciones a diferentes proporciones. Inicialmente el ensayo se llevó a cabo en el laboratorio, obteniendo resultados que indicaron buena viabilidad en el tiempo de una solución a proporción 1:10. La solución preparada con liófilos de base láctea redujo su concentración en 13%, mientras que la preparada con maltodextrina lo redujo un 27% a los cuatro días de evaluación.

Posteriormente en la granja helicícola se replicó la experiencia llevada a cabo en laboratorio, incorporando además otras proporciones para la solución de la máquina de agitación. En granja, al inicio los resultados correspondieron a los obtenidos en laboratorio para la dilución 1:10, sin embargo, transcurrido el tiempo la viabilidad de la cepa disminuyó considerablemente un 70% a los 5 días. Los resultados del agua de riego sólo serían óptimos para su uso como probiótico hasta las 24 horas. Para el resto de proporciones ensayadas, la 1:20 es óptima a usar, si la mezcla con el agua de riego se realiza inmediatamente.

A pesar de que *in situ* se obtienen resultados favorables para el uso de la cepa, los análisis microbiológicos indicaron que la solución mantenida en la máquina y el agua de riego sufren contaminación pasada 24 horas, con presencia de *Escherichia coli*, bacterias anaeróbicas y levaduras que podrían generar problemas sanitarios sobre los caracoles por ser una fuente de contaminación.

En granjas de otras especies de animales, la contaminación del agua de bebederos ha sido documentada previamente (Fairbrother y Nadeau, 2006; Goss *et al.*, 1998; Jafari *et al.*, 2006; Refregier-Petton, 2001; Palomo-Rodríguez *et al.*, 2014) indicando que pueden predominar microorganismos como *Escherichia coli*, *Campylobacter* y *Salmonella*, generando un riesgo en la salud de los animales de la explotación ganadera, y/o en la salud de los consumidores.

El Real Decreto 140/2003 de febrero de 2003 describe los criterios sanitarios de la calidad del agua, aún así no existe una normativa específica para el agua destinada a ganadería. Es por ello que, si bien los criterios de calidad en explotaciones ganaderas deben estar próximos a la potabilidad (Rubio, 2005).

También es importante controlar la calidad del agua que se utiliza en las explotaciones, ya que cumple unas funciones primordiales: aporte de nutrientes, aplicación de tratamientos, limpieza de las instalaciones, etc. A sus propiedades fisicoquímicas, consecuencia de la composición de los suelos que atraviesa, hay que añadir los contaminantes fecales derivados de la propia actividad ganadera y otras actividades. Estas características junto con la formación del biofilm en los conductos del agua, hacen necesario la correcta desinfección de la estructura de tuberías de conducción para un buen control sanitario de la explotación (Rubio, 2005).

6.4. EVALUAR ALTERNATIVAS PARA EL CONTROL DE CONTAMINACIÓN MICROBIOLÓGICA

6.4.1. Discusión de los resultados de la capacidad inhibitoria de sobrenadante procedente del cultivo

La producción de algunos metabolitos con propiedades antimicrobianas por bacterias probióticas puede ser beneficioso para la preservación de alimentos y la prevención del crecimiento de patógenos que son transmitidos por los alimentos (Bernet-Camard *et al.*, 1997; Dunne *et al.*, 2001). Asimismo, esta capacidad de inhibir patógenos es considerada como una de las propiedades benéficas para la selección de microorganismos con potencial probiótico (Saarela *et al.*, 2000; Papadimitriou *et al.*, 2015).

Dentro de los estudios que demuestran el efecto antagónico de bacterias ácido lácticas frente a diversos microorganismos patógenos encontramos el realizado por Godiosa *et al.*, (1993) quienes encontraron actividad antibacteriana frente a *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis* y *Shigella dysenteriae*; Reque *et al.*, (2000) evaluó la actividad frente a *E. coli* y *S. typhi*; Asahara *et al.*, (2001) hallaron actividad antimicrobiana en *Lactobacillus casei* frente a *E. coli* e indicaron que cepas de *L. fermentum* y *L. plantarum* no presentaron actividad significativa; Chuayana *et al.*, (2003) indicaron que una cepa de *L. casei* posee una acción bacteriostática muy marcada frente a *E. coli* y *S. typhi*.

Otros estudios se han basado en la determinación de los diámetros de inhibición incluyen el de Oyetayo *et al.*, (2003). En su estudio evaluaron la actividad antimicrobiana de cepas de *L. casei* y *L. ácidophilus* frente a *E. coli*; Nowroozi *et al.*, (2004) estudiaron la actividad de cepas de *L. plantarum* y *L. ácidophilus* frente a *S. typhi*; Erdogrul y Erbilir (2006) evaluaron la actividad antimicrobiana de *L. bulgaricus* y *L. casei* frente a *E. coli*.

Las bacterias probióticas producen una variedad de sustancias que poseen propiedades antibacterianas y antifúngicas (Wang *et al.*, 2012; Tsai *et al.*, 2008; Mauch *et al.*, 2010), estas sustancias incluyen ácidos orgánicos, ácidos grasos de cadena corta, peróxido de hidrogeno, reuterina, diacetil, y bacteriocinas y sustancias inhibitorias tipo bacteriocinas, que no sólo pueden afectar la viabilidad bacteriana, sino que también pueden afectar el metabolismo o la producción de toxinas de otros microorganismos (Vandenberh, 1993; Holzapfel *et al.*, 1995; Ouwehand y Salminen, 1998; Rolfe, 2000; Shah y Dave, 2002).

Nuestros resultados ponen de manifiesto el efecto antimicrobiano sobre cinco cepas patógenas de origen ambiental (Tabla núm. 25). *Lactobacillus plantarum* Ca7 presentó un efecto antimicrobiano tanto a partir de sobrenadante obtenido por filtración del cultivo, como del sobrenadante concentrado por liofilización. Tal como se puede deducir, la capacidad inhibitoria aumentó a medida que la concentración del liofilizado aumenta, y la cepa de *Pseudomonas aeruginosa* utilizada mostró ser altamente susceptible a los metabolitos producidos por nuestra cepa probiótica.

6.4.2. Discusión de los resultados de evaluar incorporar el sobrenadante al proceso de liofilizado de la cepa probiótica como adyuvante al control de microorganismos patógenos en el pienso

Los resultados obtenidos, indicaron que es posible incorporar a la biomasa probiótica liofilizada una alícuota del sobrenadante liofilizado. La proporción de 2 partes de crioprotector y cepa, y 1 parte de sobrenadante (2:1) indicó ser la que no afecta la concentración de la cepa Ca7 posterior al liofilizado.

Los estudios previos de liofilización de, únicamente, la porción sobrenadante del cultivo bacteriano indicó que el producto obtenido es altamente higrofilo, y de difícil recuperación del vial (Fotografía núm. 13), posiblemente por componentes del sobrenadante que a la temperatura del proceso utilizado en la liofilización no son las óptimas. Por ejemplo, (Franks, 1992) indica que la

determinación de la temperatura es crítica en un proceso de liofilización ya que esto permite monitorear el proceso de modo tal que el aspecto del producto obtenido sea el mejor, y lograr asegurar la estabilidad durante el almacenamiento. Algunos de los componentes, al concentrarse durante la congelación, pueden cristalizar formando eutécticos y otros se mantienen líquidos, llegando a solidificar en estado amorfo (Levine y Slade, 1988).

Tras la incorporación del sobrenadante al crioprotector, se logró obtener después del proceso de liofilizado un producto no higrofilo, y de buena estabilidad en el tiempo si se almacena a temperatura de refrigeración. Esta buena respuesta del sobrenadante posiblemente se debió a la acción de la porción de los aditivos presentes en la formulación del crioprotector (leche descremada y sacarosa). Estos aditivos o crioprotectores son sustancias que se añaden con el objetivo de mejorar las características del producto durante el proceso de liofilización y/o el almacenamiento. Se conoce que los azúcares, polioles, algunas sales, aminoácidos y sustancias proteicas son capaces de cumplir con estos objetivos. De ellas, el grupo más estudiado ha sido el de los carbohidratos y sus derivados (Moreira *et al.*, 1994). En el campo de los productos farmacéuticos y de los biopreparados, existen aditivos como el manitol, llamados de carga, cuya función esencial es aparentar la presencia de mayor cantidad de sustancia activa y brindar mejor aspecto al producto final (Hora *et al.*, 1992; Cárcoba y Rodríguez, 2000).

Otro aspecto importante de este producto liofilizado, es la actividad antimicrobiana presente. Estas características añaden otra propiedad al producto si es aplicado directamente en piensos destinados a la alimentación de caracoles o para otros animales.

6.4.3. Discusión de los resultados de la capacidad de formación de biopelículas

Los resultados indicaron que *Lactobacillus plantarum* Ca7 no posee capacidad de formación de biopelículas en una superficie plástica. Sin embargo, estos resultados no excluyen su potencial adhesión, debido a que ya el origen intestinal de esta cepa indica que es capaz de adherirse al tejido intestinal del caracol.

Son pocos los estudios que indican la capacidad de bacterias ácido lácticas para formar biopelículas en matrices. Lebeer *et al.*, (2007) reportaron que la cepa *L. rhamnosus* GG es capaz de formar biopelículas en superficies abióticas, en contraste con cepas de *L. casei* bajo las mismas condiciones. Esta formación de biopelícula está fuertemente modulada por factores del medio de cultivo y condiciones relacionadas con el ambiente gastrointestinal, que incluyen el pH, una alta osmolaridad, la presencia de bilis, de mucinas, y de algunos polisacáridos.

6.4.4. Discusión de los resultados de la capacidad de disrupción y/o inhibición de formación de biopelículas.

Los resultados indicaron que el sobrenadante obtenido por filtrado del cultivo, y el concentrado por liofilización (5X y 10X) es capaz de inhibir la formación del biofilm de *Staphylococcus aureus*. Debido a que en este experimento el microorganismo y el sobrenadante son añadidos al mismo tiempo a la placa de microtitulación, la acción antibacteriana de los metabolitos del probiótico es inmediata, por esta razón los resultados ponen de manifiesto que existe una inhibición del patógeno, impidiendo su desarrollo y adhesión a la superficie.

Mientras que, cuando el biofilm ya se encuentra formado por el microorganismo patógeno (biopelícula madura) se evidenció la mayor capacidad inhibitoria por parte del sobrenadante no concentrado (1X), en comparación con las otras condiciones. Debido a alta capacidad inhibitoria del sobrenadante concentrado puesta de manifiesto en el ensayo inhibición en placa, se esperaba la misma relación en este ensayo de disrupción de biofilm, sin embargo, los resultados mostraron que el sobrenadante sin concentrar posee la capacidad de romper un biofilm maduro. Esto puede deberse a que el proceso de liofilización afectaría a algún metabolito presente en el sobrenadante, y que posee la capacidad de romper al menos un 30% del biofilm.

Muñoz-Quezada *et al.*, (2013) indicaron que las condiciones de incubación afectan a la capacidad inhibitoria del sobrenadante, donde la extensión de la incubación de cultivo puede servir para concentrar las sustancias inhibidoras, lo que sugiere que la concentración del sobrenadante después de un menor número de horas de cultivo puede no ser lo suficientemente alta para inhibir el crecimiento de enteropatógenos. Indicando así que la acción del sobrenadante podría variar según las condiciones de obtención a partir de la cepa probiótica.

6.4.5. Discusión de los resultados de evaluar concentraciones óptimas de antifúngicos y acidificantes para su aplicación en piensos de caracoles.

Uno de los tipos de contaminación en los alimentos destinados a la nutrición animal, es la producida por los hongos. Determinadas especies de los géneros *Aspergillus* y *Fusarium*, son responsables de infecciones e intoxicaciones, no sólo de caracoles sino en gran diversidad de animales domésticos y salvajes (Ainsworth y Rewell, 1949; Pier, 1973; Arné *et al.*, 2011; Gulland, 1995; Antonissen *et al.*, 2014). Algunas cepas al contaminar los piensos producen una serie de micotoxinas entre las que destacan las aflatoxinas y fumonisinas, que son capaces de desencadenar necrosis hepática, procesos cancerígenos e incluso una muerte rápida, en función de la dosis ingerida

(Cullen y Newberne, 1994; Calvo, 2008). En estudios anteriores quedó de manifiesto la presencia de este género en los análisis de los piensos de caracoles, identificando cepas de *Aspergillus flavus*, *A. niger* y *Fusarium* spp.

Para el control de hongos miceliares en el pienso, la aplicación de compuestos con capacidad antifúngica es una práctica habitual en la fabricación de piensos comerciales. Es así como dentro de la amplia gama de alimentos ofrecidos en el mercado, los productores de pienso indican la presencia de estos compuestos en su etiquetado.

Entre los compuestos con propiedades antifúngicas y bactericidas, encontramos a los ácidos orgánicos. Estos han sido utilizados durante muchos años por la industria como preservantes de materias primas y como acidificantes en piensos. Su uso en Europa es extenso (Mateos y Jiménez, 1998), principalmente por la restricción del uso de antibióticos en alimentos destinados a la nutrición animal. Los más utilizados como conservantes son el ácido fórmico (fuerte bactericida) y el ácido propiónico (potente antifúngico). Como acidificantes los de mayor uso actual son el ácido cítrico y el fumárico. Otros ácidos de uso creciente son el acético, láctico, sórbico, málico y combinaciones. Todos ellos combinan las propiedades conservantes y acidificantes. Los ácidos orgánicos son metabolizados de forma eficiente por el organismo animal liberando cantidades importantes de energía que debe ser valorada en la formulación del alimento (Mateos y Jiménez, 1998, Ricke, 2003; Van Immerseel *et al.*, 2006).

Si bien los piensos desarrollados previos a esta investigación incluyen la adición de compuestos con propiedades antifúngicas, los análisis de microbiota igualmente indicaron la presencia de estos microorganismos, por lo que se hizo necesario evaluar a través de un ensayo, la respuesta frente a la adición de compuestos con capacidad antimicrobiana y que a la vez no afectaran al probiótico que se incorpora al alimento. Los resultados obtenidos, indicaron que ninguno de los productos ensayados posee efecto antimicrobiano sobre la cepa Ca7, debido principalmente a que la naturaleza ácida de los compuestos no afecta a la cepa seleccionada, debido a su ácido-tolerancia, propiedad que poseen en general las diferentes cepas de *Lactobacillus*.

Sobre la respuesta de los hongos inoculados en el pienso, podemos indicar que la mejor respuesta se obtuvo con la mezcla de los acidificantes (APSACID ®, y FORTACID ®) y el fungicida BIOBAC ®, ya que las concentraciones halladas son más cercanas al control negativo en comparación a los otros tratamientos. Mientras que, para los microorganismos procariotas, la mejor respuesta a las 48 horas las ejercería el acidificante FORTACID ® añadido al pienso.

Es interesante indicar que con el tratamiento UV realizado sobre el pienso, igualmente se detectó crecimiento fúngico y bacteriano, evidenciando la alta resistencia de estos microorganismos al tratamiento.

6.5. EFECTO EN CARACOLES DE LA ADMINISTRACIÓN DE *Lactobacillus plantarum* Ca7 A ESCALA DE LABORATORIO

6.5.1. Discusión de los resultados de la evaluación en laboratorio del efecto probiótico de distintas preparaciones de pienso sobre el crecimiento de caracoles provenientes de granjas

De los distintos tipos de pienso evaluados indicar que el pienso con nueva formulación, y que incorpora un acidificante, fungicida, la cepa probiótica, ajo y canela genera un mayor crecimiento de la concha en caracoles de un año de vida. Mientras que en caracoles de tres meses el pienso, el mayor crecimiento del diámetro de la concha lo presentaron tras la alimentación con pienso preparado con fórmula antigua, acidificante y fungicida. Las diferencias entre fórmulas de piensos, son principalmente que el pienso nuevo incorpora 5% de harina de alfalfa como otra fuente de proteína.

La alfalfa es una leguminosa forrajera que se utiliza fundamentalmente para aportar proteína de gran calidad, macrominerales, microminerales y vitaminas de forma natural a la ración del ganado. Además, es una fuente importante de fibra efectiva, muy necesaria para animales rumiantes y herbívoros (Putnam *et al.*, 2001). En estudios sobre conejos, esta fibra incorporada en piensos indicó mejores índices reproductivos (Nizza *et al.*, 2010) y mejores balances energéticos corporales en conejos en etapa de lactación (Xiccato *et al.*, 1999). Dentro de los componentes de la alfalfa se encuentra el cumestrol, que algunos autores lo describen como promotor de crecimiento o reproductivo cuando es incorporado a la alimentación de algunas especies de animales (Oldfield *et al.*, 1966; Stob *et al.*, 1968; Markaverich *et al.*, 1995).

Otro aspecto importante evaluado fue la mortalidad. Podemos destacar que los caracoles de un año que se alimentaron con el pienso preparado con la formulación nueva más la adición de fungicida presentaron índices de mortalidad

del orden del 50% una vez finalizada la experimentación. Para este pienso, la evaluación microbiológica indicó que las concentraciones de microorganismos de la Familia *Enterobacteriaceae* y de bacterias aerobias mesófilas son más elevadas, aproximadamente un ciclo logarítmico, en comparación con los otros dos piensos. Comparando los resultados obtenidos con el pienso que incorpora la cepa probiótica, podríamos decir que el probiótico ejerció un efecto protector sobre los animales.

Fisiológicamente fue interesante observar la alta tasa de crecimiento de los animales de menor edad, posiblemente debido a que durante los primeros meses de vida el caracol sólo dedica su energía al crecimiento, en comparación con animales de tamaño adulto que además de su desarrollo, destinan parte de su energía a la reproducción (García, 2003).

En relación a los resultados microbiológicos de las heces de los animales, para los dos grupos de caracoles alimentados con los tres tipos de pienso, no se observaron notables diferencias entre los tres grupos en el caso de cepas de *Enterobacteriaceae* totales, coliformes, bacterias aerobias mesófilas, y bacterias ácido lácticas. Mientras que en hongos miceliares si observa variación, con una tendencia a la disminución.

En comparación con caracoles mantenidos en granjas, los resultados del análisis microbiológico de las heces indican similitud en las concentraciones de *Enterobacteriaceae* totales, coliformes, aerobios mesófilos, bacterias ácido lácticas y presencia de hongos. Sólo se puede evidenciar una clara diferencia en la presencia de *Clostridium perfringens*, dado que en los caracoles de granjas su presencia es habitual, y en este ensayo sólo se detectó de forma muy puntual. Este resultado permite indicar que este *C. perfringens* no forma parte de la microbiota del caracol, sino que su presencia en el tracto digestivo dependería de la calidad del pienso.

7.CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos podemos aportar las siguientes conclusiones:

1. La contaminación hallada en la nave destinada a la reproducción de caracoles, está relacionada principalmente con los microorganismos de la Familia Enterobacteriaceae existente en la microbiota intestinal de los caracoles. Esta microbiota se modifica especialmente si el caracol consume pienso contaminado, adquiriendo bacterias anaerobias y hongos filamentosos.
2. La condición del estado de salud del caracol está condicionada por las variaciones ambientales sobre componentes bióticos o abióticos asociados a la crianza intensiva del caracol.
3. La producción de *Lactobacillus plantarum* Ca7, se incrementa notablemente, si al medio de cultivo tradicional MRS no se le adiciona Tween 80, y la incubación se lleva a cabo en condiciones de aerobiosis.
4. Tras el proceso de liofilización, la supervivencia de la cepa Ca7 se mantiene estable a lo largo de 2 meses tras un proceso de congelación a -20°C previo a la liofilización y posterior almacenamiento a 5°C cuando se utilizar leche descremada y sacarosa como crioprotector (3:1). Mantener las cepas liofilizadas a temperatura ambiente, someterlas a estrés salino antes de la liofilización, y/o utilizar maltodextrina y sacarosa (12:5) como crioprotector no favorecen su viabilidad.
5. El proceso de elaboración del pienso y su posterior almacenamiento a temperatura ambiente en las granjas, afectan negativamente la supervivencia de *Lactobacillus plantarum* Ca7.
6. Para el cultivo en agitación es preferible partir de cultivos no liofilizados y mezclarlos con agua de pozo para el riego de los caracoles, alcanzándose una correcta estabilidad del cultivo a lo largo de cuatro días.

7. *Lactobacillus plantarum* Ca7 no posee propiedades de adhesión al poliestireno, tras su desarrollo en caldo MRS. El sobrenadante liofilizado o no, presenta capacidad inhibidora de la adhesión de *Staphylococcus aureus* a superficies e inhibe el crecimiento de microorganismos patógenos de importancia en salud animal y humana, en los que se incluye *Pseudomonas aeruginosa*, citado como el principal microorganismo causante de patologías en caracoles.
8. La adecuada liofilización del sobrenadante de *L. plantarum* Ca7 se favorece por la incorporación de crioprotector, sin perder su capacidad inhibidora. Asimismo, la adición de un producto liofilizado que contenga la cepa, así como sus metabolitos contribuye a mejorar la calidad microbiológica del pienso.
9. En estudios de laboratorio, la alimentación con piensos de distinta formulación del grupo de caracoles de 3 meses de edad permite obtener tasas de crecimiento más elevadas que en el grupo de 1 año de edad. La adición de la cepa probiótica al pienso, evita mortalidad, modifica favorablemente la microbiota en caracoles de 3 meses, y permite mejorar la calidad microbiológica del pienso.
10. La adición al pienso de ajo y canela a concentración inferior a 1,6% no controla la presencia de microorganismos contaminantes en el pienso ni los presentes en las heces de los caracoles.

En definitiva, podemos concluir que la administración a caracoles de *L. plantarum* Ca7 y el uso de su sobrenadante para el control de microorganismos contaminantes presentes en Helicicultura, son capaces de mejorar el estado sanitario de este tipo de explotaciones, a través de la prevención de patologías de origen microbiano, modificación de la microbiota intestinal, y mejora de la calidad microbiológica del pienso. Estos efectos conllevan a una mejora productiva durante la crianza del caracol, y entregan un valor agregado al producto final, con el consecuente impacto en su comercialización.

8. BIBLIOGRAFÍA

- **Abadias M, Benabarre A, Teixidó N, Usall J, Viñas I.** Effect of freeze-drying and protectants on viability of the biocontrol yeast *Candida sake*. Int J Food Microbiol. 2001; 65:173-182.
- **Abadias M, Teixidó N, Usall J, Benabarre A, Viñas I.** Viability, efficacy, and storage of freeze-dried biocontrol agent *Candida sake* using different protective and rehydration media. J Food Prot. 2001; 64(6): 856-861.
- **Abee T, Wouters J.** Microbial stress response in minimal processing. Int J Food Microbiol. 1999; 50:65–91.
- **Ainsworth GC, Rewell RE.** The incidence of aspergillosis in captive wild birds. J Comp Pathol Ther. 1949; 59: 17-224.
- **Alvarado J.** Principios de Ingeniería Aplicados a Alimentos. Ed. Radio Comunicaciones OEA. Quito; 1996. p. 469-82.
- **Álvarez A. Corrales A. Granda M, Miranda M, Méndez G, González-Quevedo M.** Plantas medicinales. En: Fitomed. 1ª ed. La Habana: Editorial Ciencias Médicas; 1991. p. 12-3.
- **Amonkar SV, Banerji A.** Isolation and characterization of larvicidal principle of garlic. Science. 1971; 174(4016): 1343-1344.
- **ANCEC. Asociación Nacional de Cría y Engorde del Caracol.** Helicicultura sostenible. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. 1ed. Madrid; 2007.
- **Antonissen G, Martel A, Pasmans F, Ducatelle R, Verbrugghe E, Vandenbroucke V, Li S, Haesebrouck F, Van Immerseel F, Croubels S.** The impact of *Fusarium* mycotoxins on human and animal host susceptibility to infectious diseases. Toxins. 2014; 6(2): 430-452.

- **Ariga T, Seki T.** Antithrombotic and anticancer effects of garlic-derived sulfur compounds: A review. *Biofactors*. 2006; 26(2): 93-103.
- **Arné P, Thierry S, Wang D, Deville M, Loc'h L, Desoutter A, Féménia F, Nieguitsila A, Huang W, Chermette R, Guillot J.** *Aspergillus fumigatus* in poultry. *Int J Microbiol*. 2011:1-14.
- **Arrébora JR, Álvarez RM.** La explotación de los caracoles terrestres en España: Aspectos ecológicos y socioculturales [internet]. *Temas de antropología aragonesa*, 2001(11):139-172. [consultada el 20 de julio de 2016]. Disponible en: <http://bio-nica.info/Biblioteca/Arrebola2001.pdf>.
- **Asahara T, Nomoto J, Watanuki M, Yokokura T.** Antimicrobial activity of intraurethrally administered probiotic *Lactobacillus casei* in a murine model of *Escherichia coli* urinary tract infection. *Antimicrob Agents and Chemother*. 2001; 45:1751-1760.
- **Bâati L, Fabre-Gea C, Auriol D, Blanc PJ.** Study of the cryotolerance of *Lactobacillus acidophilus*: effect of culture and freezing conditions on the viability and cellular protein levels. *Int J Food Microbiol*. 2000; 59:241–47.
- **Baker RA.** The food of *Riccardoella limacum* (Schränk) – Acari -, Trombidiformes and its relationship with pulmonate molluscs. *J Nat Hist*. 1970; 4: 521–30.
- **Balouiri M, Sadiki M, Ibensouda SK.** Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *J Pharm Anal*. 2016; 6(2): 71-79.
- **Baur A, Baur B.** Interpopulation variation in the prevalence and intensity of parasitic mite infection in the land snail *Arianta arbustorum*. *Invertebr Biol*. 2005; 124:194-201.

- **Bayles DO, Wilkinson BJ.** Osmoprotectants and cryoprotectants for *Listeria monocytogenes*. Lett Appl Microbiol. 2000; 30:23-7.
- **Bermúdez-Brito M, Plaza-Díaz J, Muñoz-Quezada S, Gómez-Llorente C, Gil A.** Probiotic mechanisms of action. Ann Nutr Metab. 2012; 61(2): 160-174.
- **Bernet-Camard MF, Liévin V, Brassart D, Neeser JR, Servin AL, Hudault S.** The human *Lactobacillus acidophilus* strain LA1 secretes a nonbacteriocin antibacterial substance(s) active *in vitro* and *in vivo*. Appl Environ Microbiol. 1997; 63(7):2747-2753.
- **Brown CC, Baker DC, Barker IK.** Alimentary system. En: Maxie MG, editor. Jubb, Kennedy and Palmer's pathology of domestic animals. 5ta ed. Saunders: Elsevier; 2007. p.1-296.
- **Calvo MA.** Micotoxinas: importancia y sistemas de control. 1ª ed. Barcelona: Reial Acadèmia de Farmàcia de Catalunya. 2008.
- **Cárcoba R, Rodríguez A.** Influence of cryoprotectants on the viability and acidifying activity of frozen and freeze-dried cells of the novel starter strain *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* CECT 5180. Eur Food Res Technol. 2000; 211(6): 433-437.
- **Carr FJ, Chill D, Maida N.** The lactic acid bacteria: a literature survey. Crit Rev Microbiol. 2002; 28(4): 281-370.
- **Carvalho AS, Silva J, Ho P, Teixeira P, Malcata FX, Gibbs P.** Effect of different sugars added to the growth and drying medium upon thermotolerance and survival during storage of freeze-dried *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. Biotechnol Prog. 2003; 20:248-254.

- **Castro HP, Teixeira PM, Kirby R.** Changes in the cell membrane of *Lactobacillus bulgaricus* during storage following freeze-drying. *Biotechnol Lett.* 1996; 18(1): 99-104.
- **Castro HP, Teixeira PM, Kirby R.** Storage of lyophilized cultures of *Lactobacillus bulgaricus* under different relative humidities and atmospheres. *Appl Microbiol Biotechnol.* 1995; 44(1): 172-76.
- **Cepero R.** Retirada de los antibióticos promotores de crecimiento en la unión europea: causas y consecuencias. [internet] Universidad de Zaragoza: Dpto. de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos. Facultad de Veterinaria. 2006 [consulta el 16 de julio de 2016] . Disponible en: http://www.wpsa-aeca.es/aeca_imgs_docs/wpsa1142587453a.pdf.
- **Chang ST, Chen PF, Chang SC.** Antibacterial activity of leaf essential oils and their constituents from *Cinnamomum osmophloeum*. *J. Ethnopharmacol.* 2001; 77(1): 123-127.
- **Charm SE.** The Fundamentals of Food Engineering.3ª edición. Wesport: Connecticut; 1981.
- **Charrier M, Brune A.** The gut microenvironment of helcid snails (Gastropoda: Pulmonata): *in situ* profiles of pH, oxygen, and hydrogen determined by microsensors. *Can J Zool.* 2003; 81(5): 928-935.
- **Charrier M, Combet-Blanc Y, Ollivier B.** Bacterial flora in the gut of *Helix aspersa* (Gastropoda Pulmonata): evidence for a permanent population with a dominant homolactic intestinal bacterium, *Enterococcus casseliflavus*. *Can J Microbiol.* 1998; 44(1): 20-27.
- **Charrier M.** Evolution, during digestion, of the bacterial flora in the alimentary system of *Helix aspersa* (Gastropoda: Pulmonata): a scanning electron microscope study. *J Mollus Stud.* 1990; 56(3):425-433.

- **Christensen GD, Simpson WA, Bisno AL, Beachey EH.** Adherence of slime-producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces. Infect Immun. 1982; 37(1): 318-326.
- **Chuayana E, Ponce C, Rivera M, Cabrera E.** Antimicrobial activity of probiotics from milk products. Phil J Microbiol Infect Dis. 2003; 32: 71-74.
- **Chung LY.** The antioxidant properties of garlic compounds: allyl cysteine, alliin, allicin, and allyl disulfide. J Med Food. 2006; 9(2): 205-213.
- **Cicero A, Giangrosso G, Cammilleri G, Macaluso A, Currò V, Galuppo L, Vargetto D, Vicari D.** Microbiological and chemical analysis of land snails commercialised in Sicily. Ital J Food Saf. [internet] 2015 [consultada el 5 de agosto de 2016] 4(4196):66-68. Disponible en: <http://www.transmedreports.org/index.php/ijfs/article/view/ijfs.2015.4196>.
- **Cimpa S.A.S Insumos y Tecnología para la Industria Alimentaria.** [internet]. Colombia; 2016 [consultada el 17 de agosto de 2016]. Disponible en: <http://www.cimpaltda.com/modulo/quimicos/tween%2080.pdf>.
- **Cross DE, McDevitt RM, Acamovic T.** Herbs, thyme essential oil and condensed tannin extracts as dietary supplements for broilers, and their effects on performance, digestibility, volatile fatty acids and organoleptic properties. Br Poult Sci. 2011; 52(2): 227-237.
- **Cuellar M, Cuellar R.** Producción De Caracoles: Bases Fisiológicas, Sistemas De Producción Y Patología. 2ª ed. Madrid: Mundi-Prensa; 2002.
- **Cuellar R, Cuellar L, Perez T.** Helicicultura: Cría moderna de caracoles. 2ª ed. Madrid: Mundi-Prensa; 1991.

- **Cullen JM, Newberne PN.** Acute hepatotoxicity of aflatoxins. En: Eaton DL, Groopman JJ, editores. *The Toxicity of Aflatoxins. Human Health, Veterinary and Agricultural Significance*. 1ª edición. Toronto: Academic Press; 1994. p. 3-26.
- **Das J, Khan NS, Sooranna SR.** Potent activation of nitric oxide synthase by garlic: a basis for its therapeutic applications. *Curr Med Res Opin*. 1995; 13(5):257-63.
- **Dave RI, Shah NP.** Effectiveness of ascorbic acid as an oxygen scavenger in improving viability of probiotic bacteria in yoghurts made with commercial strater cultures. *Int Dairy J*. 1997; 7: 435-43.
- **De Man JC, Rogosa M, Sharpe ME.** A medium for the cultivation of lactobacilli. *J Appl Microbiol*. 1960; 23: 130-135.
- **Desai A, Powell IB, Shah NP.** Survival and activity of probiotic lactobacilli in skim milk containing prebiotics. *J Food Sci*. 2004; 69(3): 57-60.
- **Diéguez C, Montero A.** La colección de invertebrados fósiles del Museo Nacional de Ciencias Naturales (CSIC). *Graellsia*. 1997; 53: 31-35.
- **Duhart F.** Caracoles y sociedades en Europa desde la antigüedad: reflexiones etnozoológicas. *Studium: Revista de humanidades* [internet]. 2009 [visitada el 5 de abril de 2016] 15:115-139. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=3074448>.
- **Dunne C, O'Mahony L, Murphy L, Thornton G, Morrissey D, O'Halloran S, Fenney M, Sarah Flynn, Fitzgerald G, Daly C, Kiely B, O'Sullivan GC, Shanahan F, Collins JK.** *In vitro* selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with *in vivo* findings. *Am J Clin Nutr*. 2001; 73(2): 386s-392s.

- **Edwards PR, Bruner DW, Moran AB.** The genus *Salmonella*: its occurrence and distribution in the United States. Bull Kentucky Agric Exp Sta. 1948; 525:1-60.
- **Ellis EM.** *Salmonella* reservoirs in animals and feeds. J Am Oil Chem Soc. 1968; 46: 227-229.
- **Erdogrul O, Erbilir F.** Isolation and characterization of *Lactobacillus bulgaricus* and *Lactobacillus casei* from various foods. Turk J Biol. 2006; 30: 39-44.
- **Fain A, van Goethem JL.** Les acariens du genre *Riccardoella* Berlese, 1923 parasites du poumon de mollusques gastéropodes pulmonés terrestres. Acarologia. 1986; 27: 125-140.
- **Fairbrother J M, Nadeau E.** *Escherichia coli*: on-farm contamination of animals. Rev Sci Tech. 2006; 25(2): 555-569.
- **FAO/OMS.** El impacto de los piensos en la inocuidad de los alimentos. Reunión Conjunta FAO/OMS de Expertos [internet]. Roma: FAO/OMS; 2008 [consulta el 5 de abril de 2016]. Disponible en: <http://www.fao.org/3/a-a1507s.pdf>.
- **FAO/WHO.** Report of the joint FAO/WHO expert consultation on evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. En: FAO Food and Nutrition Paper. Roma: FAO/WHO; 2006. p. 1-34.
- **Fioramonti J, Theodorou V, Bueno L.** Probiotics: what are they?. What are their effects on gut physiology? Best Prac & Res Clin Gastroenterol. 2003; 17: 711-724.

- **Fontanillas JC.** La acariosis. Una grave enfermedad de los caracoles. En: Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, editores. Hojas divulgadoras. 1ª edición. Madrid; Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. 1988.
- **Franks F.** Freeze-drying: A combination of physics, chemistry, engineering and economics. *Jpn J Freezing Drying*. 1992; 38: 5-16.
- **Fuller R.** History and Development of Probiotics. En: Fuller R, editor. Probiotics: The scientific basis. 1ª edición. Springer Netherlands; 1992. p. 1-8.
- **Fuller R.** Probiotics in man and animals. A review. *J Appl Bacteriol*. 1989; 66: 365-378.
- **Fuller B, Paynter S.** Fundamentals of cryobiology in reproductive medicine. *Reprod Biomed Online*. 2004; (9): 680–691
- **García M.** Nutrición de caracoles. *Revista IDIA XXI*. 2003; 5: 84-90.
- **Gardiner GE, O'Sullivan E, Kelly J, Auty MAE, Fitzgerald GF, Collins JK, Ross RP, Stanton C.** Comparative survival rates of human-derived probiotic *Lactobacillus paracasei* and *L. salivarius* strains during heat treatment and spray drying. *Appl Environ Microbiol*. 2000; 66(6): 2605-2612.
- **Geankoplis CJ.** Transport Processes and Unit Operations. 3ª ed. New Jersey: Prentice Hall PTR; 1999.
- **Gerritse K, Posno M, Schellekens MM, Boersma WJ, Claassen E.** Oral administration of TNP-*Lactobacillus* conjugates in mice: a model for evaluation of mucosal and systemic immune responses and memory formation elicited by transformed lactobacilli. *Res. Microbiol*. 1990; 141: 955-962.

- **Glaasker E, Tjan FS, Steeg PF, Konings WN, Poolman B.** Physiological response of *Lactobacillus plantarum* to salt and nonelectrolyte stress. J. Bacteriol. 1998; 180(17): 4718-23.
- **Godiosa O, Consignado MD, Adrian C, Peña MD, Antonio V, Jacalne DV.** *In vitro* study on the antibacterial activity of *Lactobacillus casei* (commercial Yakult drink) against four diarrhea causing organisms. Phil J Microbiol Infect Dis. 1993; 22:50-55.
- **Goldberg I, Eschar L.** Stability of lactic acid bacteria to freezing as related to their fatty acid composition. Appl Environ Microbiol. 1977; 33: 489-496.
- **Gómez-Zavaglia A, Disalvo EA, De Antoni GL.** Fatty acid composition and freeze–thaw resistance in lactobacilli. J. Dairy Res. 2000; 67: 241-247.
- **González G.** Natural sources against veterinary pathogens: Evaluation of anti-adhesive and anti-biofilm activity of wheat bran. Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona. Barcelona. 2013.
- **González-Núñez C, Calvo-Torras MA.** Comparison of the microbiota of snails (*Helix aspersa*) of different weights and its evolution over time. J Veterinar Sci Technolo [internet]. 2015 [consulta el 28 de marzo de 2015]; 6(2). Disponible en: <http://www.readcube.com/articles/10.4172/2157-7579.1000216>.
- **Goss MJ, Barry DAJ, Rudolph DL.** Contamination in Ontario farmstead domestic wells and its association with agriculture: 1. Results from drinking water wells. J Contam Hydrol. 1998; 32(3): 267-293.
- **Gouesbet G, Jan G, Boyaval P.** *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* thermotolerance. Le Lait. 2001; 81: 301-309.

- **Goula AM, Adamopoulos KG, Kazakis NA.** Influence of spray drying conditions on tomato powder properties. *Drying Technol.* 2004; 22(5): 1129-51.
- **Graham FJ, Runham NW, Ford JB.** Long-term effects of *Riccardoella limacum* living in the lung of *Helix aspersa*. *BCPC Symposium Proceedings.* 1996; 66: 359–364.
- **Graham FJ.** The biology and control of *Riccardoella limacum* (Schrank), a mite pest of farmed snails. PhD thesis. University of Wales, UK. 1994.
- **Guarner F, Schaafsma GJ.** Probiotics. *Int J Food Microbiol.* 1998; 39(3): 237-238.
- **Gulland FMD.** The impact of infectious diseases on wild animal populations: a review. En: Grenfell BT, Dobson AP, editores. *Ecology of infectious diseases in natural populations.* 7ª edición. Cambridge: Cambridge University Press; 1995. p. 20-51.
- **Haeussler EM, Pizá J, Schmera D, Baur B.** Intensity of parasitic mite infection decreases with hibernation duration of the host snail. *Parasitology.* 2012; 139(8):1038-44.
- **Harris J, Plummer S, Lloyd D.** Antigiardial drugs. *Appl Microbiol Biotech.* 2001; 57(5-6): 614-619.
- **Havenaar R, Huis In't Veld JH.** Probiotics: A general review. En: Wood BJ, editor. *The Acid Lactic Bacteria in Healt and Disease.* 1ª edición. Springer US; 1992. p. 151-170.
- **Heckly RJ.** Principles of preserving bacteria by freeze-drying. *Dev Ind Microbiol.* 1984; 26: 379-395.

- **Holzappel WH, Geisen R, Schillinger G.** Biological-preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins, and food grade enzymes. *Int J Food Microbiol.* 1995; 24: 343-362.
- **Hora MS, Rana RK, Smith FW.** Lyophilized formulations of recombinant tumor necrosis factor. *Pharm Res.* 1992; 9(1): 33-36.
- **Hughes P, Heritage J.** Antibiotic growth-promoters in food animals. En: FAO editores. *Assessing Quality and Safety of Animal Feeds.* Roma. FAO. 2004. p. 129-152.
- **IRTA (Instituto de Investigación y Tecnología Alimentaria).** Review of immune stimulator substances/agents that are susceptible of being used as feed additives: mode of action and identification of end-points for efficacy assessment. EFSA Supporting Publication [internet]. 2015 [consulta el 18 de noviembre de 2015]; 12(12): EN-905. Disponible en: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.2903/sp.efsa.2015.EN-905/pdf>
- **Jacques NA, Hardy L, Knox KW, Wicken AJ.** Effect of Tween 80 on the morphology and physiology of *Lactobacillus salivarius* strain IV CL-37 grown in a chemostat under glucose limitation. *Microbiology*, 1980; 119(1): 195-201.
- **Jafari RA, Fazlara A, Govahi M.** An investigation into *Salmonella* and fecal coliform contamination of drinking water in broiler farms in Iran. *Int J Poult Sci.* 2006; 5(5): 491-493.
- **Jakhetia V, Patel R, Khatri P, Pahuja N, Garg S, Pandey A, Sharma S.** Cinnamon: a pharmacological review. *JASR.* 2010; 1(2): 19-23.
- **Jesse J, Mohseni M, Shah N.** Medical attributes of *Allium sativum*- Garlic. Wilkes University [internet] 1997 [consulta el 16 de febrero de 2016] Disponible en: <http://klemow.wilkes.edu/Allium.html>

- **Kasper JC, Friess W.** The freezing step in lyophilization: physico-chemical fundamentals, freezing methods and consequences on process performance and quality attributes of biopharmaceuticals. *Eur J Pharm Biopharm.* 2011; 78(2): 248-263.
- **Kennedy JF, Knill CJ, Taylor DW.** Maltodextrins. En: Kearsley MW, Dziedzic SZ, editores. *Handbook of starch hydrolysis products and their derivatives.* 1a edición. Londres: Blackie Academic & Professional; 1995. p. 65-82.
- **Kets EP, Teunissen PJ, de Bont JA.** Effect of compatible solutes on survival of lactic acid bacteria subjected to drying. *Appl Environ Microbiol.* 1996; 62: 259-261.
- **Kiebre-Toe MB, Borges E, Maurin F, Richard Y, Kodjo A.** Etude de la flore bacterienne aerobie a Gram negatif de l'escargot d'elevage (*Helix aspersa*). *Rev Med Vet Toulouse.* 2003; 154(10): 605-610.
- **Kiebre-Toe MB, Lacheretz A, Villard L, Richard Y, Kodjo A.** Pulsed-field gel electrophoresis profiles of aeromonads isolated from healthy and diseased *Helix aspersa* from French snail farms. *Can J Microbiol.* 2005; 51(9): 817-820.
- **Kimoto H, Ohmomo S, Okamoto T.** Enhancement of bile tolerance in lactococci by Tween 80. *J App Microbiol.* 2002; 92: 41-46.
- **Kothakota A, Kumar A, Kumar M, Juvvi P, Rao S, Kautkar S.** Characteristics of spray dried dahi powder with maltodextrin as an adjunct. *IJEAB.* 2014; 7(4): 849-865.
- **Kourounakis PN, Rekka EA.** Effect on active oxygen species of alliin and *Allium sativum* (garlic) powder. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol.* 1991; 74(2): 249-252.

- **Kubota H, Senda S, Tokuda H, Uchiyama H, Nomura N.** Stress resistance of biofilm and planktonic *Lactobacillus plantarum* subsp. *plantarum* JCM 1149. Food Microbiol. 2009; 26(6): 592-597.
- **Kumar M, Berwal JS.** Sensitivity of food pathogens to garlic (*Allium sativum*). J Appl Microbiol. 1998; 84(2): 213-215.
- **Kurozawa LE, Park KJ, Hubinger MD.** Effect of maltodextrin and gum arabic on water sorption and glass transition temperature of spray dried chicken meat hydrolysate protein. J Food Eng. 2009; 91: 287-296.
- **Laguna AV.** Calidad en la fabricación actual de piensos. Ganadería [internet]. 2005 [consultada el 4 de mayo del 2016] 37: 48-54. Disponible en: http://www.magrama.gob.es/ministerio/pags/biblioteca/revistas/pdf_Ganad%5CGanad_2005_37_48_53.pdf.
- **Lebeer S, Verhoeven TL, Vélez MP, Vanderleyden J, De Keersmaecker SC.** Impact of environmental and genetic factors on biofilm formation by the probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* GG. Appl Environ Microbiol. 2007; 73(21): 6768-75.
- **Lesel M, Charrier M, Lesel R.** Some characteristics of the bacterial flora housed by the brown garden snail, *Helix aspersa* (Gastropoda Pulmonata). Preliminary results. En: Lesel R, editor. Proceedings of the International Symposium on Microbiology in Poecilotherms. Amsterdam: Elsevier Science; 1990. p. 149–152.
- **Lévesque B, Barthe C, Dixon BR, Parrington LJ, Martin D., Doidge, Proulx JF, Murphy D.** Microbiological quality of blue mussels (*Mytilus edulis*) in Nunavik, Quebec: a pilot study. Can J Microbiol. 2010; 56(11): 968-977.

- **Levine H, Slade L.** Principles of cryostabilization technology from structure property relationships of carbohydrate water-systems - A review. *Cryo-letters*. 1988; 9(1): 21-63.
- **Li B, Tian F, Liu X, Zhao J, Zhang H, Chen W.** Effects of cryoprotectants on viability of *Lactobacillus reuteri* CICC6226. *Appl Microbiol Biotech*. 2011; 92(3): 609-616.
- **Linders LJ, Meerdink G, van't Riet K.** Effect of growth parameters on the residual activity of *Lactobacillus plantarum* after drying. *J Appl Microbiol*. 1997; 82: 683–688.
- **Liu S, Asmundson RV, Gopal PK, Holland R, Crow VL.** Influence of reduced water activity on lactose metabolism by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* at different pH values. *Appl Environ Microbiol*. 1998; 64: 2111-16.
- **Llena JM.** La calidad del agua y sus usos diferentes en ganadería. *Selecciones Avícolas* [internet] 2011 [consultada el 20 de enero de 2016] 53: 31-35. Disponible en: <http://cunicultura.com/pdf-files/2010/8/5594-la-calidad-del-agua-y-sus-usos-diferentes-en-ganaderia.pdf>.
- **Lorente FB, Serra DJ.** Alimentos funcionales: probióticos. *Acta Pediatr Esp*. 2001; 59(3): 150-155.
- **Lucas A, Sodini I, Monnet C, Jolivet P, Corrieu G.** Probiotic cell counts and acidification in fermented milks supplemented with milk protein hydrolysates. *Int Dairy J*. 2004; 14: 47-53.
- **Lynn TV, Hancock DD, Besser TE, Harrison JH, Rice DH, Stewart N, Rowan LL.** The occurrence and replication of *Escherichia coli* in cattle feeds. *J Dairy Sci*. 1998; 81(4): 1102-1108.

- **Magaldi S, Mata-Essayag S, Hartung de Capriles C, Perez C, Collella MT, Olaizola C, Ontiveros Y.** Well diffusion for antifungal susceptibility testing. *Int J Infect Dis.* 2004; 8(1): 39-45.
- **MAGRAMA (Ministerio de Agronomía, Alimentación y Medio Ambiente).** Helicicultura. Dossier Tècnic. Formación y asesoramiento al sector agroalimentario [internet] 2010. [consulta el 2 de junio de 2015] 46. Disponible en: http://www.ruralcat.net/c/document_library/get_file?uuid=bda03002-c47e-44e9-9922-1a79bba0760a&groupId=10136.
- **Marasco F, Murciano C.** Guía completa de la cría de caracoles. Barcelona: Editorial De Vicchi, S. A; 2000.
- **Markaverich BM, Webb B, Densmore CL, Gregory RR.** Effects of coumestrol on estrogen receptor function and uterine growth in ovariectomized rats. *Environ Health Persp.* 1995; 103(6): 574-581.
- **MARM (Ministerio de Medio Ambiente, y Medio Rural y Marino).** Guía de prácticas correctas de higiene en Helicicultura [internet] 2009. [consulta el 4 de marzo de 2015]. Disponible en: http://www.magrama.gob.es/es/ganaderia/publicaciones/guia_tcm7-6049.pdf
- **Martínez AM.** Principales patologías de los caracoles. *Ganadería* [internet]. 2001 [consultada el 4 de mayo del 2016] 5:53-56. Disponible en: http://www.magrama.gob.es/ministerio/pags/biblioteca/revistas/pdf_Ganad/Ganad_2001_5_53_56.pdf
- **Mateos GG, Jiménez MG.** Uso de premezclas en fabricación de piensos. Características y composición de las materias primas utilizadas en macrocorrectores. En: Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal, editorial. Avances en nutrición y alimentación animal: XIV Curso de especialización. Madrid: Expoaviga; 1998. p. 171-190.

- **Mauch A, Dal Bello F, Coffey A, Arendt EK.** The use of *Lactobacillus brevis* PS1 to *in vitro* inhibit the outgrowth of *Fusarium culmorum* and other common *Fusarium* species found on barley. Int J Food Microbiol. 2010; 141: 116-121.
- **Mazza P.** The use of *Bacillus subtilis* as an antidiarrhoeal microorganism. Boll Chim Farm. 1994; 133(1): 3-18.
- **McClane BA, Uzal FA, Miyakawa MF, Lyerly D, Wilkins T.** The Enterotoxigenic Clostridia. En: Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer KH, Stackebrandt E, editores. The Prokaryotes. 4ta ed. New York: Springer-Verlag; 2006. p. 698-675.
- **McKay LL.** Roles of plasmids in starter cultures. En: Gilliland SE, editor. Bacterial Starter Cultures for Foods. Florida; CRC Press Inc: 1985. p. 159-174.
- **Mead JI, Naranjo-García ED, Gilbertson LH, Van Devender RW.** Moluscos terrestres. En: Molina-Freaner FE, Van Devender TR, editores. Diversidad biológica de sonora. UNAM. Mexico; 2010. p. 285-291.
- **Metchnikoff E.** The prolongation of life, 1ª ed. Nueva York: Putnam Sons; 1908.
- **Miller WA, Miller MA, Gardner IA, Atwill ER, Byrne BA, Jang S, Harris M, Ames J, Jessup D, Paradies D, Worcester K, Melli A, Conrad PA.** *Salmonella* spp., *Vibrio* spp., *Clostridium perfringens*, and *Plesiomonas shigelloides* in marine and freshwater invertebrates from coastal California ecosystems. Microb Ecol. 2006; 52(2): 198-206.
- **Molina A, Granados-Chinchilla F, Jiménez M, Acuña-Calvo MT, Alfaro M, Chavarría G.** Vigilance for *Salmonella* in Feedstuffs Available in Costa Rica: Prevalence, Serotyping and Tetracycline Resistance of Isolates Obtained from 2009 to 2014. Foodborne Pathog. Dis. 2016; 13(3): 119-127.

- **Montes-Belmont R, Carvajal M.** Control of *Aspergillus flavus* in maize with plant essential oils and their components. J Food Prot. 1998; 61(5): 616-619.
- **Moreira T, Gutiérrez A, Delgado H.** Aspectos físicos relacionados con los aditivos en el proceso de liofilización. Papel relevante de los carbohidratos. Biotecnología Aplicada. 1994; 11(2): 113-7.
- **Moreiras O, Carbajal A, Cabrera L, Cuadrado C.** Tabla de composición de alimentos. Guía de prácticas. 16 ed. Madrid. Editorial Pirámide. 2013.
- **Moure AA, Pérez HG, Gargallo CL, Vicioso MP.** Aportaciones al estudio de los niveles de contaminación de medio ambiente, instalaciones, alimentos, agua y heces en explotaciones cunícolas y su evolución tras un proceso de higienización. Asociación Española de Cunicultura (ASESCU). [internet] 1981 [consulta el 27 de julio de 2016] 75-84. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=2880763>.
- **Müller AP, Martin-Vivaldi M, Soler JJ.** Parasitism, host immune defense and dispersal. J. Evol. Biol. 2004; 17: 603-612.
- **Muñoz-Quezada S, Bermudez-Brito M, Chenoll E, Genovés S, Gomez-Llorente C, Plaza-Diaz J, Matencio E, Bernal MJ, Romero F, Ramón D, Gil A.** Competitive inhibition of three novel bacteria isolated from faeces of breast milk-fed infants against selected enteropathogens. Brit J Nutr, 2013; 109(S2): S63-S69.
- **Nagpal R, Yadav H, Kumar M, Jain S, Yamashiro Y, Marotta F.** Probiotics, Prebiotics and Synbiotics: An Introduction. En: Otes S, editor. Probiotics and Prebiotics in Food, Nutrition and Health. 1a ed. Londres: CRC Press; 2013. p. 1-24.

- **Naidu AS, Bidlack WR, Clemens RA. 1999.** Probiotic spectra of lactic acid bacteria (LAB). *Crit Rev Food Sci.* 1999; 39(1): 13-126.
- **Nizza A, Di Meo C, Esposito L.** Influence of the diet used before and after the first mating on reproductive performance of rabbits does. *World Rabbit Sci.* 2010; 5(3): 107-110.
- **Nowroozi J, Mirzaii M, Norouzi M.** Study of *Lactobacillus* as probiotic bacteria. *Iranian J Publ Health.* 2004; 33(2): 1-7.
- **Oldenhof H, Wolkers WF, Fonseca F, Passot S, Marin M.** Effect of Sucrose and Maltodextrin on the Physical Properties and Survival of Air-Dried *Lactobacillus bulgaricus*: An in Situ Fourier Transform Infrared Spectroscopy Study. *Biotechnol Progr.* 2005; 21(3): 885-892.
- **Oldfield JE, Fox CW, Bahn AV, Bickoff EM, Kohler GO.** Coumestrol in alfalfa as a factor in growth and carcass quality in lambs. *J Anim Sci.* 1966; 25(1): 167-174.
- **Olivares M, Díaz-Ropero MP, Martín R, Rodríguez JM, Xaus J.** Antimicrobial potential of four *Lactobacillus* strains isolated from breast milk. *J Appl Microbiol.* 2006; 101(1): 72-79.
- **Ouwehand AC, Salminen SJ.** The health effects of cultured milk products with viable and non-viable bacteria. *Int Dairy J.* 1998; 8(9):749-758.
- **Oyetayo V, Adetuyi F, Akinyosoye F.** Safety and protective effect of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* used as probiotic agent *in vivo*. *Afr J Biotechnol.* 2003; 2(11): 448-452.
- **Pai ST, Platt M.** Antifungal effects of *Allium sativum* (garlic) extract against the *Aspergillus* species involved in otomycosis. *Lett Appl Microbiol.* 1995; 20(1):14-8.

- **Palmfeldt J, Rådström P, Hahn-Hägerdal B.** Optimisation of initial cell concentration enhances freeze-drying tolerance of *Pseudomonas chlororaphis*. Cryobiology. 2003; 47(1): 21-29.
- **Palomo-Rodríguez M, Tovar RB, Contreras RF, Hurtado PB, Requejo LMI, Juárez IR.** Presencia de microorganismos patógenos en agua de bebederos que consume el ganado caprino de la comarca lagunera. Agrofaz. 2014; 14(3): 13-18.
- **Papadimitriou K, Zoumpopoulou G, Foligné B, Alexandraki V, Kazou M, Pot B, Tsakalidou E.** Discovering probiotic microorganisms: *in vitro*, *in vivo*, genetic and omics approaches. Front Microbiol. 2015; 6(58):1-28.
- **Parvez S, Malik KA, Ah Kang S, Kim HY.** Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. J Appl Microbiol. 2006; 100(6): 1171-85.
- **Passwater R.** The chemistry of garlic health benefits. [internet] 1997 [consulta el 23 de marzo de 2016]. Disponible en: http://www.drpasswater.com/nutrition_library/garlic.html
- **Pedraza-Chaverri J, Tapia E, Medina-Campos O, Angeles Granados M, Franco M.** Garlic prevents hypertension induced by chronic inhibition of nitric oxide synthesis. Life Sci. 1998; 62(6):71-7.
- **Pereyra RL, Maiorano L, Raimondi N, Ybalo C.** La Helicicultura. Invenio: Revista de investigación académica. 2003; 11: 127-134.
- **Pérez L, Girmé G, Arosemena E, Calvo A, Marcelo JA, Calvo MA.** Microbiota from *Helix aspersa* Müller in Barcelona Area (Spain). Adv Microbiol.[internet]. 2014 [consultada el 23 de Julio del 2016] 4(10): 604-608. Disponible en: http://file.scirp.org/pdf/AiM_2014080616210114.pdf.

- **Pérez L.** Evaluación de nuevas cepas probióticas: efecto sobre micotoxinas y en Helicicultura. Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona. Barcelona. 2011.
- **Pichereau V, Hartke A, Auffray Y.** Starvation and osmotic stress induced multiresistances: influence of extracellular compounds. *Int J Food Microbiol*, 2000; 55:19–25.
- **Pier AC.** An overview of the mycotoxicoses of domestic animals. *J Am Vet Med Assoc*. 1973; 163(11):1259-61.
- **Pikal MJ. 1990.** Freeze-drying of proteins. Part I: Process design. *BioPharm* 1990; 3(8):18-27.
- **Putnam D, Russelle M, Orloff S, Kuhn J, Fitzhugh L, Godfrey L, Kiess A, Long R.** Alfalfa, Wildlife and the Environment—The importance and Benefits of Alfalfa in the 21st Century. California Alfalfa and Forage Association [internet]. 2001 [consulta el 20 de julio 2016]. Disponible en: <http://agric.ucdavis.edu/files/242006.pdf>.
- **Ramírez LA, Montoya OI, Zea JM.** Probióticos: una alternativa de producción limpia y de remplazo a los antibióticos promotores de crecimiento en la alimentación animal. *Producción + Limpia*. 2013; 8:135-146.
- **Ramírez-Navas JS.** Liofilización de alimentos. *Revista ReCiTeIA. Revisiones de la Ciencia, Tecnología e Ingeniería de los Alimentos*. 6ta edición. 2007.
- **Ranasinghe P, Pigera S, Premakumara GS, Galappaththy P, Constantine GR, Katulanda P.** Medicinal properties of ‘true’ cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*): a systematic review. *BMC Complement Altern Med*. 2013; 13(1): 1-10.

- **Reddy KB, Madhu AN, Prapulla SG.** Comparative survival and evaluation of functional probiotic properties of spray-dried lactic acid bacteria. *Int J Dairy Technol.* 2009; 62(2): 240-248.
- **Rees LP, Minney SF, Plummer NT, Slater JH, Skyrme DA.** A quantitative assessment of the antimicrobial activity of garlic (*Allium sativum*). *World J Microbiol Biotech.* 1993; 9(3): 303-307.
- **Refregier-Petton J, Rose N, Denis M, Salvat G.** Risk factors for *Campylobacter* spp. contamination in French broiler-chicken flocks at the end of the rearing period. *Prev Vet Med.* 2001; 50(1): 89-100.
- **Reid G.** Probiotics: definition, scope and mechanisms of action. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2016; 30(1): 17-25.
- **Reque E, Pandey A, Franco S, Socol C.** Isolation, identification and physiological study of *Lactobacillus fermentum* lpb for use as probiotic in chickens. *Braz J Microbiol.* 2000; 31:303-307.
- **Ricke SC.** Perspectives on the use of organic acids and short chain fatty acids as antimicrobials. *Poult Sci.* 2003; 82(4): 632-639.
- **Rolfe RD.** The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health. *J Nutr.* 2000; 130:396s–402s.
- **Rubio J.** Suministro de agua de calidad en las granjas de broilers. Jornadas profesionales de avicultura de carne. *Revistas Selecciones avícolas y cunicultura.* [internet]. 2005 [consulta el 13 de marzo de 2016] 11: 1-11 Disponible en: http://www.wpsa-aeca.es/aeca_imgs_docs/19_03_39_11-suministro_de_agua.pdf.

- **Rubio LA, Brenes A, Setién I, de la Asunción G, Durán N, Cutuli MT.** Lactobacilli counts in crop, ileum and caecum of growing broiler chickens fed on practical diets containing whole or dehulled sweet lupin (*Lupinus angustifolius*) seed meal. Br Poult Sci. 1998; 39(3):354-9.
- **Rubio LA, Grant G, Scislowski PW, Brown D, Bardocz S, Pusztai A.** The utilization of lupin (*Lupinus angustifolius*) and faba bean globulins by rats is poorer than of soybean globulins or lactalbumin but the nutritional value of lupin seed meal is lower only than that of lactalbumin. J Nutr. 1995;125(8):2145-55.
- **Rubio LA, Peinado MJ, Ruiz R, Suárez-Pereira E, Ortiz Mellet C, García Fernández JM.** Correlations between changes in intestinal microbiota composition and performance parameters in broiler chickens. J Anim Physiol Anim Nutr (Berl). 2015; 99(3):418-23.
- **Ruiz R, García MP, Lara A, Rubio LA.** Garlic derivatives (PTS and PTS-O) differently affect the ecology of swine faecal microbiota in vitro. Vet Microbiol. 2010; 144(1-2):110-117.
- **Ruiz R, Peinado MJ, Aranda-Olmedo I, Abecia L, Suárez-Pereira E, Ortiz Mellet C, García Fernández JM, Rubio LA.** Effects of feed additives on ileal mucosa-associated microbiota composition of broiler chickens. J Anim Sci. 2015; 93(7):3410-20
- **Saarela M, Mogensen G, Fonden R, Mättö J, Mattila-Sandholm T.** Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. J Biotech. 2000; 84(3): 197-215.
- **Salminen S, von Wright A, Ouwehand A.** Lactic Acid Bacteria. Microbiological and Functional Aspect. 3^a ed. New York: Marcel Dekker, Inc. 2004.

- **Santivarangkna C, Higl B, Foerst P.** Protection mechanisms of sugars during different stages of preparation process of dried lactic acid starter cultures. *Food Microbiol.* 2008; 25(3): 429-441.
- **Schüpbach HU, Baur B.** Experimental evidence for a new transmission route in a parasitic mite and its mucus-dependent orientation towards the host snail. *Parasitology.* 2008; 135: 1679-1684.
- **Segade P, García-Estévez J, Arias C, Iglesias R.** Parasitic infections in mixed system-based heliculture farms: dynamics and key epidemiological factors. *Parasitology.* 2013; 140(1): 482-97.
- **Semyonov D, Ramon O, Kaplun Z, Levin-Brener L, Gurevich N, Shimoni E.** Microencapsulation of *Lactobacillus paracasei* by spray freeze drying. *Food Res Int.* 2010; 43(1): 193-202.
- **Shah NP, Dave R.** Antimicrobial substances including bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *Biosci Microflora.* 2002; 21(4): 217-223.
- **Siaterlis A, Deepika G, Charalampopoulos D.** Effect of culture medium and cryoprotectants on the growth and survival of probiotic lactobacilli during freeze drying. *Lett Appl Microbio.* 2009; 48(3): 295-301.
- **Silva M, Jacobus NV, Deneke C, Gorbach SL.** Antimicrobial substance from a human *Lactobacillus* strain. *Antimicrob Agents Chemother.* 1987; 31(8): 1231-1233.
- **Simkiss K, Watkins B.** The influence of gut microorganisms on zinc uptake in *Helix aspersa*. *Environ Pollut.* 1990; 66(3): 263-271.
- **Simon O, Vahjen W, Scharek L.** Micro-organisms as feed additives-probiotics. *Advances in pork Production.* 2005; 16: 161-167.

- **Singh G, Maurya S, Catalan CA.** A comparison of chemical, antioxidant and antimicrobial studies of cinnamon leaf and bark volatile oils, oleoresins and their constituents. *Food Chem Toxicol.* 2007; 45(9):1650-1661.
- **Smedley JG III, Fisher DG, Sayeed S, Chakrabarti G, McClane BA.** The enteric toxins of *Clostridium perfringens*. *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* 2004; 152: 183-204.
- **Smittle RB, Gilliland SE, Speck ML, Walter WM.** Relationship of cellular fatty acid composition to survival of *Lactobacillus bulgaricus* in liquid nitrogen. *Appl Microbiol.* 1974; 27: 738-743.
- **Stanton C, Ross RP, Fitzgerald GF, Van Sinderen D.** Fermented functional foods based on probiotics and their biogenic metabolites. *Curr Opin Biotechnol.* 2005; 16(2): 198-203.
- **Stepanović S, Vuković D, Hola V, Bonaventura GD, Djukić S, Ćirković I, Ruzicka F.** Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *Apmis.* 2007; 115(8): 891-899.
- **Stob M, Beeson WM, Perry TW, Mohler MT.** Effects of Coumestrol in Combination with Implanted and Orally Administered Diethyl-Stilbestrol on Gains and Tissue Residues in Cattle. *J Animal Sci.* 1968; 27(6): 1638-1642.
- **Strasser S, Neureiter M, Geppl M, Braun R, Danner H.** Influence of lyophilization, fluidized bed drying, addition of protectants, and storage on the viability of lactic acid bacteria. *J Appl Microbiol.* 2009; 107(1): 167-177.
- **Tabak M, Armon R, Neeman I.** Cinnamon extracts' inhibitory effect on *Helicobacter pylori*. *J Ethnopharmacol.* 1999; 67(3): 269-277.
- **Tamime AY.** Fermented milks: a historical food with modern applications-a review. *Eur J Clin Nutr.* 2002; 56: 2-15.

- **Teixeira P, Castro H, Kirby R.** Evidence of membrane lipid oxidation of spray-dried *Lactobacillus bulgaricus* during storage. Lett Appl Microbiol. 1996; 22: 34–38.
- **Teixeira P, Castro H, Kirby.** Spray drying as a method for preparing concentrated cultures of *Lactobacillus bulgaricus*. J Appl Microbiol. 1995; 78: 456-462.
- **Tsai CC, Lin PP, Hsieh YM.** Three *Lactobacillus* strains from healthy infant stool inhibit enterotoxigenic *Escherichia coli* grown *in vitro*. Anaerobe. 2008; 14(2): 61-67.
- **Uguen P, Hamelin J, Le Pennec JP, Blanco C.** Influence of osmolarity and the presence of an osmoprotectant on *Lactococcus lactis* growth and bacteriocin production. Appl. Environ. Microbiol. 1999; 65: 291-293.
- **Valencia DG, Serrano MP. 2006.** Prohibición del uso de antibióticos como promotores de crecimiento. Ganadería [internet]. 2006. [consultada el 9 de enero 2016] 41: 28-31. Disponible en: http://www.magrama.gob.es/ministerio/pags/biblioteca/revistas/pdf_Ganad/Ganad_2006_41_28_31.pdf.
- **Van Immerseel F, Russell JB, Flythe MD, Gantois I, Timbermont L, Pasmans F, Haesebrouck F, Ducatelle R.** The use of organic acids to combat *Salmonella* in poultry: a mechanistic explanation of the efficacy. Avian Pathol. 2006; 35(3):182-188.
- **Vandenberh PA.** Lactic acid bacteria, their metabolic products and interference with microbial growth. FEMS Microbiol Rev. 1993; 12: 221-238.
- **Vera R, Arosemena L, Calvo-Torras MÁ.** Incidence of filamentous fungi with toxigenic potential on samples of feed and raw materials for their manufacture. J Microbiol, Biotech Food Sci. 2016; 5(6): 599-601.

- **Vidal DR.** Probióticos: aspectos microbiológicos y tecnológicos. Alimentación Nutrición y Salud. 1999; 13(2): 48-52.
- **Villena A, Morales C, Soto P, Enciso H.** Bacterial flora in the digestive tract of *Helix aspersa* Müller snails under two breeding systems. Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú (RIVEP). 2010; 21(1): 100-105.
- **Wang H, Yan Y, Wang J, Zhang H.** Production and characterization of antifungal compounds produced by *Lactobacillus plantarum* IMAU10014. PLoS ONE. 2012; 7(1): e29452.
- **Weber ND, Andersen DO, North JA, Murray BK, Lawson LD, Hughes BG.** In vitro virucidal effects of *Allium sativum* (garlic) extract and compounds. Planta médica. 1992; 58(5):417-423.
- **Xiccato G, Bernardini M, Castellini C, Dalle Zotte A, Queaque PI, Trocino A.** Effect of postweaning feeding on the performance and energy balance of female rabbits at different physiological states. J Animal Sci. 1999; 77(2): 416-426.

