

Trabajo de Fin de Máster

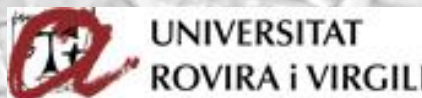
Máster interuniversitario en Nutrición y Metabolismo - 16ª edición

Potencial probiótico de cepas de *Geotrichum candidum* aisladas de quesos.

Autor: Lic. Alan Omar Granados Casas

Director: Dr. Alberto Miguel Stchigel Glikman

**Unidad de Micología y Microbiología Ambiental, Facultad de
Medicina y Ciencias de la Salud, Universitat Rovira i Virgili**



Contenido

| | |
|---|----|
| Resumen | 1 |
| Abstract | 1 |
| Introducción | 2 |
| El queso | 2 |
| Quesos maduros | 3 |
| Microbiología del queso | 3 |
| <i>Geotrichum candidum</i> | 5 |
| <i>Geotrichum candidum</i> y el queso..... | 7 |
| Probiótico..... | 8 |
| <i>Geotrichum candidum</i> como probiótico | 9 |
| Hipótesis | 10 |
| Objetivo general | 10 |
| Objetivos específicos | 10 |
| Materiales y métodos | 11 |
| Aislamiento e identificación preliminar de hongos a partir de quesos..... | 11 |
| Extracción de ADN fúngico total, amplificación y secuenciación de la región ITS-LSU..... | 12 |
| Identificación y análisis filogenético de las cepas fúngicas..... | 12 |
| Identificación molecular de las cepas bacterianas a emplear en ensayos de antibiosis..... | 13 |
| Ensayos de antibiosis mediante cultivo dual <i>in vitro</i> | 14 |
| Infección y pre-tratamiento de la línea celular (macrófagos). | 15 |
| Supervivencia intracelular de las bacterias. | 15 |
| Daño celular inducido por las bacterias: cuantificación del LDH..... | 16 |
| Análisis estadístico. | 16 |
| Resultados | 17 |
| Morfología colonial de las cepas de hongo aisladas de quesos. | 17 |
| Identificación molecular de las cepas de hongo aisladas de quesos..... | 18 |
| Re-identificación molecular de las cepas bacterianas. | 19 |
| Utilización de esculina. | 20 |
| Acción inhibitoria de las cepas de <i>G. candidum</i> sobre las bacterias. | 20 |
| Supervivencia intracelular bacteriana. | 22 |
| Evaluación del daño celular | 23 |
| Discusión | 24 |
| Conclusión | 26 |
| Bibliografía | 27 |
| Anexos | 30 |

Resumen

Geotrichum candidum, un hongo utilizado en la elaboración de ciertos quesos, podría ser un interesante microorganismo probiótico. Existen ciertos estudios sobre su actividad antimicrobiana en infecciones bacterianas producidas en peces, pero no en humanos. El objetivo del presente estudio fue evaluar la actividad probiótica de *Geotrichum candidum* aislado de diferentes tipos de queso. Doce cepas fueron aisladas e identificadas mediante amplificación y secuenciación por PCR de la región ITS-LSU. Cuatro de dichas cepas fueron seleccionadas para evaluar su potencial antimicrobiano frente a siete bacterias patógenas mediante la técnica de "líneas cruzadas". También se estudió el efecto protector sobre un modelo *in vitro* de infección bacteriana utilizando una línea celular de macrófagos, evaluando la supervivencia intracelular de la bacteria y el daño celular en el macrófago mediante la liberación de la enzima lactato deshidrogenasa. Los resultados demuestran que *Geotrichum candidum* tiene actividad antibacteriana y protectora sobre los macrófagos infectados, mostrando una reducción del número de bacterias, así como una disminución de la mortalidad de los macrófagos. Conclusión: *Geotrichum candidum* posee actividad antibacteriana y es capaz de reducir el daño ocasionado por las bacterias a los macrófagos.

Abstract

Geotrichum candidum, a fungus used to make certain cheeses, could be an interesting probiotic microorganism. There are certain studies on its antimicrobial activity in bacterial infections produced in fish, but not in humans. The objective of the present study was to evaluate the probiotic activity of *Geotrichum candidum* isolated from different types of cheese. Twelve strains were isolated and identified by amplification and sequencing by PCR of the ITS-LSU region. Four of these strains were selected to evaluate their antimicrobial potential against seven pathogenic bacteria using the "Cross-Streak" method. The protective effect on an *in vitro* model of bacterial infection was also studied using a macrophage cell line, evaluating the intracellular survival of the bacteria and the cellular damage in the macrophage by releasing the enzyme lactate dehydrogenase. The results show that *Geotrichum candidum* has antibacterial and protective activity on infected macrophages, showing a reduction in the number of bacteria, as well as a decrease in macrophage mortality. Conclusion: *Geotrichum candidum* has antibacterial activity and can reduce the damage caused by bacteria to macrophages.

Introducción

El queso

El REAL DECRETO 1113/2006, de 29 de septiembre, por el que se aprueban las normas de calidad para quesos y quesos fundidos, define a los quesos como: "... el producto fresco o madurado, sólido o semisólido, obtenido de la leche, de la leche total o parcialmente desnatada, de la nata, del suero de mantequilla o de una mezcla de algunos o de todos estos productos, coagulados total o parcialmente por la acción del cuajo u otros coagulantes apropiados, antes del desuerado o después de la eliminación parcial de la parte acuosa, con o sin hidrólisis previa de la lactosa, siempre que la relación entre la caseína y las proteínas séricas sea igual o superior a la de la leche".

Queso es el nombre genérico de un grupo de productos alimenticios basados en la fermentación de la leche, el cual se produce en todo el mundo con una gran diversidad de sabores, texturas y formas, se han descrito y fotografiado cerca de 750 variedades de queso (Harbutt, 2009). Se cree que el queso apareció hace unos 8.000 años cerca del actual Irak durante la revolución agrícola, donde se domesticaron ciertas plantas y animales, entre los cuales se encontraban las cabras y ovejas los cuales eran utilizados para proveerse de carne, leche, pieles y lana. Inicialmente, el ganado fue utilizado como fuerza de trabajo y no como fuente de leche. Pronto se reconoció el valor nutritivo de la leche producida por los animales domésticos y los productos lácteos se convirtieron en componentes importantes de la dieta humana (Fox *et al.*, 2016).

Los pasos principales en la elaboración del queso son:

1. Selección, estandarización y (en algunos casos) la pasteurización de la leche.
2. Acidificación, usualmente mediante la producción de ácido láctico *in situ* mediante la acción metabólica de bacterias.
3. Coagulación de la leche mediante la acidificación y proteólisis limitada.
4. Deshidratación del coágulo para producir la cuajada del queso, esta se realiza mediante una variedad de técnicas.
5. Dar forma a la cuajada.

6. En algunas variedades de quesos se deja madurar la cuajada la cual, desarrollando así el aroma, el sabor y la textura característica del queso.

Quesos maduros

El mismo REAL DECRETO 1113/2006 define al queso madurado cómo “...el que, tras el proceso de fabricación, requiere mantenerse durante cierto tiempo a una temperatura y en condiciones tales que se produzcan los cambios físicos y químicos característicos del mismo. La palabra madurado podrá sustituirse por los calificativos según el grado de maduración alcanzado por el producto a la salida de fábrica que figuran en el siguiente cuadro:”

Tabla 1. Denominaciones facultativas del queso según el grado de maduración.

| Denominaciones facultativas | Peso > 1,5 kg | Peso ≤ 1,5 kg |
|-----------------------------|---------------------------|---------------|
| | Maduración mínima en días | |
| Tierno | | 7 |
| Semicurado | 35 | 20 |
| Curado | 105 | 45 |
| Viejo | 180 | 100 |
| Añejo | 270 | |

Las características únicas de los quesos se desarrollan durante su maduración como resultado de un conjunto de reacciones bioquímicas. Los cambios que ocurren en la maduración tanto en el sabor, en el aroma, y textura del queso están determinados en gran medida por el proceso de fabricación, es decir, por la composición, humedad, NaCl, pH, y en muchos casos por el inóculo secundario añadido a la leche o a la cuajada. Los cambios bioquímicos que ocurren durante la maduración son causados por los agentes coagulantes, las enzimas lácteas (proteasas y lipasas), los microorganismos iniciadores y sus enzimas, microorganismos secundarios y sus enzimas, y las bacterias ácido lácticas no iniciadoras (Fox *et al.*, 2016).

Microbiología del queso

Existen diversas variedades de quesos, lo que es reflejo de la versatilidad de los diversos microorganismos utilizados en su elaboración. Cada fábrica gestiona el ecosistema microbiano adoptando mezclas indefinidas, cultivos artesanales y parámetros de elaboración del queso sobre la base de la experiencia personal y observación empírica (“FAQ Microbes Make Cheese Rep. an Am. Acad. Microbiol. Colloq. Held Washington, DC, June 2014”, 2015). Detrás de un buen queso hay un gran microbioma, el cual consiste en un ecosistema dinámico el

cual depende del tipo específico de queso a elaborar, sus condiciones de producción, la composición de microorganismos iniciadores y no iniciadores que se desarrollan durante la fermentación y maduración (Ercolini, 2020).

Las bacterias ácido lácticas desempeñan diferentes funciones en la elaboración del queso, algunas especies participan en el proceso de fermentación, y otras están implicadas en la maduración del queso. Las bacterias ácido lácticas que fermentan la lactosa produciendo altas concentraciones de ácido láctico se denominan bacterias ácido láctico iniciadoras, este grupo incluye géneros bacterianos como: *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc* spp., *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* y *Lactobacillus helveticus*, estas se cultivan previamente en leche u otro medio y se agregan deliberadamente a la leche al comienzo de la fabricación del queso. Las bacterias responsables del proceso de maduración son denominadas bacterias ácido lácticas no iniciadoras, este incluye a *Lactobacillus farciminis*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus rylactobateri* y *Lactobacillus brevis* (Hayaloglu, 2016; Settanni & Moschetti, 2010).

Algunas variedades de queso contienen microbiota secundaria, no fermentadora de lactosa, cuya función es producir algún cambio característico en el queso, por ejemplo, el crecimiento en la superficie del queso maduro, la producción de CO₂, la producción de propionato o acetato en el queso; el CO₂ es el responsable de la formación de hoyos en algunos quesos, y el propionato les da un sabor dulce. Por lo que el desarrollo del sabor está sujeto a la actividad metabólica de la microbiota secundaria durante la maduración. Varios microorganismos están involucrados como microbiota secundaria, incluyendo bacterias de los géneros *Agrococcus*, *Arthrobacter*, *Brevibacterium*, *Brachybacterium*, *Corynebacterium*, *Microbacterium*, *Propionibacterium*, *Staphylococcus* y *Micrococcus* spp., y hongos como *Geotrichum candidum*, *Penicillium camemberti* y *Penicillium roqueforti* (Fox et al., 2016).

Existe una diferente composición microbiana en la pasta y en la corteza de los quesos. Esto se debe en parte a la disponibilidad de oxígeno; la presencia de oxígeno en la superficie del queso permite el crecimiento de organismos aeróbicos que no pueden crecer más profundamente donde hay menos oxígeno.

La microbioma interior de los quesos consiste principalmente en cultivos iniciadores de bacterias ácido lácticas, así como una o más bacterias ácido lácticas no iniciadoras, el microbioma de la corteza varía según el tipo de corteza, el grado de envejecimiento y las condiciones ambientales (Choi *et al.*, 2020; Gori *et al.*, 2013; Yeluri Jonnala *et al.*, 2018).

La capacidad de los microorganismos para establecerse en la superficie de los quesos depende de diversos factores. Uno de ellos es la capacidad de utilizar el queso como medio de cultivo, tomando en cuenta que la composición y estructura de este medio cambia a lo largo de la maduración, Además, los microorganismos tienen que adaptarse a la presencia de otros microorganismos, con los que pueden presentar interacciones positivas o negativas. La capacidad de sobrevivir en el entorno de elaboración del queso es otra característica importante, ya que favorece la posterior recolonización del queso. Otros factores que también pueden influir sobre ellos son el pH, concentración de oxígeno, la concentración de sal, la temperatura, y la presencia de inhibidores entre otros (Monnet *et al.*, 2015).

Así mismo, el REAL DECRETO 1113/2006 define al queso madurado con mohos (= hongos filamentosos) cómo "...aquel en el que la maduración se produce, principalmente, como consecuencia del desarrollo característico de mohos en su interior, en la superficie o en ambas partes. Dicha denominación podrá sustituirse por la de «queso azul» o «queso de pasta azul», cuando corresponda" (*Real Decreto 1113/2006, de 29 de Septiembre, Por El Que Se Aprueban Las Normas de Calidad Para Quesos y Quesos Fundidos*, 2015).

Geotrichum candidum

La primera identificación de este hongo fue hecha por Fresenius (1850) a partir de una muestra de la leche, denominándolo como *Oidium lactis*. Más tarde fue reclasificado como *Oospora lactis* por Saccardo (1880). Y finalmente Wouters (1966) lo ubicó en el género *Geotrichum*, estableciendo su nombre actual, *Geotrichum candidum*.

Geotrichum candidum designa la forma asexual (anamorfo) del hongo, la cual se encuentra en abundancia en la naturaleza, mientras que el nombre

Galactomyces candidum designa la forma sexual (teleomorfo), menos frecuente (Sybren De Hoog & Smith, 2004).

Geotrichum candidum es un hongo de amplia distribución geográfica, siendo aislado de agua, suelo y aire, así como alimentos de consumo diario como los cereales, frutos maduros, leche, kéfir, y, especialmente, la superficie de quesos maduros tales como el Brie, el Camberbert, y el Pont-L'Évêque, y en menor proporción en quesos como Epoisses, Mont d'Or, Reblochon, Saint-Nectaire y Taleggio (Fröhlich-Wyder *et al.*, 2019; Perkins *et al.*, 2020).

Geotrichum candidum presenta una temperatura óptima de crecimiento a 25 °C, sin embargo, es capaz de crecer en un rango de temperaturas de 5 a 38 °C. Además, puede desarrollarse en un amplio rango de pH, entre 2.2 y 11. *Geotrichum candidum* tiene la habilidad de crecer usando diferentes fuentes de carbono, tales como D-glucosa, lactato, D-galactosa, D-xilosa, L-sorbosa, y D-manitol. Su crecimiento puede verse afectado negativamente por concentraciones del 1 al 2 % de NaCl e inhibido a una concentración del 5 al 6 %. Finalmente, *G. candidum* es una especie que tolera las bajas concentraciones de O₂ y altas concentraciones de CO₂ (Desmaures, 2014; Eliskases-Lechner *et al.*, 2011).

Geotrichum candidum es uno de los agentes responsables del deterioro de los quesos frescos, zumos de frutas y hortalizas frescas. Se considera un microorganismo comensal de los sistemas digestivo de los humanos y del ser humano, y raramente se comporta como un patógeno oportunista. Las principales patologías causadas por *G. candidum* en el humano son infecciones pulmonares y bronquiales, conocidas como geotrichosis; no obstante, tan solo han sido reportados treinta casos de infecciones por *G. candidum* en los últimos 35 años. La mayoría de estos casos se referían a pacientes inmunodeprimidos (Eliskases-Lechner *et al.*, 2011; Gente *et al.*, 2006).

Geotrichum candidum crece rápidamente en medios que son comúnmente usados en micología. Sus colonias alcanzan los 70 mm de diámetro a los 7 días a 25 °C, presentando un color blanquecino o crema, son lisas, a menudo membranosas y pueden presentar un olor dulce. Microscópicamente, las hifas están ramificadas dicotómicamente (bifurcadas) y miden entre 7 y 11 µm de

ancho. Los artroconidios se forman por la ruptura de hifas, son cilíndricos, en forma de barril o elipsoidales, y la mayoría tienen un tamaño de 6-12 x 3-6 μm . No forma blastoconidios por gemación (Eliskases-Lechner *et al.*, 2011).

Dos morfotipos han sido descritos, dependiendo de las condiciones de cultivo: un morfotipo similar a una levadura, caracterizada por colonias lisas de color crema que producen abundantes artrosporas, y el morfotipo filamentoso, con colonias filamentosas, de color blanco y con predominio de hifas vegetativas (Fröhlich-Wyder *et al.*, 2019).

En la actualidad se reconocen 22 especies de *Geotrichum* (Eliskases-Lechner *et al.*, 2011). La actual taxonomía de *G. candidum* de la forma sexual (teleomorfo) es la siguiente: Ascomycota (filo), Hemiascomycetes (clase), Saccharomycetales (orden), Dipodascaceae (familia), *Galactomyces* (género). Y para la forma asexual (anamorfo) la taxonomía es *Candidaceae* (familia) y *Geotrichum* (género) (Sybren De Hoog & Smith, 2004). En el Anexo 1 se muestra la evolución del nombre de la especie *Geotrichum candidum* y varios sinónimos encontrados.

***Geotrichum candidum* y el queso**

Las levaduras juegan un papel importante en la fabricación tradicional de todos los quesos madurados. Estas están presentes en la leche cruda, así como en el ambiente lácteo. Por lo tanto, estos organismos contribuyen de manera significativa al sabor y al aspecto típico de los quesos. Las levaduras que presentan mayor prevalencia en la maduración de quesos son *Debaryomyces hansenii*, *Kluyveromyces marxianus* y *G. candidum* (Fröhlich-Wyder *et al.*, 2019; Monnet *et al.*, 2015).

La superficie del queso proporciona un hábitat para el desarrollo de las levaduras debido a la presencia de sustratos para su crecimiento, tal como el ácido láctico y compuestos nitrogenados que emergen de la glucólisis y la proteólisis bacteriana. Las levaduras en la superficie del queso son capaces de metabolizar oxidativamente el ácido láctico, lo que da como resultado a un aumento pH. También son capaces de desaminar o descarboxilar aminoácidos a sus productos correspondientes lo que también contribuye a un aumento del pH (Fröhlich-Wyder *et al.*, 2019). Tal es el caso de *G. candidum* y *D. hansenii*, ambas levaduras contribuyen a la desacidificación de la cuajada, esto debido al

consumo preferentemente de lactato y aminoácidos, favoreciendo el crecimiento de bacterias de maduración aeróbicas sensibles a los ácidos (Monnet *et al.*, 2015).

El desarrollo de *G. candidum* tiene un papel muy importante en la formación de la costra blanca característica de algunos quesos, además contribuye fuertemente al desarrollo de sabores típicos de quesos, esto debido al catabolismo de aminoácidos, dando como resultado compuestos sulfurados los cuales son catabolizados a L-metionina, por otra parte, a partir de los ácidos grasos libres *G. candidum* puede producir varios compuestos volátiles o precursores de compuestos aromáticos tales como las metilcetonas (Eliskases-Lechner *et al.*, 2011; Fröhlich-Wyder *et al.*, 2019).

También se ha demostrado que la actividad de aminopeptidasa de *G. candidum* ayuda a reducir el amargor causado por *Penicillium camemberti* en los quesos tipo Camembert. Recientemente, un análisis de metatranscriptoma mostró que los efectos combinados de *G. candidum* y *P. camemberti* son cruciales para el desarrollo de las propiedades sensoriales típicas de los quesos tipo Camembert, asimismo se ha demostrado que *G. candidum* es un buen competidor contra microorganismos no deseados como *Mucor* spp., y tiene una acción antagonista contra patógenos como *Listeria monocytogenes* (Eliskases-Lechner *et al.*, 2011; Lessard *et al.*, 2014; Perkins *et al.*, 2020).

Probiótico

De acuerdo con la asociación científica internacional para probióticos y prebióticos (ISAPP), probiótico puede definirse como los “microorganismos vivos que, cuando se administran en cantidades adecuadas, confieren un beneficio para la salud del huésped”. Pero ésta definición debe restringirse a los microorganismos que han sido probados en cuanto a su inocuidad, además de demostrar que brindan un beneficio para la salud (Hill *et al.*, 2014).

Los probióticos se han utilizado para la prevención y el tratamiento de diversas afecciones. Algunos de sus efectos beneficiosos para la salud han sido validados, mientras que otros usos están respaldados por estudios de valor limitado. Los efectos de los probióticos son cepa-dependiente: los probióticos pueden variar entre sí, y se pueden ver mayores beneficios con un lote de

probióticos en comparación con otro, debido a la complejidad del control de calidad con microorganismos vivos.

El control de las enfermedades asociadas con el tracto gastrointestinal han sido el objetivo primario de la consumición de probióticos, principalmente porque es conocida su capacidad para restaurar la microbiota intestinal. La evidencia más sólida de la utilidad de los probióticos se encuentra en el tratamiento de ciertas enfermedades diarreicas, especialmente la diarrea causada por rotavirus en los niños. Aunque los resultados de los ensayos clínicos son contradictorios, la terapia probiótica también puede ser beneficiosa en el tratamiento de la enfermedad de Crohn, de la colitis ulcerosa, del síndrome del intestino irritable (SII) y de las infecciones por *Helicobacter pylori*. También se ha demostrado que los probióticos disminuyen los síntomas de la intolerancia a la lactosa. Otras enfermedades no asociadas con el tracto gastrointestinal, o con la microbiota intestinal, tales como problemas urogenitales (vaginosis bacteriana, vaginitis por candidiasis, infecciones del tracto urinario) también pueden responder positivamente al uso de probióticos. También se ha estudiado su función en el tratamiento de infecciones de las vías respiratorias superiores (otitis media aguda), la reducción en la incidencia del cáncer de colon y vejiga, y la de los síntomas de las reacciones alérgicas, además de estimular la respuesta inmune y prevenir de caries (George Kerry *et al.*, 2018; Williams, 2010).

***Geotrichum candidum* como probiótico**

Existen pocos estudios sobre el papel probiótico de *G. candidum*, la gran mayoría de ellos enfocados a la acuicultura. *Geotrichum candidum* fue estudiado por primera vez en acuicultura por Dabrowski *et al.*, (1980), informando del crecimiento elevado y la mejora en el índice de transformación del alimento para la trucha arcoíris cuando el 50% de la harina de pescado en la dieta fue reemplazada con *G. candidum*. Posteriormente, estudios realizados en rohu (*Labeo rohita*) confirmaron que *G. candidum* podía colonizar el tracto gastrointestinal del huésped, facilitando el crecimiento de las bacterias ácido lácticas y excluyendo competitivamente las bacterias patógenas, así como sus productos, además de influir en el crecimiento, la inmunidad y la resistencia a las enfermedades contra los patógenos en condiciones de control.

Posteriormente otro estudio evaluó la aplicación comercial de *G. candidum* encapsulado como complemento alimenticio para peces rohu (Amir *et al.*, 2019), los resultados indicaron una mejora significativa de la tasa de crecimiento, las actividades de las enzimas intestinales (proteasa, amilasa y celulasa) y los índices hemato-inmunológicos, así como regulación positiva de las proteínas de choque térmico (HSP70) de los tejidos musculares, intestinales y hepáticos y reducción de las actividades de la aspartato aminotransferasa y alanina aminotransferasa séricas, colesterol total y triglicéridos en comparación con los peces alimentados con una dieta basal. El estudio más reciente de *G. candidum* utilizado como probiótico en peces mostró una tasa de supervivencia más alta, un aumento en nivel de inmunoglobulina M (IgM), y una disminución significativa en la actividad de la aspartato transaminasa, de la lisozima y la alanina transaminasa (Noor-UI *et al.*, 2020).

Un estudio realizado con ratas observó los cambios en su microbiota intestinal al introducir en la dieta queso Camembert, cuya corteza contenía *G. candidum*. Los autores observaron cambios en el metabolismo de la microbiota intestinal, particularmente una disminución de la actividad azoreductasa así como y un aumento de la actividad mucolítica, y demostraron la supervivencia de los microorganismos ingeridos durante el tránsito intestinal (Lay *et al.*, 2004).

Hipótesis

Las cepas de *Geotrichum candidum* aisladas de queso presentan un posible potencial probiótico. Estas pueden mostrar actividad antimicrobiana contra bacterias patógenas humanas, así como un posible papel reductor del daño celular ocasionado por las mismas a los macrófagos.

Objetivo general

Evaluar la posible actividad probiótica de cepas del hongo *Geotrichum candidum* aisladas de diferentes tipos de quesos.

Objetivos específicos

- Comprobar el adecuado etiquetaje de los quesos, en lo referente a la indicación de la presencia de hongos y la denominación correcta de los mismos.

- Aislar e identificar los hongos presentes en la corteza de quesos.
- Demostrar la presencia de *G. candidum* en quesos los cuales no se menciona su presencia.
- Demostrar la actividad antimicrobiana de *Geotrichum candidum* frente a diferentes bacterias patógenas intestinales.
- Demostrar el efecto probiótico de *Geotrichum candidum* mediante la evaluación de la acción protectora sobre los macrófagos frente a infecciones bacterianas.

Materiales y métodos

Aislamiento e identificación preliminar de hongos a partir de quesos.

Las cepas fúngicas utilizadas en el presente trabajo fueron obtenidas a partir de doce quesos diferentes adquiridos en establecimientos comerciales de la ciudad de Reus (provincia de Tarragona, España). Dichos quesos son listados en el Anexo 2. Para su aislamiento, se cogió material de la corteza cada queso con un asa de siembra estéril, sembrándose a continuación mediante la técnica de estría escocesa (o por agotamiento del asa) en el medio de cultivo agar con extracto de papa dextrosa (*potato dextrose agar* = PDA) (Laboratorios Conda, Barcelona, España), contenido dentro de placas de Petri descartables estériles de 90 mm de diámetro. Todas las placas se incubaron a 25 °C durante 48 horas en oscuridad. Transcurrido dicho tiempo, las placas fueron examinadas con ayuda de un microscopio estereoscópico (Leica Wild M5A) para localizar las colonias fúngicas de interés. A partir de colonias aisladas, morfológicamente compatibles con *Geotrichum* spp., se procedió a su aislamiento en cultivo puro mediante el empleo de la técnica precedente. Finalmente, se cogió material a partir de colonias aisladas de cada una de las cepas con ayuda del asa de siembra, y se inocularon 3 tubos de ensayo conteniendo PDA inclinado en “pico de flauta” (*slant*) por cada una de ellas, incubándose en las condiciones previamente descritas. Posteriormente, se verificó que las cepas pertenecían presuntivamente al género *Geotrichum* mediante el estudio morfológico de sus estructuras vegetativas y reproductivas bajo el microscopio de campo claro. Para ello se montaron preparaciones microscópicas (*slides*), cogiendo material de las colonias con una aguja de disección estéril, y transfiriéndolo a un portaobjetos conteniendo una gota de medio de montaje apropiado (ácido láctico puro

(AppliChem, Panreac, Alemania)) y/o cotton blue en lactofenol (AppliChem, Panreac, Alemania). Posteriormente, se colocó un cubreobjetos y se observó con la ayuda de un microscopio Olympus BH-2 (Olympus Corporation, Tokio, Japón), en busca de hifas septadas, artroconidios prismáticos en largas cadenas y documentando la ausencia de células gemantes (produciendo blastoconidios). Para descartar la posibilidad de que las cepas pertenecieran a otros géneros similares, se les realizó la prueba de rápida de la ureasa (Seeliger, 1956), la que dio un resultado negativo para todas nuestras cepas.

Extracción de ADN fúngico total, amplificación y secuenciación de la región ITS-LSU.

Las cepas se sembraron en placas de Petri de 90 mm de diámetro conteniendo PDA por 7 días a 25 ± 1 °C y en oscuridad. El ADN genómico total se extrajo utilizando el kit FastADN (Bio101, Vista, CA), con el FastPrep FP120 (Thermo Savant, Holbrook, NY) siguiendo instrucciones del fabricante. El ADN se cuantificó utilizando Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, Madrid, España). Posteriormente, se amplificó la región espaciadora transcrita interna (ITS) y parte del gen 28 S del RNA ribosomal nuclear (LSU) con los cebadores ITS-5 (5' GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG 3'; *forward*) y LR5 (5' TCCTGAGGGAACTTCG 3'; *reverse*). Las amplificaciones por PCR se realizaron con un volumen total de 25 µL que contenían, 2 µL de ADN molde, 12.5 µL de reactivo Emerald, 0.5 µL del cebador *forward* y 0.5 µL del cebador *reverse* y 9.5 µL de agua estéril (VWR Chemicals BDH, Francia). Los parámetros de la amplificación fueron los siguientes: 1 ciclo de 5 min a 94 °C, 35 ciclos a 95 °C por 30 s, 53 °C por 1 min, 72 °C por 2 min, y una extensión final 72 °C por 7 min. Los productos de PCR se purificaron y almacenaron a -20 °C hasta su secuenciación. Se utilizaron los mismos pares de cebadores para obtener las secuencias en MacroGen España (MacroGen Inc., Madrid, España). Las secuencias consenso se obtuvieron utilizando el software SeqMan v. 7 (DNASStar Lasergene, Madison, WI, EE. UU.) (Magaña-Dueñas *et al.*, 2021).

Identificación y análisis filogenético de las cepas fúngicas.

La identificación molecular se realizó comparando las secuencias de los aislados obtenidos con las depositadas previamente en el Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) utilizando la herramienta de búsqueda de alineación local

básica (BLAST; <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Posteriormente, el alineamiento de la región ITS-LSU se realizó con el software MEGA (Análisis de Genética Evolutiva Molecular) v. 7.0., utilizando el algoritmo ClustalW. Finalmente, se construyó el árbol filogenético después de un análisis de máxima verosimilitud (ML). El modelo de sustitución para realizar los análisis de ML se calculó con la herramienta de modelos de sustitución de ADN del programa MEGA v. 7.0., escogiéndose el modelo Tamura Nei con distribución gamma. La robustez del árbol se calculó por el método de bootstrap a partir de 1000 réplicas (Hernández-Restrepo et al., 2013; Magaña-Dueñas et al., 2021).

Identificación molecular de las cepas bacterianas a emplear en ensayos de antibiosis.

Todas las cepas bacterianas utilizadas en el presente trabajo se encuentran listadas en el Anexo 3. Estas cepas forman parte de la colección de la Unidad de Micología y Microbiología Ambiental de la Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud, Universidad Rovira i Virgili (Reus, España). Las cepas se mantuvieron en caldo soya tripticasa (TSB) más glicerol (15%) a -80 °C, todas ellas identificadas previamente mediante pruebas bioquímicas estándar. Para la identificación a nivel molecular, las cepas bacterianas se sembraron en agar tripticasa de soya (TSA) (Pronadisa, España) contenidos en placas de Petri descartables de 90 mm de diámetro, y se incubaron durante 24 h a 37 °C. Posteriormente se procedió a la extracción del ADN mediante el kit InstaGene™ Matrix (Bio-Rad®), siguiendo las indicaciones de la casa comercial. Todas las cepas fueron verificadas a nivel de especie, mediante la secuenciación de un gen *housekeeping*, cuya naturaleza dependió del género presuntivo basado en la identificación bioquímica previa. El gen *rpoD* fue amplificado con los cebadores *rpoD70FS* (5' ACGACTGACCCGGTACGCATGTA 3'; *forward*) y *rpoD70RS* (5' ATAGAAATAACCAGACGTAAGTT 3'; *reverse*). La reacción de PCR fue realizada con 2 µl de ADN molde, 12.5 µl de Emerald, 0.5 µl del cebador *forward* y 0.5 µl del cebador *reverse*, por último, se agregaron 9.5 µl de agua estéril (VWR Chemicals BDH, Francia). Los parámetros de la amplificación fueron los siguientes: 1 ciclo de 5 min a 94 °C, 35 ciclos a 95 °C por 30 s, 53 °C por 1 min, 72 °C por 2 min, y una extensión final 72 °C por 7 min (Soler *et al.*, 2004). En el caso del gen 16s rRNA la amplificación se realizó con los cebadores

Anti 1 (5' AGAGTTTGATCATGGCTCAG 3'; *forward*) y S (5' GGTTACCTTGTTACGACTT 3'; *reverse*). La reacción de PCR fue realizada con 2 µl de ADN molde, 12.5 µl de Emerald, 0.5 µl de *primer forward* y 0.5 µl de *primer reverse*, por último, se agregaron 9.5 µl de agua estéril (VWR Chemicals BDH, Francia). Los parámetros de la amplificación fueron los siguientes: 1 ciclo de 5 min a 94 °C, 35 ciclos a 95 °C por 30 s, 53 °C por 1 min, 72 °C por 2 min, y una extensión final 72 °C por 7 min (Martínez-Murcia *et al.*, 1992). Los productos de la PCR se mantuvieron a -20 °C hasta el momento de la secuenciación. Se utilizaron los mismos pares de cebadores para obtener las secuencias en Macrogen España (Macrogen Inc., Madrid, España). Las secuencias consenso se obtuvieron utilizando el software SeqMan v. 7 (ADNStar Lasergene, Madison, WI, EE. UU.) Finalmente, se realizó una la identificación comparando las secuencias de nuestras cepas bacterianas con las del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) utilizando la herramienta BLAST.

Ensayos de antibiosis mediante cultivo dual *in vitro*.

Cuatro de las cepas fúngicas (FMR 18773, FMR 18774, FMR 18776 y FMR 18780). Fueron seleccionadas para evaluar su potencial antibacteriano. Dicha actividad se determinó mediante el método modificado de líneas cruzadas (*cross streak*), descrita previamente por (Kamat y Velho-Pereira, 2012). Para ello se utilizaron diferentes medios de cultivo, temperaturas de incubación y atmósferas: medio Mueller Hinton (Pronadisa, España; MH) a 25 °C en aerobiosis, medio Littman (LOA; sin cristal violeta) a 25 °C en aerobiosis y en microaerofilia, y agar con bilis y esculina (BEA; Becton Dickinson, USA) a 25 y 35 °C en microaerofilia y en anaerobiosis. Las cepas fúngicas se inocularon en una línea central única, y fueron incubadas en las condiciones descritas durante 5 días. Transcurrido dicho tiempo, las cepas bacterianas se sembraron mediante líneas perpendiculares al crecimiento del hongo, las placas fueron incubadas durante 24 horas a 37 °C. Posteriormente se realizaron las lecturas, observando las interacciones entre las cepas fúngicas y las bacterias. La siembra en BEA nos permitirá determinar el metabolismo de la esculina de las cepas fúngicas (Matos *et al.*, 2017). Las condiciones de microaerofilia se generaron utilizando un sobre de BD GasPak Campy Container System (Becton Dickinson, USA), y las de

anaerobiosis empleando un sobre de BioMérieux Genbox anaer (BioMérieux, France) (Pérez-Cataluña *et al.*, 2018).

Infección y pre-tratamiento de la línea celular (macrófagos).

Las células J774.1 (macrófagos de ratón BALB/C; Fernández-Bravo *et al.*, 2019) se mantuvieron en un matraz Falcon T75 de 250 mL (Corning, USA) como células adherentes en Dubelcco's Modified Eagle's Medium (DMEM; Biowest, Nuaille, Francia), suplementadas con 10 % de suero fetal bovino (FBS; Biowest, Nuaille, Francia) y 1% de penicilina/estreptomicina (P/S; Biowest, Nuaille, Francia) a 37 °C y 5% de CO₂. Antes de la infección, las células J7741.A se sembraron en placas de 6 pocillos en un volumen de 3 mL (1 × 10⁶ células / ml) que contenían DMEM libre de suero y sin antibióticos (condiciones de inanición de suero) durante 18 h, como se describió anteriormente (Murciano *et al.*, 2015). Para el estudio de la influencia de *G. candidum* como probiótico contra distintas cepas bacterianas en macrófagos, se añadió el hongo a una concentración de 2 × 10⁷ ufc/mL en las placas de 6 pocillos. Estas placas se incubaron durante 4 h a 37 °C y 5% de CO₂ (Sabbatini *et al.*, 2018). Tras la incubación los pocillos se lavaron con 500 µl de PBS estéril y posteriormente las células se infectaron con las distintas cepas bacterianas a MOI (*Multiplicity of Infection*) 10 y se incubaron a 37 °C con 5% de CO₂ durante 2 h (Fernández-Bravo *et al.*, 2019; Khodaii *et al.*, 2017).

Los artroconidios del cultivo de cinco días de *G. candidum* en PDA a 25 °C se recolectaron con 10 ml de buffer fosfato salino estéril (PBS), raspando suavemente la superficie de la colonia. La suspensión de conidios obtenida se contó utilizando una cámara de Neubauer (profundidad 0,1 mm, 0,0025 mm²) bajo microscopio óptico y se expresó como artroconidios por mililitro. Se usó PBS para ajustar la concentración de esporas final a 2 × 10⁷ ufc/mL y se usó el mismo día del experimento (Basak, 2018).

Supervivencia intracelular de las bacterias.

Para el ensayo de supervivencia intracelular, tras 2 h de incubación, los macrófagos se trataron con gentamicina (50 µg / ml) durante 45 min para eliminar las bacterias extracelulares. La incubación de los macrófagos en los pocillos infectados continuó con DMEM fresco y con una dosis de mantenimiento de gentamicina (2 µg / mL) durante 3 h a 37 °C en atmosfera 5% de CO₂

(Ponnusamy *et al.*, 2016). Posteriormente se lisaron las células y se contó el número de bacterias dentro de los macrófagos.

Daño celular inducido por las bacterias: cuantificación del LDH.

Después de las 2 h de incubación y tras el tratamiento con gentamicina se recogieron los sobrenadantes del medio de cultivo. El daño celular se determinó mediante la cuantificación de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) liberada al medio de cultivo, utilizando el kit Cytox 96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay kit (Promega), según las instrucciones del fabricante. Se utilizó una LDH recombinante porcina (Sigma-Aldrich) para realizar una curva de calibración patrón y los niveles de LDH de las muestras se extrapolaron a partir de la curva.

Análisis estadístico.

Todos los experimentos se realizaron por triplicado y las diferencias significativas se determinaron utilizando la prueba t-de Student calculada en Graph Pad Prism 6.0 (GraphPad Software, CA, EE. UU.) Los valores de $p \leq 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos (*).

Resultados

Morfología colonial de las cepas de hongo aisladas de quesos.

A partir de los diferentes tipos de queso fueron aisladas en cultivo puro e identificadas en forma preliminar un total de 12 cepas presuntivas de *Geotrichum* spp. (Tabla 2). Observaciones macroscópicas y microscópicas en medio PDA mostraron dos morfotipos diferentes: 7 cepas presentaron colonias de aspecto filamentosas y de color blanco, resistentes a la tracción; y 5 cepas produjeron colonias levaduriformes, de color crema, y no resistentes a la tracción (Figura 1). Los diferentes morfotipos y los quesos de los cuales fueron aislados se describen en la Tabla 2.

Tabla 2. Identificación preliminar y morfotipo de las cepas de hongo aisladas de quesos.

| Cepa | Tipo de Queso | Mención de etiqueta | Identificación | Morfotipo |
|-------|----------------------------|--|-----------------|---------------|
| 18771 | Brie | Fermentos lácteos | Geotrichum-like | Filamentoso |
| 18772 | Rulo de vaca | Fermentos lácteos y <i>Penicillium</i> | Geotrichum-like | Levaduriforme |
| 18773 | Brie | Fermentos | Geotrichum-like | Filamentoso |
| 18774 | Rulo de cabra | Fermentos lácteos y <i>Penicillium</i> | Geotrichum-like | Filamentoso |
| 18776 | Taleggio | Fermentos lácteos | Geotrichum-like | Levaduriforme |
| 18777 | Reblochon | Fermentos lácteos | Geotrichum-like | Levaduriforme |
| 18778 | Requette | Fermentos lácteos | Geotrichum-like | Levaduriforme |
| 18779 | Brie de cabra | Fermentos lácteos y <i>Penicillium</i> | Geotrichum-like | Filamentoso |
| 18780 | Grès d'Alsace | Fermentos lácteos | Geotrichum-like | Levaduriforme |
| 18781 | Queso de cabra delux trufa | Fermentos lácteos | Geotrichum-like | Filamentoso |
| 18782 | Rulo de Cabra | Fermentos lácteos | Geotrichum-like | Filamentoso |
| 18783 | Brie | Fermentos lácteos y <i>Penicillium</i> | Geotrichum-like | Filamentoso |

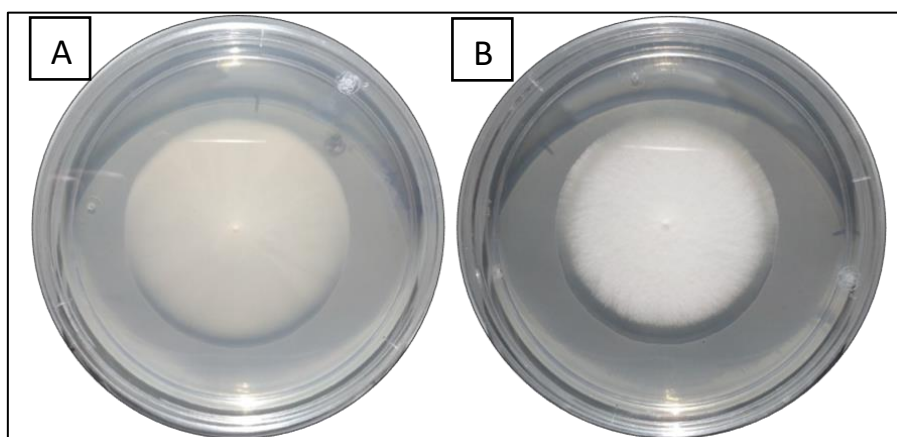


Figura 1. Morfología colonial de *Geotrichum candidum* en medio PDA, (7 días de incubación a 25 °C). A) Morfotipo levaduriforme (FMR 18780), B) Morfotipo filamentosas (FMR 18774)

Identificación molecular de las cepas de hongo aisladas de quesos.

Con los cebadores utilizados, las longitudes obtenidas de los amplicones de las regiones ITS-LSU fueron de aproximadamente 620 pb. La consulta mediante la herramienta BLAST mostró un alto porcentaje de identidad (99 % -100 %) de las 12 secuencias ITS-LSU de nuestras cepas con las secuencias depositadas de *G. candidum*.

Tabla 3. Identificación de las cepas de hongo aisladas de quesos mediante algoritmo BLAST.

| Cepa | Región | Nombre científico | Porcentaje de identidad (%) | Cepa de referencia |
|-------|---------|----------------------------|-----------------------------|--|
| 18771 | ITS-LSU | <i>Geotrichum candidum</i> | 100 | <i>Galactomyces geotrichum</i> cepa LMA-20 |
| 18772 | ITS-LSU | <i>Geotrichum candidum</i> | 99,62 | <i>Galactomyces geotrichum</i> cepa LMA-1026 |
| 18773 | ITS-LSU | <i>Geotrichum candidum</i> | 99,04 | <i>Galactomyces geotrichum</i> cepa LMA-38 |
| 18774 | ITS-LSU | <i>Geotrichum candidum</i> | 99,73 | <i>Galactomyces geotrichum</i> cepa LMA-20 |
| 18776 | ITS-LSU | <i>Geotrichum candidum</i> | 99,41 | <i>Galactomyces geotrichum</i> cepa LMA-15 |
| 18777 | ITS-LSU | <i>Geotrichum candidum</i> | 99,57 | <i>Galactomyces geotrichum</i> cepa LMA-15 |
| 18778 | ITS-LSU | <i>Geotrichum candidum</i> | 99,07 | <i>Geotrichum candidum</i> cepa LG-8 |
| 18779 | ITS-LSU | <i>Geotrichum candidum</i> | 99,01 | <i>Galactomyces geotrichum</i> cepa LMA-20 |
| 18780 | ITS-LSU | <i>Geotrichum candidum</i> | 99,72 | <i>Galactomyces geotrichum</i> cepa LMA-15 |
| 18781 | ITS-LSU | <i>Geotrichum candidum</i> | 100 | <i>Galactomyces geotrichum</i> cepa LMA-20 |
| 18782 | ITS-LSU | <i>Geotrichum candidum</i> | 100 | <i>Galactomyces geotrichum</i> cepa LMA-20 |
| 18783 | ITS-LSU | <i>Geotrichum candidum</i> | 100 | <i>Galactomyces geotrichum</i> cepa LMA-20 |

**Galactomyces geotrichum* es sinónimo de *Geotrichum candidum*

Posteriormente, los resultados del análisis filogenético utilizando el método de máxima verosimilitud (ML) confirmaron que las 12 cepas aisladas de quesos pertenecían a *G. candidum* al alinearse con una cepa representante de la especie (*Geotrichum candidum* AUMC 8995), los datos no mostraron conflicto y el clado que incluía todas las cepas de *G. candidum* estaba bien soportado con un Bootstrap mayor del 70 % (Figura 2).

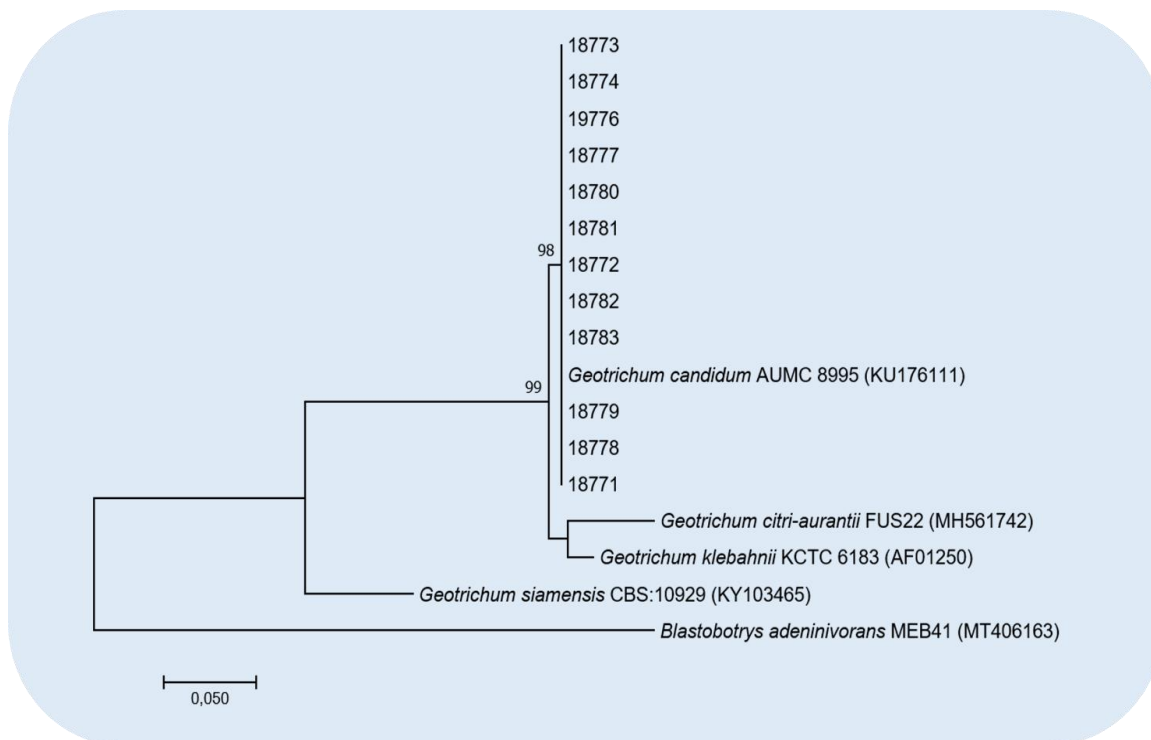


Figura 2. Árbol filogenético de 12 cepas de *G. candidum* inferido de un análisis de máxima verosimilitud basado en la región espaciadora transcrita interna (ITS) y parte del gen 28 S del ARN ribosomal nuclear (LSU), una cepa representante de la especie *Geotrichum candidum* AUMC 8995, tres especies diferentes de *G. candidum* (*Geotrichum citri-aurantii*, *Geotrichum klebahnii*, *Geotrichum siamensis*) y una especie fuera del grupo (*Blastobotrys adenivorans*). El soporte en los nodos se indica por encima de las ramas y está representado por valores de arranque (análisis ML) del 70% y superiores.

Re-identificación molecular de las cepas bacterianas.

Para todas las cepas bacterianas (con excepción de *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes*) la longitud de los amplicones para el gen *rpoD* fue de aproximadamente 570 pb. Mientras que la longitud del amplicón del gen 16S rRNA para de *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes* fue de aproximadamente 1503 pb (Tabla 4).

Tabla 4. Identificación de las cepas bacterianas mediante algoritmo BLAST.

| Cepa | Identificación previa | <i>rpoD</i> | 16S rRNA | Tamaño de fragmento (pb) | Identificación | Porcentaje de similitud |
|------|------------------------------|-------------|----------|--------------------------|-------------------------------|-------------------------|
| A1 | <i>Aeromonas</i> spp. | ✓ | | 508 | <i>Aeromonas caviae</i> | 99,52 |
| K2 | <i>Klebsiella</i> spp. | ✓ | | 410 | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | 100 |
| E3 | <i>Escherichia coli</i> | ✓ | | 794 | <i>Escherichia coli</i> | 98,47 |
| S4 | <i>Salmonella</i> spp. | ✓ | | 460 | <i>Salmonella enterica</i> | 99,51 |
| V5 | <i>Vibrio</i> spp. | ✓ | | 560 | <i>Vibrio alginolyticus</i> | 99,81 |
| S6 | <i>Staphylococcus aureus</i> | | ✓ | 1053 | <i>Staphylococcus aureus</i> | 99,01 |
| L7 | <i>Listeria</i> spp. | | ✓ | 1016 | <i>Listeria monocytogenes</i> | 99,75 |

Utilización de esculina.

Los resultados obtenidos mostraron el cambio del metabolismo en las cepas de *G. candidum* dependiendo en las diferentes condiciones de incubación. La cepa 18780 en condiciones aerobias no metabolizó la esculina, en cambio, en condiciones de microaerofilia se observó el metabolismo de la esculina, la cual se observó mediante el cambio de coloración en el medio bilis esculina (figura 3). Cabe destacar que las cepas que presentaban un morfotipo similar a levadura fueron capaces de hidrolizar la esculina, sin embargo, las cepas con morfotipo filamentoso no presentaron hidrólisis de esculina.

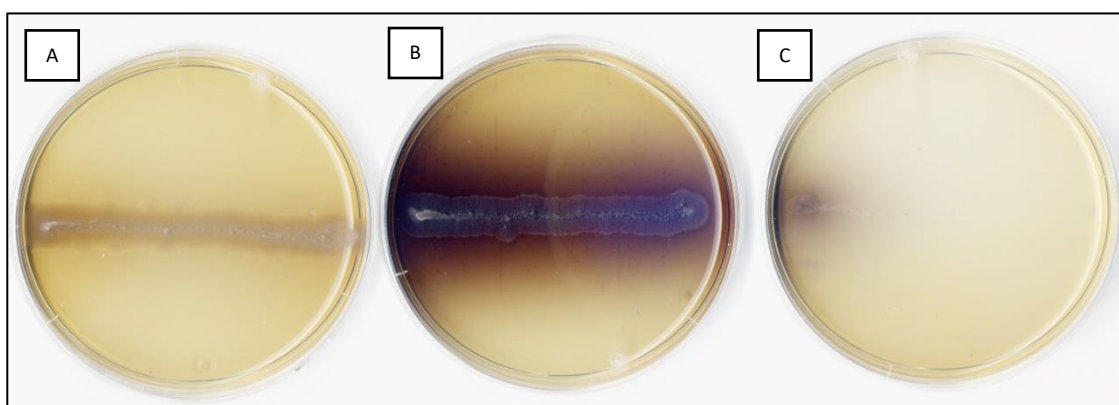


Figura 3. Crecimiento de la cepa 18780 de *G. candidum* en agar bilis esculina en diferentes condiciones de oxígeno. A) condición de aerobiosis, B) condición de microaerofilia, C) condición de anaerobiosis.

Acción inhibitoria de las cepas de *G. candidum* sobre las bacterias.

De las 4 cepas de *G. candidum* estudiadas (FMR 18773, FMR18774, FMR 18776 y FMR 18710), todas mostraron cierta actividad antibacteriana, pero los resultados variaron en dependencia del medio de cultivo y condiciones de incubación. La mayor actividad antimicrobiana fue observada en el medio Mueller Hinton (MH) a 25 °C en condiciones de aerobiosis (Figura 4).

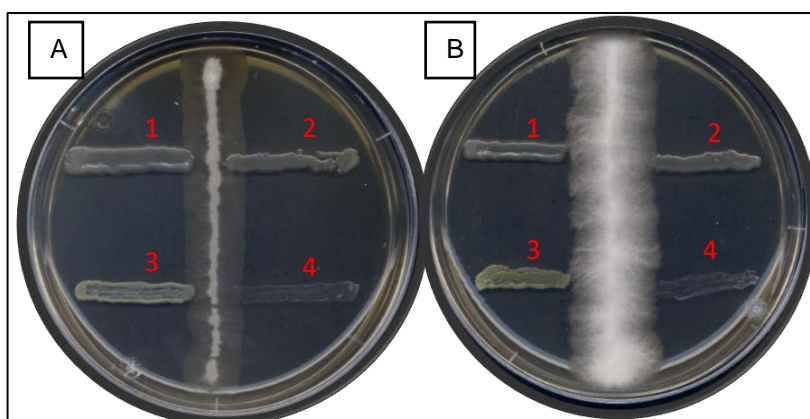


Figura 4. Actividad antimicrobiana de *Geotrichum candidum* en MH. A) FMR 18776, B) FMR 18773. Bacterias: 1, *K. pneumoniae*; 2, *A. caviae*; 3, *S. aureus*; 4, *L. monocytogenes*.

Tabla 5. Acción antimicrobiana de cepas de *G. candidum* en diferentes condiciones de incubación.

| Bacterias/ Condiciones de cultivo | Cepa | <i>A. caviae</i> | <i>E. coli</i> | <i>K. pneumoniae</i> | <i>L. monocytogenes</i> | <i>S. aureus</i> | <i>S. enterica</i> | <i>V. alginolyticus</i> |
|---|--------------|------------------|----------------|----------------------|-------------------------|------------------|--------------------|-------------------------|
| MH, 25° C, aerobiosis | FMR 18773 | - | - | - | - | + | - | - |
| | FMR 18774 | + | - | - | - | + | - | - |
| | FMR 18776 | * | * | * | * | * | * | * |
| | FMR 18780 | - | - | - | - | + | - | + |
| LOA, 25° C, aerobiosis | FMR 18773 | - | - | - | - | - | - | - |
| | FMR 18774 | - | - | - | - | - | - | - |
| | FMR 18776 | - | - | - | - | - | - | - |
| | FMR 18780 | - | - | - | - | - | - | - |
| LOA, 25° C, microaerofilia | FMR 18773 | - | - | - | - | + | - | + |
| | FMR 18774 | - | - | - | - | + | - | + |
| | FMR 18776 | - | - | - | - | - | - | - |
| | FMR 18780 | - | - | - | - | - | - | - |
| BEA, 25° C, aerobiosis | FMR 18773 | + | - | - | + | + | - | - |
| | FMR 18774 | + | - | + | - | - | - | - |
| | FMR 18776 | - | - | - | + | - | - | - |
| | FMR 18780 | + | - | - | - | + | + | + |
| BEA, 35o C, microaerofilia | FMR 18773 | - | - | - | - | - | - | - |
| | FMR 18774 | - | - | - | - | - | - | - |
| | FMR 18776 | - | - | - | - | - | - | - |
| | FMR 18780 | - | - | - | - | - | - | - |

(+) = con actividad; (-) =sin actividad; (*) = crecimiento de la bacteria por encima del hongo

Los resultados revelaron que la cepa 18774 tenía actividad inhibidora sobre bacterias Gram positivas y Gram negativas, mostrando un mayor efecto contra *K. pneumoniae* y *S. aureus*. También se observó un efecto sobre *A. caviae*, y *V. alginolyticus* en menor medida. La cepa FMR 18773 también mostró un efecto inhibidor sobre bacterias Gram positivas y Gram negativas, especialmente hacia *S. aureus*, y en menor proporción contra *A. caviae*, *L. pneumoniae* y *V. alginolyticus*. La cepa FMR 18776 fue la que presentó la menor actividad inhibidora *in vitro*, ya que solo se registró efecto antibacteriano contra *L. monocytogenes*. En el caso del medio MH, se observó el crecimiento de las bacterias por encima del crecimiento de *G. candidum*. Por último, la cepa FMR 18780 mostró un efecto inhibidor sobre la mayoría de las bacterias Gram

positivas y Gram negativas, especialmente contra *S. aureus* y *V. alginolyticus*, y en menor proporción contra *A. caviae* y *S. enterica*. En el presente experimento no se observó una acción antibacteriana contra *E. coli* (Tabla 5).

Supervivencia intracelular bacteriana.

Para el análisis de la supervivencia intracelular bacteriana, se realizó un pretratamiento de la línea celular de macrófagos (J774A.1) con las cepas de *G. candidum* utilizadas en el experimento anterior (FMR 18773, FMR 18774, FMR 18776 y FMR 18780) y posteriormente se infectaron con las cepas bacterianas.

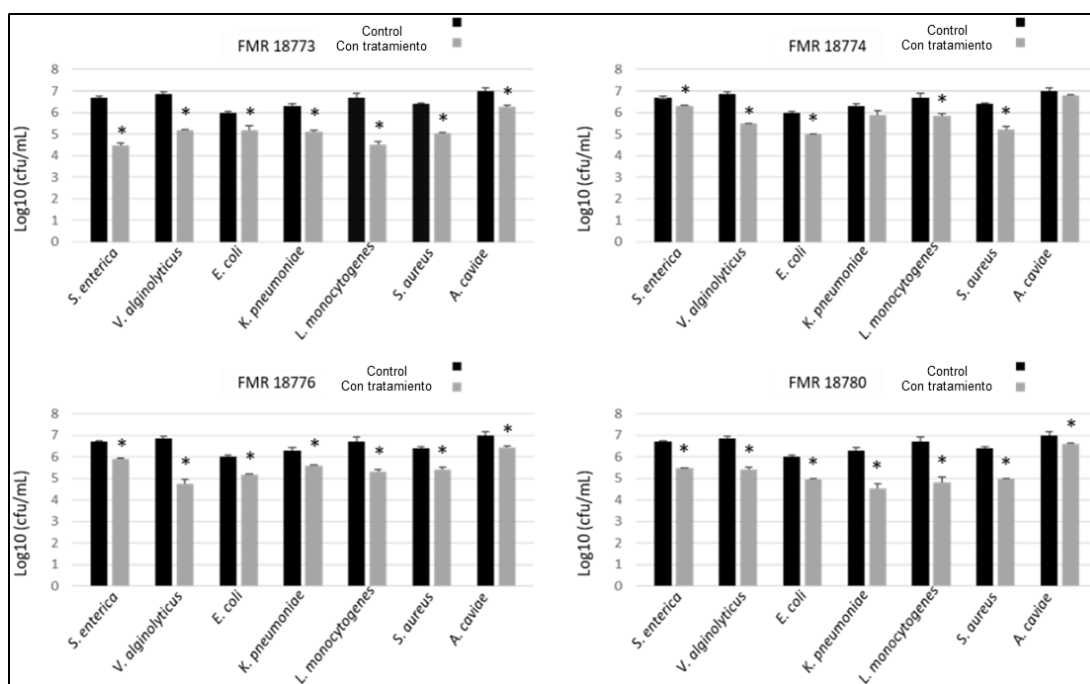


Figura 5. Supervivencia intracelular de las cepas bacterianas a MOI 10, tras el pre-tratamiento de 4 h con las cepas de *G. candidum*. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas en comparación con el grupo control * p<0,05.

Los resultados mostraron una reducción significativa ($p < 0.05$) en la supervivencia intracelular de todas las bacterias patógenas probadas tras el pretratamiento con las cepas de *G. candidum* mencionadas respecto al control, con excepción de *K. pneumoniae* y *A. caviae* tras el pretratamiento con la cepa FMR 18744. Las cuatro cepas fúngicas mostraron resultados similares de reducción de la supervivencia intracelular bacteriana para cada uno de los géneros bacterianos ensayados ($p < 0.05$). En general las bacterias que presentaron mayor supervivencia intracelular fueron *A. caviae*, *K. pneumoniae* y *E. coli*, y las bacterias que presentaron menor supervivencia intracelular fueron *V. alginolyticus* y *S. aureus* (Figura 5).

Evaluación del daño celular

Como se muestra en la (Figura 6) todas las cepas de *G. candidum* utilizadas fueron capaces de reducir significativamente ($p < 0.05$) el daño celular en los macrófagos en comparación con el control de células sin pre-tratamiento probiótico. La cepa bacteriana que causó mayor daño celular fue *A. caviae*, seguido de *E. coli* y *V. alginolyticus*. Al contrario, las bacterias que menos daño celular causaron fueron *L. monocytogenes* y *S. aureus*. Las cuatro cepas fúngicas mostraron resultados similares de reducción de daño celular para cada uno de los géneros bacterianos ensayados ($p < 0.05$).

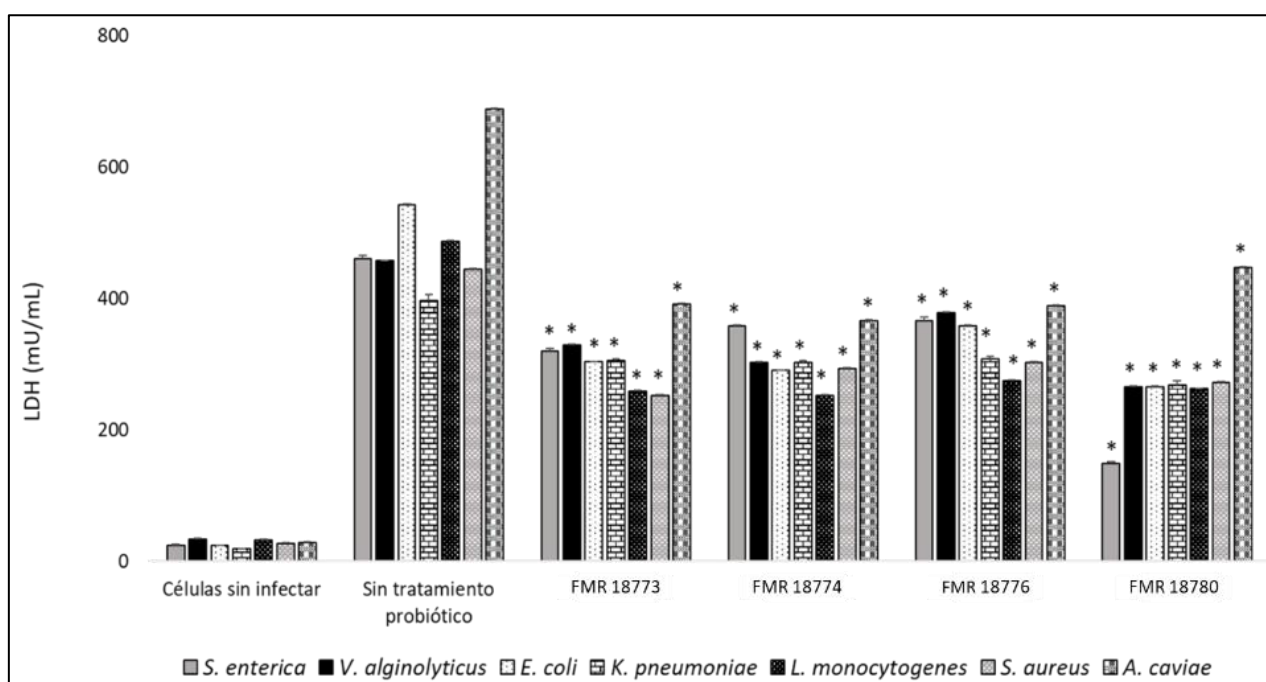


Figura 6. Daño celular en macrófagos tras el pretratamiento con *G. candidum* determinado por la liberación de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas en comparación con el grupo control (*) $p < 0,05$.

Discusión

Geotrichum candidum es un hongo indispensable en la maduración de muchos tipos de queso, cuya actividad metabólica contribuye de forma significativa a la aparición de los aromas y sabores deseables y característicos de los mismos. Además de estas aplicaciones biotecnológicas, se ha reportado su actividad como probiótico en peces.

Dichos estudios han indicado que la administración de *G. candidum* a peces rohu (*Labeo rohita*) aumenta su resistencia frente a las infecciones por *Staphylococcus aureus*, reduciendo de forma significativa su tasa de mortalidad. En carpín dorado (*Carassius auratus*) muestra beneficios sobre su crecimiento, aumenta la actividad de sus enzimas digestivas, modula su microbiota intestinal, incrementa la expresión de genes relacionados con el buen funcionamiento del sistema inmunológico y contribuye a la resistencia de infecciones por *Aeromonas hydrophila* (Noor-UI *et al.*, 2020; Zuberi & Imran, 2017).

En el presente estudio se aislaron e identificaron 12 cepas de *G. candidum*, procedentes de diferentes tipos de queso. Diversos estudios han demostrado el efecto probiótico (actividad antimicrobiana, tolerancia a las sales biliares y al ácido gástrico) de levaduras como *Saccharomyces boulardii* y *Saccharomyces cerevisiae* con fuentes de aislamiento similares a esta investigación (L.B. Roostita *et al.*, 2011; Moslehi-Jenabian *et al.*, 2010; Sourabh *et al.*, 2011).

Una vez ingerido un probiótico estará sujeto a una serie de condiciones fisiológicas deletéreas en el tracto gastrointestinal, tales como el reducido pH estomacal, acción de enzimas proteolíticas, la actividad tensioactiva de las sales biliares y la reducida disponibilidad de oxígeno. El pH del estómago humano se encuentra entre 1,5 a 3,5, mientras que la concentración fisiológica de las sales biliares en el intestino delgado está entre 0,2 y 2,0 %, aunque éstas varían de persona a persona con el tipo de ingesta (Gunn, 2000; Hu *et al.*, 2018).

La supervivencia de los microorganismos probióticos en tránsito por el tracto gastrointestinal es crucial para conferir los beneficios para la salud que se les presupone. Los resultados obtenidos muestran que las cuatro cepas utilizadas para los experimentos de actividad antibacteriana presentaron un buen crecimiento en presencia de sales biliares (agar con bilis de buey de Littman [sin

cristal violeta] y agar bilis esculina [BEA], con 15 y 20 g/L, de sales biliares respectivamente), Además, las cepas fúngicas en estudio fueron capaces de desarrollarse en condiciones de microaerofilia, típica de los intestinos.

En el presente estudio, las cuatro cepas de *G. candidum* fueron capaces de hidrolizar la esculina (BEA) en condiciones de microaerofilia, característica previamente reportada para *G. capitatum* (Matos et al., 2017), mientras que en otro trabajo se menciona la falta de hidrólisis de la esculina por parte de *Geotrichum* sp. (Edberg et al., 1980); Previamente se ha descrito cambios en el metabolismo bajo diferentes condiciones de oxígeno en potenciales cepas probióticas (Talwalkar & Kailasapathy, 2003).

Una de las características que más despiertan interés por los microorganismos con actividad probiótica es su actividad antibacteriana, en especial contra los patógenos de origen humano. Las cuatro cepas de *G. candidum* analizadas mostraron actividad antimicrobiana contra las bacterias en el ensayo de cultivo dual, al menos en uno de los medios de cultivos y condiciones de incubación. Debido a la gran variabilidad de los resultados obtenidos, esta característica parece depender tanto del medio de cultivo, la temperatura de incubación, y la técnica empleada para la detección. Además, los resultados muestran que la actividad antibacteriana es cepa dependiente, ya que los distintos aislados ensayados muestran diferente actividad antibacteriana.

Nuestros resultados concuerdan con anteriores investigaciones ya que distintos autores han señalado la actividad antimicrobiana de algunos metabolitos producidos por cepas de *G. candidum*. Así el estudio de Dieuleveux y colaboradores (1998) identificó dos moléculas inhibitorias de la multiplicación *L. monocytogenes*, el ácido D-3-fenil-láctico y el ácido D-3-indolacético, Posteriormente, uno de dichos compuestos, el ácido d-3-fenil-láctico, demostró su actividad inhibitoria contra otras bacterias Gram positivas (*Enterococcus faecalis* y *Staphylococcus aureus*) y bacterias Gram negativas (*Klebsiella oxytoca* y *Providencia stuartii*). Samuel y Prabakaran (2011) demostraron la actividad antibacteriana de una cepa de *G. candidum* aislada de una muestra marina contra *Bacillus subtilis*, *E. coli*, *Micrococcus* sp., *Pseudomonas putida* y *Vibrio cholerae*. Por último, Omeike y colaboradores (2020) aislaron un péptido

antimicrobiano de una cepa de *G. candidum* el cual demostró ser un bacteriostático para *S. aureus*.

El macrófago es un importante efector celular contra la invasión de microorganismos patógenos. Dichos patógenos son fagocitados por los macrófagos y almacenados en el citosol o en un fagosoma, para finalmente ser degradados enzimáticamente. Estudios recientes han sugerido que los probióticos pueden regular la actividad de los macrófagos para mejorar la respuesta inmune frente a microorganismos invasores extraños (Y. Wu *et al.*, 2017). En nuestra investigación, el pretratamiento de los macrófagos con *G. candidum* mostró en las cuatro cepas probadas una reducción significativa de la supervivencia intracelular bacteriana y del daño celular, estos resultados indican que las cepas de *G. candidum* podría estimular la inmunidad mediada por células. La actividad inmunoestimuladora de los probióticos depende de la interacción entre los patrones moleculares asociados a microorganismos (MAMP) y los receptores tipo toll (TLR) (Lebeer *et al.*, 2010). Esta interacción también participa en la activación de fagocitosis en macrófagos. Por tanto, los probióticos pueden mediar la actividad antibacteriana en los macrófagos a través de mecanismos que activan degradación bacteriana (Lin *et al.*, 2014; S. Wu *et al.*, 2013).

Conclusión

Geotrichum candidum, un hongo filamentoso filogenéticamente relacionado con las levaduras “verdaderas”, tales como *Saccharomyces cerevisiae* (subphylum Saccharomycotina, clase Saccharomycetes), fue aislado e identificado a partir de la corteza de quesos en cuyas etiquetas no se menciona su presencia. Estos aislados han demostrado poseer una interesante actividad antibacteriana, y han sido capaces de reducir el daño celular ocasionado por las bacterias patógenas humanas a los macrófagos en ensayos *in vitro*, por lo cual podrían ser potencialmente empleados como probióticos. Sin embargo, hace falta realizar más estudios *in vitro* e *in vivo* para garantizar la inocuidad y la eficacia de estas cepas de *G. candidum* como probióticos en alimentación humana.

Bibliografía

- Amir, I., Zuberi, A., Kamran, M., Imran, M., & Murtaza, M. ul H. (2019). Evaluation of commercial application of dietary encapsulated probiotic (*Geotrichum candidum* QAUGC01): Effect on growth and immunological indices of rohu (*Labeo rohita*, Hamilton 1822) in semi-intensive culture system. *Fish and Shellfish Immunology*, 95, 464–472. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.11.011>
- Basak, S. (2018). Modelling the effect of betel leaf essential oil on germination time of *Aspergillus flavus* and *Penicillium expansum* spore population. *LWT*, 95, 361–366. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.05.015>
- Choi, J., Lee, S. I., Rackerby, B., Goddik, L., Frojen, R., Ha, S. Do, Kim, J. H., & Park, S. H. (2020). Microbial communities of a variety of cheeses and comparison between core and rind region of cheeses. *Journal of Dairy Science*, 103(5), 4026–4042. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17455>
- Dabrowski, K., Hassard, S., Quinn, J., Pitcher, T. J., & Flinn, A. M. (1980). Effect of *Geotrichum candidum* protein substitution in pelleted fish feed on the growth of rainbow trout (*Salmo gairdneri* Rich.) and on utilization of the diet. *Aquaculture*, 21(3), 213–232. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(80\)90132-5](https://doi.org/10.1016/0044-8486(80)90132-5)
- Desmasures, N. (2014). Cheese: Mold-Ripened Varieties. In *Encyclopedia of Food Microbiology: Second Edition* (pp. 409–415). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00060-4>
- Dieuleveux, V., Van Der Pyl, D., Chataud, J., & Gueguen, A. M. (1998). Purification and Characterization of Anti-Listeria Compounds Produced by *Geotrichum candidum* Downloaded from. In *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY* (Vol. 64, Issue 2). <http://aem.asm.org/>
- Edberg, S. C., Chaskes, S. J., Altire-Werber, E., & Singer, J. M. (1980). Esculin-Based Medium for Isolation and Identification of *Cryptococcus neoformans*. In *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY* (Vol. 12, Issue 3). <http://jcm.asm.org/>
- Eliskases-Lechner, F., Guéguen, M., & Panoff, J. M. (2011). Yeasts and Molds: *Geotrichum candidum*. In *Encyclopedia of Dairy Sciences: Second Edition* (pp. 765–771). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374407-4.00365-4>
- Ercolini, D. (2020). Secrets of the cheese microbiome. *Nature Food*, 1(8), 466–467. <https://doi.org/10.1038/s43016-020-0131-9>
- FAQ: Microbes Make the Cheese: Report on an American Academy of Microbiology Colloquium held in Washington, DC, in June 2014. (2015). In *FAQ: Microbes Make the Cheese: Report on an American Academy of Microbiology Colloquium held in Washington, DC, in June 2014*. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33054144>
- Fernández-Bravo, A., Kilgore, P. B., Andersson, J. A., Blears, E., Figueras, M. J., Hasan, N. A., Colwell, R. R., Sha, J., & Chopra, A. K. (2019). T6SS and ExoA of flesh-eating *Aeromonas hydrophila* in peritonitis and necrotizing fasciitis during mono- And polymicrobial infections. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(48), 24084–24092. <https://doi.org/10.1073/pnas.1914395116>
- Fox, P. F., Guinee, T. P., Cogan, T. M., & McSweeney, P. L. H. (2016). Fundamentals of cheese science, second edition. In *Fundamentals of Cheese Science, Second Edition*. Springer US. <https://doi.org/10.1007/978-1-4899-7681-9>
- Fröhlich-Wyder, M.-T., Arias-Roth, E., & Jakob, E. (2019). Cheese yeasts. *Yeast*, 36(3), 129–141. <https://doi.org/10.1002/yea.3368>
- Gente, S., Sohier, D., Coton, E., Duhamel, C., & Gueguen, M. (2006). Identification of *Geotrichum candidum* at the species and strain level: Proposal for a standardized protocol. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 33(12), 1019–1031. <https://doi.org/10.1007/s10295-006-0130-3>
- George Kerry, R., Patra, J. K., Gouda, S., Park, Y., Shin, H. S., & Das, G. (2018). Benefaction of probiotics for human health: A review. In *Journal of Food and Drug Analysis* (Vol. 26, Issue 3, pp. 927–939). Elsevier Taiwan LLC. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2018.01.002>
- Gori, K., Ryssel, M., Arneborg, N., & Jespersen, L. (2013). Isolation and Identification of the Microbiota of Danish Farmhouse and Industrially Produced Surface-Ripened Cheeses. *Microbial Ecology*, 65(3), 602–615. <https://doi.org/10.1007/s00248-012-0138-3>
- Gunn, J. S. (2000). Mechanisms of bacterial resistance and response to bile. In *Microbes and Infection* (Vol. 2, Issue 8, pp. 907–913). Elsevier Masson SAS. [https://doi.org/10.1016/S1286-4579\(00\)00392-0](https://doi.org/10.1016/S1286-4579(00)00392-0)
- Harbutt J. (2009). *World Cheese Book*. Dorling Kindersley. https://scholar.google.com/scholar?hl=es&as_sdt=0%2C5&q=World+Cheese+Book+Harbutt+J+&btn

G=

- Hayaloglu, A. A. (2016). Cheese: Microbiology of Cheese. In *Reference Module in Food Science*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-100596-5.00675-2>
- Hernández-Restrepo, M., Mena-Portales, J., Gené, J., Cano, J., & Guarro, J. (2013). New *bactrodesmiasstrum* and *bactrodesmium* from decaying wood in Spain. *Mycologia*, *105*(1), 172–180. <https://doi.org/10.3852/12-004>
- Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G. R., Merenstein, D. J., Pot, B., Morelli, L., Canani, R. B., Flint, H. J., Salminen, S., Calder, P. C., & Sanders, M. E. (2014). Expert consensus document: The international scientific association for probiotics and prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, *11*(8), 506–514. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2014.66>
- Hu, P. L., Yuan, Y. H., Yue, T. L., & Guo, C. F. (2018). Bile acid patterns in commercially available oxgall powders used for the evaluation of the bile tolerance ability of potential probiotics. *PLoS ONE*, *13*(3), e0192964. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192964>
- Kamat, N., & Velho-Pereira, S. (2012). Screening of actinobacteria for antimicrobial activities by a modified “Cross-Streak” method. *Nature Precedings*, 1–1. <https://doi.org/10.1038/npre.2012.6765.1>
- Khodaii, Z., Ghaderian, S. M. H., & Natanzi, M. M. (2017). Probiotic bacteria and their supernatants protect enterocyte cell lines from enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC) invasion. *International Journal of Molecular and Cellular Medicine*, *6*(3), 183–189. <https://doi.org/10.22088/acadpub.BUMS.6.3.183>
- L.B. Roostita, G.H. Fleet, S.P. Wendry, Z.M. Apon, & L.U. Gemilang. (2011). Determination of Yeasts Antimicrobial Activity in Milk and Meat Products. *Avance Journal of Food Science and Technology*, *3*, 442–445. https://www.researchgate.net/publication/281198796_Determination_of_Yeasts_Antimicrobial_Activity_in_Milk_and_Meat_Products
- Lay, C., Sutren, M., Lepercq, P., Juste, C., Rigottier-Gois, L., Lhoste, E., Lemée, R., Ruyet, P. Le, Doré, J., & Andrieux, C. (2004). Influence of Camembert consumption on the composition and metabolism of intestinal microbiota: a study in human microbiota-associated rats. *British Journal of Nutrition*, *92*(3), 429–438. <https://doi.org/10.1079/bjn20041192>
- Lebeer, S., Vanderleyden, J., & De Keersmaecker, S. C. J. (2010). Host interactions of probiotic bacterial surface molecules: Comparison with commensals and pathogens. In *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 8, Issue 3, pp. 171–184). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2297>
- Lessard, M. H., Viel, C., Boyle, B., St-Gelais, D., & Labrie, S. (2014). Metatranscriptome analysis of fungal strains *Penicillium camemberti* and *Geotrichum candidum* reveal cheese matrix breakdown and potential development of sensory properties of ripened Camembert-type cheese. *BMC Genomics*, *15*(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-235>
- Lin, R., Jiang, Y., Zhao, X. Y., Guan, Y., Qian, W., Fu, X. C., Ren, H. Y., & Hou, X. H. (2014). Four types of Bifidobacteria trigger autophagy response in intestinal epithelial cells. *Journal of Digestive Diseases*, *15*(11), 597–605. <https://doi.org/10.1111/1751-2980.12179>
- Magaña-Dueñas, V., Stchigel, A. M., & Cano-Lira, J. F. (2021). New Coelomycetous Fungi from Freshwater in Spain. *Journal of Fungi*, *7*(5), 368. <https://doi.org/10.3390/jof7050368>
- Matos, I. T. S. R., Assunção, E. N., Do Carmo, E., Soares, V. M., & Astolfi-Filho, S. (2017). Isolation and characterization of yeasts able to assimilate sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate and produce xylitol associated with *veturius transversus* (passalidae, coleoptera, and insecta). *International Journal of Microbiology*, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/5346741>
- Real Decreto 1113/2006, de 29 de septiembre, por el que se aprueban las normas de calidad para quesos y quesos fundidos.*, (2015) (testimony of Ministerio de la Presidencia).
- Monnet, C., Landaud, S., Bonnarme, P., & Swennen, D. (2015). Growth and adaptation of microorganisms on the cheese surface. In *FEMS Microbiology Letters* (Vol. 362, Issue 1). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnu025>
- Moslehi-Jenabian, S., Pedersen, L. L., & Jespersen, L. (2010). Beneficial effects of probiotic and food borne yeasts on human health. *Nutrients*, *2*(4), 449–473. <https://doi.org/10.3390/nu2040449>
- Noor-UI, H., Haokun, L., Junyan, J., Xiaoming, Z., Dong, H., Yunxia, Y., & Shouqi, X. (2020). Dietary supplementation of *Geotrichum candidum* improves growth, gut microbiota, immune-related gene expression and disease resistance in gibel carp CAS III (*Carassius auratus gibelio*). *Fish and Shellfish*

Immunology, 99, 144–153. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2020.02.001>

- Omeike, S. O., Kareem, S. O., Nandanwar, H., Lasisi, A. A., Oluwafemi, F., & Jangra, M. (2020). Purification, De Novo Characterization and Antibacterial Properties of a Novel, Narrow-Spectrum Bacteriostatic Tripeptide from *Geotrichum candidum* OMON-1. *Arabian Journal for Science and Engineering*, 1–9. <https://doi.org/10.1007/s13369-020-05024-1>
- Pérez-Cataluña, A., Salas-Massó, N., Diéguez, A. L., Balboa, S., Lema, A., Romalde, J. L., & Figueras, M. J. (2018). Revisiting the taxonomy of the genus *arcobacter*: Getting order from the chaos. *Frontiers in Microbiology*, 9(SEP), 2077. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02077>
- Perkins, V., Vignola, S., Lessard, M. H., Plante, P. L., Corbeil, J., Dugat-Bony, E., Frenette, M., & Labrie, S. (2020). Phenotypic and Genetic Characterization of the Cheese Ripening Yeast *Geotrichum candidum*. *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00737>
- Ponnusamy, D., Kozlova, E. V., Sha, J., Erova, T. E., Azar, S. R., Fitts, E. C., Kirtley, M. L., Tiner, B. L., Andersson, J. A., Grim, C. J., Isom, R. P., Hasan, N. A., Colwell, R. R., & Chopra, A. K. (2016). Cross-talk among flesh-eating *Aeromonas hydrophila* strains in mixed infection leading to necrotizing fasciitis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(3), 722–727. <https://doi.org/10.1073/pnas.1523817113>
- Samuel, & Prabakaran. (2011). Antibacterial Activity of Marine derived Fungi Collected from South East Coast of Tamilnadu, India. In *Journal of Microbiology and Biotechnology Research Scholars Research Library J. Microbiol. Biotech. Res* (Vol. 1, Issue 4). <http://scholarsresearchlibrary.com/archive.html>
- Seeliger, H. P. R. (1956). use of a urease test for the screening and identification of *cryptococci*. *Journal of Bacteriology*, 72(2).
- Settanni, L., & Moschetti, G. (2010). Non-starter lactic acid bacteria used to improve cheese quality and provide health benefits. *Food Microbiology*, 27(6), 691–697. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.05.023>
- Sourabh, A., Singh Kanwar, S., & Prakash Sharma, O. (2011). Screening of indigenous yeast isolates obtained from traditional fermented foods of Western Himalayas for probiotic attributes. *Journal of Yeast and Fungal Research*, 2(8), 117–126. <http://www.academicjournals.org/JYFR>
- Sybren De Hoog, G., & Smith, M. T. (2004). Ribosomal gene phylogeny and species delimitation in *Geotrichum* and its teleomorphs. In *STUDIES IN MYCOLOGY* (Vol. 50). www.mikro.biologie.tu-
- Talwalkar, A., & Kailasapathy, K. (2003). Metabolic and biochemical responses of probiotic bacteria to oxygen. *Journal of Dairy Science*, 86(8), 2537–2546. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(03\)73848-X](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(03)73848-X)
- Williams, N. T. (2010). Probiotics. In *American Journal of Health-System Pharmacy* (Vol. 67, Issue 6, pp. 449–458). American Society of Health-Systems Pharmacy. <https://doi.org/10.2146/ajhp090168>
- Wu, S., Yuan, L., Zhang, Y., Liu, F., Li, G., Wen, K., Kocher, J., Yang, X., & Sun, J. (2013). Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG mono-association suppresses human rotavirus-induced autophagy in the gnotobiotic piglet intestine. *Gut Pathogens*, 5(1), 22–22. <https://doi.org/10.1186/1757-4749-5-22>
- Wu, Y., Wang, Y., Zou, H., Wang, B., Sun, Q., Fu, A., Wang, Y., Wang, Y., Xu, X., & Li, W. (2017). Probiotic *Bacillus amyloliquefaciens* SC06 induces autophagy to protect against pathogens in macrophages. *Frontiers in Microbiology*, 8(MAR), 469. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00469>
- Yeluri Jonnala, B. R., McSweeney, P. L. H., Sheehan, J. J., & Cotter, P. D. (2018). Sequencing of the cheese microbiome and its relevance to industry. *Frontiers in Microbiology*, 9(MAY), 1020. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01020>
- Zuberi, A., & Imran, M. (2017). Effect of Probiotic *Geotrichum candidum* on Early Rearing of *Labeo rohita* (Hamilton Medical Microbiology View project Aquaculture View project Effect of Probiotic *Geotrichum candidum* on Early Rearing of *Labeo rohita* (Hamilton, 1822). *1822) Article in Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 17, 1263–1270. https://doi.org/10.4194/1303-2712-v17_6_19

Anexos

Anexo 1. Sinonimias de *Geotrichum candidum* (www.mycobank.com).

| | Nombre de la especie | Año de descripción |
|------------------------------------|---|--------------------|
| Evolución del nombre de la especie | <i>Geotrichum candidum</i> | 1809 |
| | <i>Botrytis geotricha</i> | 1824 |
| | <i>Oidium lactis</i> | 1850 |
| | <i>Dipodascus Geotrichum</i> | 1972 |
| | <i>Endomyces Geotrichum</i> | 1972 |
| | <i>Galactomyces Geotrichum</i> | 2000 |
| | <i>Galactomyces candidus</i> | 2004 |
| Sinónimos encontrados | <i>Mycoderma malti juniperini</i> | 1827 |
| | <i>Acrosporium candidum</i> | 1827 |
| | <i>Torula geotricha</i> | 1829 |
| | <i>Oidium lactis</i> var. <i>luxurians</i> | 1854 |
| | <i>Oidium obtusum</i> | 1875 |
| | <i>Oidium nubilum</i> | 1909 |
| | <i>Oidium humi</i> | 1910 |
| | <i>Monila asteroides</i> | 1914 |
| | <i>Monilia matalense</i> | 1915 |
| | <i>Oidium suaveluens</i> var. <i>minutum</i> | 1923 |
| | <i>Oospora fragrans</i> var. <i>minuta</i> | 1923 |
| | <i>Oospora lactis</i> var. <i>exuberans</i> | 1923 |
| | <i>Geotrichum matalense</i> var. <i>chapmanii</i> | 1932 |
| | <i>Geotrichum javaneanse</i> | 1933 |
| | <i>Geotrichum versiforma</i> | 1934 |
| | <i>Geotrichum radaelli</i> | 1940 |
| | <i>Geotrichum novakii</i> | 1966 |
| | <i>Geotrichum silvícola</i> | 2005 |
| | <i>Geotrichum bryndzae</i> | 2009 |
| | <i>Scytalidium candidum</i> | 2018 |

Anexo 2. Quesos analizados.

| Número | Tipo Queso |
|--------|----------------------------|
| 1 | Brie |
| 2 | Rulo de vaca |
| 3 | Brie |
| 4 | Rulo de cabra |
| 5 | Taleggio |
| 6 | Reblochon |
| 7 | Requette |
| 8 | Brie de cabra |
| 9 | Grès d'Alsace |
| 10 | Queso de cabra delux trufa |
| 11 | Rulo de Cabra |
| 12 | Brie |

Anexo 3. Cepas analizadas.

| Cepa | Identificación |
|-------------|-------------------------------|
| A1 | <i>Aeromonas caviae</i> |
| K2 | <i>Klebsiella pneumoniae</i> |
| E3 | <i>Escherichia coli</i> |
| S4 | <i>Salmonella enterica</i> |
| V5 | <i>Vibrio alginolyticus</i> |
| S6 | <i>Staphylococcus aureus</i> |
| L7 | <i>Listeria monocytogenes</i> |