

Efecto de *Saccharomyces boulardii* RC009 sobre la productividad y calidad de leche en vacas lecheras.

M.P. Martínez^{a,b}, A. Guendulain^d, P. Provensal^e, M.L. González Pereyra ^a, L. Cavaglieri ^{a,c}.

^a Departamento de Microbiología e Inmunología, Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales, Universidad Nacional de Río Cuarto. Ruta N 36 km 601, (5800) Río Cuarto, Córdoba, Argentina.

^b Miembro de Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Argentina.

^c Miembro de Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Argentina.

^dDatos de afiliación de Alberto Med. Vet., Jefe AER INTA Ucacha. Carlos Pellegrini 272-(2677) Ucacha

^e Facultad de Agronomía y Veterinaria, Universidad Nacional de Río Cuarto. Ruta N 36 km 601, (5800) Río Cuarto, Córdoba, Argentina.

Corresponding author:

Dr. Lilia Cavaglieri, Departamento de Microbiología e Inmunología, Universidad Nacional de Río Cuarto, Ruta 36 Km, 601, (5800) Río Cuarto, Córdoba, Argentina. Tel: 0358-4676429

E-mail: lcavaglieri@exa.unc.edu.ar

RESUMEN

Las recientes problemáticas con relación al uso de antibióticos en la producción animal con respecto a su bioacumulación en el cuerpo humano han obligado a usar los probióticos como una alternativa en la nutrición de rumiantes. Es por esto que numerosos autores evalúan el uso de microorganismos probióticos como una alternativa en la nutrición de los rumiantes para incrementar el rendimiento lechero y combatir los patógenos en el sistema digestivo. El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar los efectos de *S. boulardii* RC009 (5×10^{11} UFC/T de alimento) sobre la producción y la composición de la leche de vacas lecheras además de determinar su efecto sobre la presencia de aflatoxina M₁ en leche (AFM₁). Se utilizaron cuatrocientas vacas lecheras Holstein multíparas que producían diariamente 24.0 ± 0.74 L de leche. Se sometieron a dos tratamientos: vacas control (n=200) se alimentaron con una dieta sin agregado de levadura; y vacas con probiótico (n=200) fueron alimentadas diariamente con su dieta normal y el agregado de *S. boulardii* RC009. Cuando las muestras de las leches obtenidas durante el tratamiento fueron comparadas con aquellas provenientes del período pretratamiento, se observó un incremento en el rendimiento en la producción de leche de 2,4 L/vaca/día. El aumento de producción de leche diaria pudo asociarse con un efecto probiótico en las vacas tratadas además de demostrarse que no impactó negativamente sobre la calidad de leche manteniéndose los valores manejados por el establecimiento.

Palabras clave: *Saccharomyces boulardii*, productividad, vacas lecheras

1. INTRODUCCION

Las vacas productoras de leche de elevada eficiencia productiva son sometidas a la inclusión de muchos aditivos para mejorar la producción de los animales, resaltando o mejorado las condiciones del tracto gastrointestinal (Troncoso 2015). Así mismo, la producción por kilo de leche de una composición aceptable es el factor más importante en la explotación lechera. En términos generales, el beneficio económico aumenta con el incremento de la producción por vaca (Caballero & Hervas 1995). Las recientes problemáticas con relación al uso de antibióticos en la producción animal con respecto a su bioacumulación en el cuerpo humano han obligado a usar los probióticos como una alternativa en la nutrición de rumiantes. (Boga & Gorgulu 2007). Es por esto que numerosos autores evalúan el uso de microorganismos probióticos como una alternativa en la nutrición de los rumiantes para incrementar el rendimiento lechero y combatir los patógenos en el sistema digestivo. En la literatura hay muchos estudios acerca de los efectos positivos del cultivo de levadura en la producción de leche como por ejemplo los de Dann et al. (2000) y en la composición de la leche de vacas lecheras y el ambiente ruminal (Kung 2001), donde demuestran que la aplicación de levaduras vivas en el alimento mejora la salud y la productividad de rumiantes. Podrían de esta forma utilizarse como una alternativa natural para influir en el rendimiento de estos animales. Entre los efectos informados están: incremento del consumo de alimentos y producción de leche. En este sentido se plantea que la utilidad de los cultivos de levaduras está en manipular la fermentación ruminal y la productividad de los rumiantes (Corcionivoschi et al., 2010).

La mayoría de los probióticos actualmente están constituidos por bacterias, sin embargo, es recomendable el uso de estos productos elaborados a partir de levaduras. Estas, aunque usualmente no son parte indígena del tracto gastrointestinal son capaces de crecer en este ecosistema, principalmente al nivel de rumen y su modo de acción viene dado por un mejoramiento en la palatabilidad de la dieta junto con la producción de vitaminas del

complejo B, aminoácidos esenciales, minerales quelatos, enzimas digestivas, acetatos y otras sustancias tales como lípidos, polipéptidos, glicolípidos, esteroides, y ergosterol. Entre las principales especies de levaduras empleadas como probióticos se encuentran *Saccharomyces boulardii* (reconocida como líder), *S. cerevisiae*, *Kluyveromyces lactis* y *K. fragilis* (Morales et al. 2004, Kumura et al. 2004).

La aflatoxina B₁ (AFB₁) es la aflatoxina más tóxica y prevalente a nivel mundial, causa aflatoxicosis aguda, tiene efecto carcinogénico y citotóxico en animales y humanos. Las vacas que ingieren alimentos contaminados con AFB₁ excretan aflatoxina M₁ (AFM₁) a través de la leche. La contaminación de los alimentos con AFB₁ y de los productos lácteos con AFM₁ son problemas universales que impactan negativamente la salud de los animales y el rendimiento productivo, así como, la salud pública (Shahbazi, 2017; Chen et al., 2019; Seid y Mama, 2019). La degradación o inactivación de las AFs en los alimentos balanceados y la leche puede realizarse por métodos físicos, químicos o biológicos y su propósito es reducir la biotransformación de la AFB₁ a AFM₁ en el animal para disminuir la transferencia hacia la leche o bien sobre la leche para reducir las concentraciones de AFM₁ (Ogunade et al., 2018; Intanoo et al., 2020; Kemboi et al., 2020). Las estrategias tecnológicas más prometedoras son el uso de adsorbentes biológicos como las levaduras (Jiang et al., 2018).

En trabajos previos y aplicados a diferentes especies de animales monogástricos se ensayó la levadura *S. boulardii* RC009 con demostradas propiedades probióticas que ejercieron un efecto promotor de la sanidad y de la productividad animal al ser incluidos en la dieta como alternativa a los antibióticos promotores de crecimiento.

El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar los efectos de la levadura probiótica *S. boulardii* RC009 sobre la producción y la composición de la leche de vacas lecheras además de determinar su efecto sobre la presencia de AFM₁ en leche.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Condiciones del ensayo

La investigación se llevó a cabo en un establecimiento localizado en el campo experimental de Don Paco SA en la localidad de Bengolea y comenzó en los primeros días del mes de mayo 2021, iniciando con un período preliminar de acondicionamiento a las condiciones del ensayo (5 días). Los primeros días de junio se comenzó con la administración de la levadura, teniendo el ensayo una duración de 30 días.

Se utilizaron cuatrocientas vacas lecheras Holstein multíparas que producían diariamente 24.0 ± 0.74 litros de leche.

Las condiciones climatológicas promedio del ensayo fueron precipitaciones de 0 a 76 mm con temperaturas que oscilaron entre 11 y 15°C durante el mes de mayo y las precipitaciones fueron de 2 a 26 mm con temperaturas promedios fueron de 8 a 12°C durante el mes de junio (Cámara de cereales de Córdoba, <https://www.bccba.org.ar/home/institucional/red-de-estaciones-meteorologicas>).

Los animales se sometieron a dos tratamientos, 1. control (n=200) se alimentaron con una dieta sin agregado de levadura y 2. probiótico (n=200) fueron alimentadas diariamente con su dieta normal y el agregado de *S. boulardii* RC009 (5×10^{11} UFC/T de alimento).

Durante el estudio se evaluó la producción diaria de leche. Se tomaron dos L de muestra de leche en envases estériles para su posterior procesamiento que fueron recolectadas los días 5, 10, 15 y 20 del ensayo para determinar su contenido bromatológico (lactosa, sólidos totales, materia grasa, proteína, punto de congelación, recuento de células somáticas y recuento de unidades formadoras de colonia) (AOAC 1998). Se dispuso de agua fresca libremente durante todo el período experimental.

Se determinó también la presencia de AFM₁ en las muestras de leche tomadas, para evaluar si la concentración de levadura administrada además de un efecto probiótico producía un efecto secuestrante de esta toxina.

2.2 Extracción y detección de aflatoxina M₁ en muestras de leche.

2.2.1 Extracción

Para la extracción de AFM₁ en leche se tomaron cinco mililitros (5 ml) de leche y se les adicionaron 20 ml de una mezcla de acetonitrilo y agua acidificada con 1% de ácido acético. Se agitó a 100 rpm durante 1 h a temperatura ambiente. Luego se agregaron 4 g sulfato de magnesio y 1,5 g acetato de sodio, se agitó y se centrifugó a 5000 rpm durante 10 min. La solución se congeló a -20°C durante toda la noche (O/N). Luego, se tomó la porción superior, se evaporó a sequedad y se almacenó a -20°C hasta su análisis. Antes de su análisis por HPLC-FLD, los extractos se resuspendieron en 500 µl de agua calidad HPLC.

2.2.2 Condiciones de realización de la cromatografía líquida con detector de fluorescencia

La detección y cuantificación se realizó según Sarlack y col. (2017) con modificaciones. Se utilizó un cromatógrafo Waters Alliance e2695 Separations Module, equipado con inyector automático, acoplado a un detector de fluorescencia Waters 2475 Multi λ. La separación cromatográfica se realizó a 25°C. Se utilizó una columna de fase reversa con sílica gel RP C18 Luna Phenomenex (150 x 4.6 mm 5 µm). La fase móvil fue una mezcla de agua: acetonitrilo: metanol (57:17:26, v/v/v). El caudal fue de 0.8 ml/min y el volumen de inyección fue de 20 µl. Las longitudes de onda de emisión y de excitación fueron 435 y 365 respectivamente. Se creó una curva de calibración inyectando 20 µl de diferentes concentraciones de soluciones estándares de AFM₁ (0,25- 15 ng/ml), siendo el tiempo de retención entre 6 - 7 min.

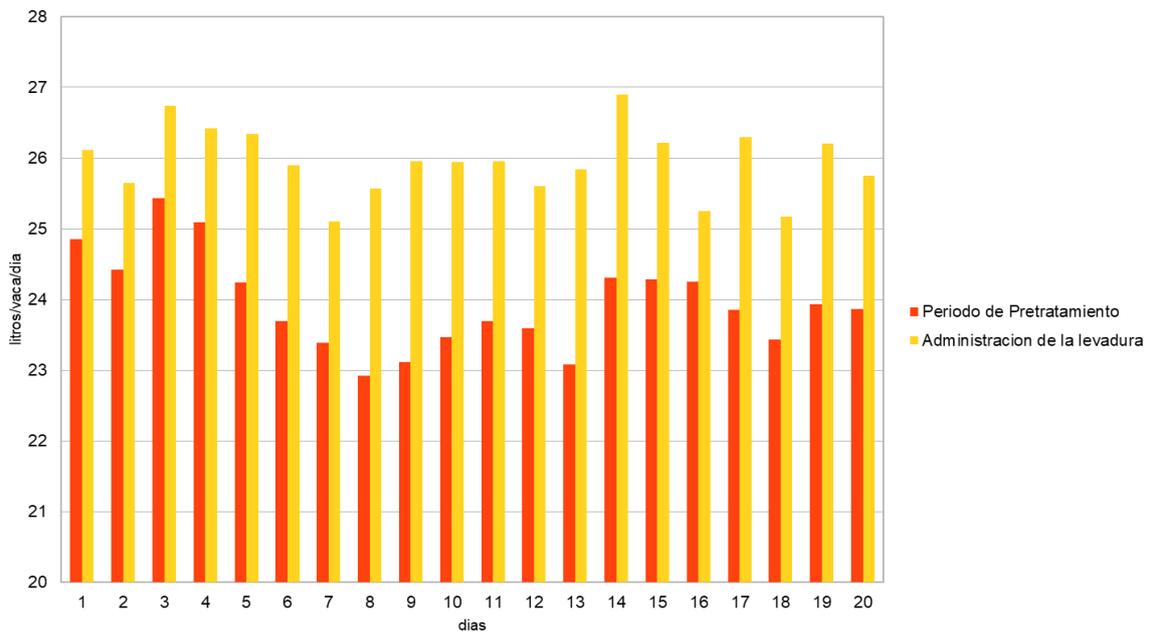
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados de la composición química de la leche se muestran en la Tabla 1. Se pudo observar que los parámetros de composición bromatológica de la leche no fueron alterados por la presencia de la levadura probiótica como aditivo en la alimentación diaria. Estos valores se mantuvieron dentro de los valores establecidos para la aceptación de leche de vaca. La FAO establece que las grasas constituyen alrededor del 3% al 4% del contenido sólido de la leche de vaca, las proteínas aproximadamente el 3,5% y la lactosa el 5%, pero la composición química bruta de la leche de vaca varía según la raza. Así mismo, el código alimentario argentino establece que los valores de células somáticas no deben superar los 750000 células/cm³, y el recuento total de unidades formadoras de colonias(UFC) a los 30°C no debe superar las 500000 UFC/cm³ (Código Alimentario Argentino , cap. VIII, alimentos lácteos). Los resultados obtenidos en el presente trabajo coinciden con Boga y Gorgolu (2007) donde la suplementación con *S. cerevisiae* (2.25×10^9 UFC/g) en la dieta diaria de vacas lecheras durante 21 días no modificó la composición de la leche.

Tabla 1. Composición bromatológica de las muestras de leche de acuerdo a los muestreos realizados.

| Muestras | Grasas (%) | Proteínas (%) | Células somáticas (x 1000 cél/mL) | Recuento de bacterias totales (x 1000 UFC/mL) | Lactosa (g/100 g) | Sólidos totales (g/100 g) | Punto de congelación (°C) |
|----------|------------|---------------|-----------------------------------|---|-------------------|---------------------------|---------------------------|
| M1 | 4,09 | 3,37 | 232 | 20 | 4,79 | 12,99 | -0,521 |
| M2 | 3,97 | 3,32 | 154 | 30 | 4,87 | 12,89 | -0,536 |
| M3 | 3,96 | 3,32 | 273 | 31 | 4,92 | 12,94 | -0,535 |
| M4 | 3,94 | 3,35 | 225 | 19 | 4,89 | 12,91 | -0,515 |
| M5 | 3,95 | 3,24 | 219 | 34 | 4,83 | 12,76 | -0,524 |

La Figura 1 muestra la producción de leche por vaca y por día obtenida de los animales control y los que recibieron la levadura probiótica.



*Cada día corresponde a un promedio de las 200 vacas ordeñadas

Figura 1. Producción de leche por vaca y por día obtenida de los animales control y los que recibieron la levadura probiótica.

Cuando las muestras de leche obtenidas durante el tratamiento fueron comparadas con aquellas provenientes del período durante el cual no fue aplicado el probiótico, se observó un incremento en el rendimiento en la producción de leche de 2,4 L/vaca/día. Este resultado representa un aumento del 10% en el rendimiento total de leche diaria. Resultados similares fueron obtenidos por Hossain et al. (2014) quienes informaron un aumento en la producción de leche de 0,3 L/día/animal, lo cual correspondía a un 8,8% de aumento de la producción diaria media después alimentación con una levadura probiótica *S. cerevisiae* (3×10^9 UFC/g con adición de enzimas, vitaminas, aminoácidos y oligosacáridos). También Lehloenya et al. (2007) informaron un aumento similar al obtenido en este trabajo (9%) en la producción de leche, pero solo cuando se evaluó una mezcla de levadura comercial Diamond V XP y *Propionibacterium* sp., ya que cuando evaluaron la levadura comercial sola vieron un aumento de entre el 1% y el 5%. En otro estudio, Bruno et al. (2009) informaron que las

vacas alimentadas con un cultivo de *S. cerevisiae* (30 g/día) produjo más de 1,2 L/día, pero a diferencia de nuestro trabajo, estas vacas recibieron el agregado de somatotropina exógena cada 14 días. Más recientemente, Shreedhar et al. (2016) evaluaron el efecto de un probiótico multicepa mezclando levaduras con bacterias lácticas (*S. cerevisiae* y *L. sporogenes*) en el rendimiento y composición de la leche de vacas y comprobaron que comparado con el período sin aplicación del aditivo se incrementó el rendimiento en la producción de leche en los grupos tratados con el probiótico. Por otra parte, en estos mismos grupos, disminuyó el punto de congelación, lo cual indicaba el incremento de los sólidos totales en la leche, comparados con el grupo control.

Con respecto a los valores de AFM₁ en leche, no se observó influencia en las concentraciones de la misma en las diferentes muestras de leche (Tabla 2), hipotetizándose que la concentración administrada de *S. boulardi* RC009 pudo no ser suficiente para que actuara como adsorbente de micotoxinas, los cuales suelen ser utilizados en dosis de hasta el 2% de la cantidad total de alimento suministrada al animal.

Tabla 2. Concentraciones de aflatoxina M₁ en leche

| <i>Muestras</i> | <i>Concentración AFM₁</i> <i>(ng/mL)</i> |
|-----------------|--|
| <i>M1</i> | 28,84 |
| <i>M2</i> | 29,81 |
| <i>M3</i> | 30,55 |
| <i>M4</i> | 31,67 |
| <i>M5</i> | 30,34 |

Son pocos los estudios que evalúan el uso de levaduras probióticas en alimentación bovinas para reducir los niveles de AFM₁ en leche, pero los valores encontrados en este

trabajo dan indicio de que hay incidencia de esta toxina en leche y que por lo tanto es necesaria la aplicación de microorganismos capaz de reducir estos niveles. Autores, mostraron que levaduras como (*S. cerevisiae*, *Kluyveromyces marxianus* y *Pichia kudriavzevii*) en una concentración de 35 g/vaca/día tienen una capacidad desintoxicante de AFB₁ del 85,0%, y por lo tanto se reduce la tasa de transferencia a AFM₁ a 0,94% en vacas tratadas versus 1,65% para el grupo de vacas que no recibieron adsorbentes mediante la dieta (Jiang et al., 2018, Intanoo et al., 2018)

CONCLUSIÓN

El aumento en el rendimiento de producción de leche diaria se asocia a un efecto probiótico en las vacas tratadas con *S. boulardii* RC009. Además de demostrarse que no alteró la calidad de la leche desde el punto de vista físico-químico, manteniéndose los valores manejados por el establecimiento. Se necesitan más estudios para demostrar la concentración del probiótico adecuada para que sea utilizado como un adsorbente eficaz de AFM₁. Comparando con productos comerciales secuestrantes de micotoxinas, las concentraciones que se utilizan varían entre 5 y 10 veces más que las utilizadas en este estudio.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a BIOFEED TECH SAS por la producción a escala industrial del probiótico ensayado, que comercialmente se denomina PROBIO.SACCH.

FINANCIAMIENTO

Este estudio fue subsidiado por SECyT - UNRC, PIP-CONICET y FONCY-PICT.

REFERENCIAS

Boga M, Gorgulu M. Efecto de probióticos basados en *Lactobacillus* sp. y *Lactobacillus* sp. más levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) en el rendimiento y la composición de la leche de vacas lecheras. *Rev Cubana Ciencia Agr* 2007; 41(4), 323-7.

Bruno RGS, Rutigliano HM, Cerri RL, Robinson PH, Santos JEP. Effect of feeding *Saccharomyces cerevisiae* on performance of dairy cows during summer heat stress. *Animal and Feed Science Technology*. 2009; 150:175- 186.

Caballero H, Herbas T. Producción lechera en la sierra ecuatoriana. Ministerio de Agricultura, Quito, Ecuador. 1995.

Chen, W., Huang, Z., Hu, S., Peng, J., Liu, D., Xiong, Y., Xu, H., Wei, H., & Lai, W. (2019). Invited review: advancements in lateral flow immunoassays for screening hazardous substances in milk and milk powder. *Journal of Dairy Science*, 102 (3), 1887-1900. doi:10.3168/jds.2018-15462.

Corcionivoschi, N., Drinceanu, D., Pop, I. M., Stack, D., Stef, L., Julean, C., & Bourke, B. (2010). The effect of probiotics on animal health. *Animal Science and biotechnologies*, 43(1), 35-41.

Dann, H.M., Drackley, J.K., McCoy, G.C., Hutjens, M.F. & Garrett, J.E. 2000. Effects of yeast culture (*Saccharomyces cerevisiae*) on prepartum intake and milk production of Jersey cows. *J. Dairy Sci.* 83: 123.

Hossain, F. M. A., Islam, M. M., Ara, A., & Ilyas, N. (2014). Supplementing probiotics (*Saccharomyces cerevisiae*) in multiparous crossbred cows ration provoke milk yield and composition. *Online J. Anim. Feed Res*, 4(2), 18-24.

Intanoo, M., Kongkeitkajorn, M. B., Suriyasathaporn, W., Phasuk, Y., Bernard, J. K., & Pattarajinda, V. (2020). Effect of supplemental *Kluyveromyces marxianus* and *Pichia*

kudriavzevii on aflatoxin M1 excretion in milk of lactating dairy cows. *Animals*, 10 (4), Article 709. doi:10.3390/ani10040709.

Jiang, Y., Ogunade, I. M., Kim, D. H., Li, X., Pech-Cervantes, A. A., Arriola, K. G., Oliveira, A. S., Driver, J. P., Ferraretto, L. F., Staples, C. R., Vyas, D., & Adesogan, A. T. (2018). Effect of adding clay with or without a *Saccharomyces cerevisiae* fermentation product on the health and performance of lactating dairy cows challenged with dietary aflatoxin B1. *Journal of Dairy Science*, 101 (4), 3008-3020.

Kemboi, D.C., Antonissen, G., Ochieng, P. E., Croubels, S., Okoth, S., Kangethe, E. K., Faas, J., Lindahl, J. F., & Gathumbi, J. K. (2020). A review of the impact of mycotoxins on dairy cattle health: challenges for food safety and dairy production in Sub-Saharan Africa. *Toxins*, 12 (4), Article 222. doi:10.3390/toxins12040222.

Kumura, H.; Tanoue, M.; Tsukahara, M.; Tanaka, T. y Shimazaki, K. Screening of dairy yeast strains for probiotic applications. *J. Dairy Sci.* 87: p. 4050-4056, 2004.

Kung, L.Jr. 2001. Direct-Fed microbials for dairy cows. En: *Proceedings, 12th Annual Florida Ruminant Nutrition Symposium*, pp 22.

Lehloenya KV, Stein DR, Allen DT, Selk GE, Jones DA, Aleman MM, et al. Effect of feeding yeast and propionibacteria to dairy cows on milk yield and components, and reproduction. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*. 2007; 92:190-202.

Morales, J. L. Aplicación de un suplemento probiótico en la recuperación de un reemplazo de ponedora. *IV Congreso de Avicultura, Stgo. de Cuba, 2004*.

Ogunade, I.M., Martinez-Tupia, C., Queiroz, O. C. M., Jiang, Y., Drouin, P., Wu, F., Vyas, D., & Adesogan, A. T. (2018). Silage review: mycotoxins in silage: occurrence, effects, prevention, and mitigation. *Journal of Dairy Science*, 101 (5), 4034-4059. doi:10.3168/jds.2017-13788.

Seid, A., & Mama, A. (2019). Aflatoxicosis and occurrence of aflatoxin M1 (AFM1) in milk and dairy products: a review. *Austin Journal of Veterinary Science & Animal Husbandry*, 6 (1), Article 1054.<https://austinpublishinggroup.com/april-2019/published-articles-3.php>.

Shahbazi, Y. (2017). Aflatoxin M1 contamination in milk and dairy products: implications on human health. In R. R. Watson, R.J. Collier, & V. R. Preedy (Eds), *Nutrients in dairy and their implications on health and disease* (pp. 237-250). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809762-5.00019-X>.

Shreedhar, J. N., Patil, M., & Kumar, P. (2016). Effect of probiotics supplementation on milk yield and its composition in lactating Holstein Fresien and Deoni cross bred cows. *Journal of Medical and Bioengineering* Vol, 5(1).

Troncoso H. El uso de aditivos en la alimentación de bovinos. (FU. Depto. de Nutrición Animal y Bioquímica, Ed.) *Sitio Argentino de Producción Animal*. 2015; (46): 1-3. Recuperado el 01 de 12 de 2016, de http://www.produccionanimal.com.ar/informacion_tecnica/invernada_promotores_crecimiento/74-Uso_Aditivos.pdf.