



universidad
de león



Programa de Doctorado:

CIENCIAS VETERINARIAS Y DE LOS ALIMENTOS

FACULTAD DE VETERINARIA

TESIS DOCTORAL

**Biocontrol de *Penicillium* alterantes y
micotoxigénicos en queso madurado (tipo
Castellano) mediante el uso de bacterias ácido-
lácticas como cultivos protectores**

Juliana Ramos Pereira

Directores:

D^a. Teresa María López Díaz

D. Jesús Ángel Santos

León, 2019



universidad
de león

CONFORMIDAD DE LOS DIRECTORES DE LA TESIS

Los doctores Dña. Teresa María López Díaz y D. Jesús Ángel Santos Buelga, adscritos al Área de Conocimiento de Nutrición y Bromatología del Departamento de Higiene y Tecnología de los Alimentos de la Universidad de León, como directores de la Tesis Doctoral titulada "Biocontrol de *Penicillium* alterantes y micotoxigénicos en queso madurado (tipo Castellano) mediante el uso de bacterias ácido-lácticas como cultivos protectores", realizada por Dña. Juliana Ramos Pereira en el programa de doctorado "CIENCIAS VETERINARIAS Y DE LOS ALIMENTOS", informan favorablemente el depósito de la misma dado que reúne las condiciones necesarias para su defensa.

En León a 10 de abril de 2019.

Fdo. Teresa María López Díaz

Fdo. Jesús Ángel Santos Buelga

FINANCIACIÓN

Se agradece al Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Brasil (CNPq) por la financiación prestada al doctorando mediante una beca que cubrió cuatro años del período de desarrollo de la Tesis Doctoral.

Los trabajos realizados en esta Tesis Doctoral fueron también financiados por el FEDER 2014-2020 (INIA, Proyecto RTA2015- 00018-C03-03) y por la Universidad de León (Programa de ayuda a proyectos de investigación).

AGRADECIMIENTOS

Primeramente, a mis directores Drs. Teresa María López Díaz y Jesús Ángel Santos Buelga que me apoyaron de todas las formas durante el desarrollo de la tesis, sin ellos nada hubiera sido posible.

A todo el personal del Departamento de Higiene y Tecnología de los Alimentos que me ayudaron en la elaboración de la tesis. A Jose María Rodríguez Calleja y Bernardo Prieto Gutierrez por toda su ayuda y apoyo. A Aurelia y Rosa que siempre estuvieron presentes en los momentos de necesidad, apoyándome y siempre dispuestas a ayudarme y resolver todos los problemas. A Eleni Patrinoú por la ayuda con los experimentos y a Domingo Fernández (Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos-Universidad de León) por los análisis realizados con todo cuidado.

A las empresas, Consorcio de Promoción del Ovino, Industrias Lácteas Manzano, al Laboratorio Regional de Sanidad Animal, Junta de Castilla y León (León-Villaquilambre) y a los responsables de las explotaciones ganaderas por su colaboración y plena disponibilidad.

A Edson por haber participado de más esta etapa de mi vida, por nuestra amistad, por su compañerismo en las inúmeras noches y fines de semana de trabajo durante nuestra estancia en España, su participación fue esencial y siempre tendré a ti como un hermano.

A Juliana, Egon, Ángel y Erica por todo el apoyo y ayuda, tanto en la vida profesional como en la personal, con la presencia de vosotros todo fue más fácil. A mi amiga Sandra que en todos los momentos tenía un abrazo y una palabra amiga. A Carmen y Carla por acogerme en su casa, las considero como mi familia en España. A mis amigos, Dra. Vanerli Beloti (Neli), Dr. Felipe Nael Seixas, Dr. Ronaldo Tamanini, Emerson, Bruno, Paula y Esther que siempre creyeron en mí y me dieron todo el apoyo para concluirlo.

A mi familia (mis padres, mis hermanas, mi hermano y mi abuelo) mismo que distantes me proporcionaron todo el apoyo necesario para que yo pudiera concluir esta etapa de mi vida, sin vosotros yo no lo había conseguido.

“Necesitamos especialmente de la imaginación en las ciencias. No todo es matemáticas y no todo es simple lógica, también se trata de un poco de belleza y poesía.”

Maria Montessori

ÍNDICE

RESUMEN	5
ABSTRACT	6
INTRODUCCIÓN GENERAL Y OBJETIVOS	7
1. IMPORTANCIA GENERAL DE LA LECHE	8
1.1. MICROBIOLOGÍA DE LA LECHE	9
1.2. CARACTERÍSTICAS DEL QUESO CASTELLANO.....	11
1.3. RAZONES POR LAS QUE EL QUESO ES UN SUSTRATO FAVORABLE PARA BACTERIAS Y MOHOS.	12
1.3.1. BACTERIAS	12
1.3.2. MOHOS	13
1.4. PRINCIPALES MOHOS Y MICOTOXINAS EN QUESOS.....	14
1.5. CONTROL DE MOHOS EN QUESO	20
1.6. BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS COMO CULTIVO PROTECTOR.....	21
2. REFERENCIAS.....	24
3. OBJETIVOS DE LA TESIS DOCTORAL	28
CAPÍTULO I. RECUENTOS BACTERIANOS Y COMPOSICIÓN FÍSICO-QUÍMICA DE LA LECHE DE CABRA	29
1. INTRODUCCIÓN	30
2. OBJETIVOS	31
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	31
3.1. RECOGIDA DE MUESTRAS	31
3.2. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO.....	32
3.3. ANÁLISIS FÍSICO-QUÍMICOS.....	32
3.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	33
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	33
5. CONCLUSIONES	40
6. REFERENCIAS.....	41

CAPÍTULO II. IDENTIFICACIÓN POLIFÁSICA DE *PENICILLIUM* SPP. AISLADOS DE QUESO MADURADO Y CUANTIFICACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ÁCIDO CICLOPIAZÓNICO POR *P. COMMUNE*..... 44

1. INTRODUCCIÓN	45
2. OBJETIVOS	48
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	48
3.1. AISLAMIENTO DE HONGOS	48
3.2. IDENTIFICACIÓN	49
3.2.1. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA	49
3.2.2. Análisis de extrolitos (OTA, CPA y PAT) por cromatografía en capa fina (TLC)...	50
3.2.3. Test de Ehrlich.....	51
3.2.4. Identificación molecular	51
3.3. CUANTIFICACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE CPA EN PLACA POR <i>P. COMMUNE</i> POR HPLC	52
3.3.1. Siembra y extracciones.....	52
3.3.2. Análisis por HPLC	52
3.4. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA Y LIPOLÍTICA DE UNA SELECCIÓN DE CEPAS DE <i>PENICILLIUM</i>	53
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	54
5. CONCLUSIONES	60
6. REFERENCIAS.....	61

CAPÍTULO III. AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE BAL CON ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE LECHE..... 75

1. INTRODUCCIÓN	76
2. OBJETIVOS	83
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	84
3.1. RECOGIDA DE MUESTRAS DE LECHE.....	84
3.2. CEPAS DE <i>PENICILLIUM</i> UTILIZADAS	84
3.3. AISLAMIENTO DIRECTO A PARTIR DE LECHE, DE CEPAS DE BAL CON ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA.....	84
3.4. CONFIRMACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA.....	85

3.5. ACTIVIDAD FRENTE A OTRAS CEPAS DE <i>PENICILLIUM</i>	86
3.5.1. Cepas de <i>Penicillium</i> utilizadas.....	86
3.6. EFECTO DE BAL EN EL CRECIMIENTO Y LA PRODUCCIÓN DE MICOTOXINAS	86
3.6.1. Cultivos de BAL y <i>Penicillium</i> spp.....	87
3.6.2. Cuantificación de micotoxinas	87
3.6.3. Técnica de siembra y estimación de micelio seco	87
3.6.4. Extracción de las micotoxinas	87
3.7. IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LAS BAL.....	87
3.7.1. Identificación molecular por secuenciación del gen ADNr 16S.....	87
3.7.2. Características fenotípicas	88
3.7.2.1. Perfil de fermentación de azúcares (<i>API50CHL</i>).....	88
3.7.2.2. Perfil enzimático (<i>APIZYM</i>)	89
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	89
4.1. AISLAMIENTO DE BAL CON ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA Y CUANTIFICACIÓN DE LA ACTIVIDAD EN EL CRECIMIENTO DE <i>P. COMMUNE</i> Y <i>P. NORDICUM</i>	89
4.2. IDENTIFICACIÓN DE BAL	93
4.2.1. Secuenciación del ADNr 16S	93
4.2.2. Características fenotípicas	94
4.2.2.1. Perfil de fermentación de azúcares	94
4.2.2.2. Perfil enzimático.....	98
4.3. ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA FRENTE A DIVERSAS CEPAS DE <i>PENICILLIUM</i> ALTERANTES Y TOXIGÉNICAS.....	99
5. CONCLUSIONES	103
6. REFERENCIAS	104
CAPÍTULO IV. EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTAGONISTA DE BAL FRENTE A BACTERIAS PATÓGENAS.....	109
1. INTRODUCCIÓN.....	110
2. OBJETIVOS	113
3. MATERIALES Y MÉTODOS	113
3.1. CEPAS DE BAL UTILIZADAS	113

3.2. CEPAS DE ESPECIES PATÓGENAS UTILIZADAS	113
3.4. ACTIVIDAD INHIBIDORA DEL CRECIMIENTO	114
3.4.1. Cepas de especies patógenas utilizadas.....	115
3.4.2. Tratamiento de las muestras	115
3.4.3. Técnica de turbidimetría cinética (Bioscreen).....	115
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	117
5. CONCLUSIONES	125
6. REFERENCIAS.....	126
CAPÍTULO V. IDENTIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS DE BAL RESPONSABLES DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA	130
1. INTRODUCCIÓN	131
2. OBJETIVOS	135
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	135
3.1. CEPAS DE BAL UTILIZADAS	135
3.2. CEPA DE <i>PENICILLIUM</i> UTILIZADA	136
3.3. TRATAMIENTOS DE LAS MUESTRAS.....	136
3.4. TÉCNICA DE IMPEDANCIA	136
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	139
5. CONCLUSIONES	142
6. REFERENCIAS.....	143
CAPÍTULO VI. ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE LA CEPA LP-25/1 EN ELABORACIÓN DE QUESO TIPO CASTELLANO	145
1. INTRODUCCIÓN	146
2. OBJETIVOS	147
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	147
3.1. EFECTO DE BAL EN EL CRECIMIENTO DE <i>P. COMMUNE</i> Y <i>P. NORDICUM</i> EN CUÑAS Y TROZOS DE QUESO	147
3.1.1. Cepa BAL y cultivos	147
3.1.2. Inóculos fúngicos.....	148
3.1.3. Inoculación de las cuña/trozos de queso.....	148

3.2. FABRICACIÓN DE QUESO EN LA UNIVERSIDAD DE LEÓN (FABRICACIÓN A)	149
3.2.1. Cepa BAL y cultivos	149
3.2.2. Proceso de elaboración del queso	149
3.2.3. Inóculo fúngico.....	151
3.2.4. Monitorización del crecimiento fúngico.....	151
3.3. FABRICACIÓN DE QUESOS EN LA EMPRESA COLABORADORA (FABRICACIÓN B)	152
3.3.1. Inóculo fúngico	154
3.3.2. Toma de muestras	154
3.3.3. Análisis físico-químicos.....	155
3.3.4. Análisis microbiológicos.....	155
3.3.4.1. Recuento de BAL	155
3.3.4.2. Recuento de mohos.....	155
3.3.5. Análisis estadístico.....	155
3.3.6. Monitorización del crecimiento fúngico	156
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	156
5. CONCLUSIONES	166
6. REFERENCIAS	167
CONCLUSIONES	170
ANEXO I. MEDIOS DE CULTIVO	172
ANEXO II. FOTOGRAFÍAS	176

RESUMEN

Esta Tesis Doctoral fue planteada a fin de aislar bacterias ácido-lácticas (BAL) con actividad antifúngica de muestras de leche de vaca, oveja y cabra para el desarrollo de un cultivo iniciador que incluya una de estas cepas para la elaboración de queso madurado tipo Castellano, identificar la naturaleza de la actividad antifúngica principalmente frente a *Penicillium commune*, que es la especie más problemática en quesos madurados, la actividad antagonista frente a bacterias patógenas de las cepas de BAL elegidas y la naturaleza de la actividad antagonista. Además de esto, aprovechando la toma de muestras, se investigó la microbiota mesófila y diferentes grupos de BAL, además de la composición físico-química de la leche de cabra producida en las explotaciones investigadas. Finalmente, se aislaron de quesos madurados (tanto alterados como no alterados) tipo Castellano e identificaron hongos para conocer la diversidad fúngica de este tipo de producto.

Los resultados obtenidos indican que las leches de cabra y vaca son una importante fuente de *Lactobacillus* con capacidad antifúngica, superior a la leche de oveja. Además de capacidad antifúngica, las cepas de BAL evaluadas demostraron capacidad antagonista frente a cuatro especies de bacterias patógenas de interés en leche y productos lácteos (*Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes*). La naturaleza de la actividad antifúngica de las cepas de BAL probadas frente a *Penicillium commune* es ácida, así como la mayor parte de la actividad antagonista frente a patógenos. La cepa LP-25/1 (*Lactobacillus paracasei*) aislada de leche de cabra mostró actividad antifúngica en fabricaciones controladas de queso tipo Castellano incorporándolo como parte del cultivo iniciador, retrasando el crecimiento, en particular, de *Penicillium commune*, lo que indica su potencial para el control del deterioro de mohos en queso. La calidad microbiológica de la leche de cabra de las explotaciones muestreadas es parcialmente satisfactoria tomando como referencia los límites legales de la Unión Europea y presenta unas características físico-químicas deseables en este tipo de alimento. *Penicillium commune* es la especie mayoritaria de los quesos investigados, tanto en los alterados como en los comercialmente listos para consumo, sin embargo, el papel de esta especie en la maduración del queso aún está por determinarse, ya que algunos autores afirman que tiene una contribución positiva a las características sensoriales del queso y nosotros hemos comprobado la comercialización

de quesos con esta especie en la superficie. En este sentido, hemos hallado una cepa de *P. commune* (M57) con potencial para su uso como cultivo de superficie debido a su baja micotoxigenicidad.

ABSTRACT

The aim of this work was the isolation of lactic acid bacteria (LAB) showing antifungal activity, mainly against *Penicillium commune*, from cow's, ewe's and goat's milk with the purpose of developing a starter culture useful in Castellano cheese making. The physico-chemical composition and the mesophilic and lactic acid bacteria of goat milk was also investigated, as well as the fungal diversity of Castellano-like cheeses.

The results indicate that cow's and goat's milk are an important source of species of the genus *Lactobacillus* with antifungal activity against *Penicillium commune* and antibacterial activity against type strains of pathogenic bacteria commonly found in dairy products (*Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*).

The antifungal activity is mainly due to the production of organic acids and the use of the strain LP-25/1 (*Lactobacillus paracasei*) as a starter culture inhibits the superficial growth of *Penicillium commune* during the manufacture and ripening of Castellano cheese, suggesting a potential use as biopreservative.

The microbiological quality of goat milk is partially in accordance with the UE criteria, whereas the physico-chemical composition shows the desirable characteristics of this kind of product.

Penicillium commune was the main mold detected in samples of Castellano cheese, both spoiled and unspoiled, its role being controversial, as some authors consider that it can contribute to the sensory quality of cheese. Taking this into account, a strain of *P. commune* (M57) has been characterized and considered as suitable for surface inoculation, due to its low micotoxigenicity.



INTRODUCCIÓN GENERAL

Y OBJETIVOS

1. IMPORTANCIA GENERAL DE LA LECHE

España en el año de 2017 ha producido 7.027.000 toneladas de leche de vaca, 491.000 toneladas de leche de cabra y 514.000 toneladas de leche de oveja (MAPAMA, 2018). La leche es la secreción de la glándula mamaria de las hembras de los mamíferos y su papel biológico es el de nutrir y proporcionar protección inmunológica a las crías. Las leches producidas por vacas, búfalos, ovejas, cabras y camellos se utilizan en diversas partes del mundo para el consumo humano por gran parte de la población mundial y la leche de vaca representa la mayoría de la leche procesada para consumo humano. La leche es un fluido biológico complejo que contiene aproximadamente 100.000 moléculas diferentes en varios estados de dispersión. Los principales componentes, proteínas, la lactosa, la grasa y los minerales se pueden separar y aislar de la leche con relativa facilidad. El principal componente de la leche es el agua; el resto consiste principalmente en grasa, lactosa y proteínas (caseína y proteínas de suero) (Tabla 1) (Robison, 2002). Según Beloti *et al.* (2015) la genética es el principal factor que puede interferir en la composición de la leche, el estado fisiológico, estación del año, alimentación y fases de la lactación también deben ser considerados importantes.

Tabla 1. Composición comparativa de la leche de diferentes especies^a.

Tipo de leche	Proteína %	Lactosa %	Grasa %	Extracto seco %
Humana	1.10	6.92	3.67-4.70	8.90
Cabra	2.90	4.08	3.80	8.68
Vaca	3.23	4.78	3.67	9.02
Oveja	6.21	3.7	7.62	10.33

^a(Jandal 1996; Posati y Orr 1976).

El principal componente lipídico de la leche son los triglicéridos, que constituyen alrededor del 98% de la grasa de la leche. El 2% restante de los lípidos incluye diglicéridos, monoglicéridos, colesterol, fosfolípidos y ácidos grasos libres. La leche bovina normal contiene aproximadamente un 3,5% de proteínas, que pueden fraccionarse en dos grupos principales mediante acidificación: a pH 4,6 a 20 °C, aproximadamente el 80% de la proteína total precipita y son las caseínas; el resto de proteínas solubles tras acidificación consiste en una mezcla de beta-lactoglobulina, alfa-lactoalbúmina, globulinas y otras proteínas. Las sales de leche consisten principalmente en cloruros, fosfatos, citratos, sulfatos y bicarbonatos de sodio, potasio, calcio y

magnesio. Algunas de las sales de leche (es decir, los cloruros, sulfatos y compuestos de sodio y potasio) son solubles y están presentes casi en su totalidad en forma de iones disueltos en suero de leche. La lactosa, el principal carbohidrato en la leche, se encuentra en la leche de vaca a niveles de 4.8%. Este nivel de azúcar no hace que la leche sea excesivamente dulce porque la lactosa es menos dulce que la sacarosa y menos dulce que la mezcla de sus componentes, galactosa y glucosa. La lactosa tiene una contribución importante a las propiedades coligativas de la leche (presión osmótica, disminución del punto de congelación, elevación del punto de ebullición). La leche también contiene muchas vitaminas (por ejemplo, vitaminas A y C), enzimas (por ejemplo, lactoperoxidasa y fosfatasa ácida) y células somáticas (Robison, 2002).

1.1.MICROBIOLOGÍA DE LA LECHE

La leche es un excelente medio de cultivo para muchos microorganismos merced a su alto contenido en agua, su pH cercano a la neutralidad y su gran variedad de nutrientes por lo que una vez producida la llegada de los mismos se produce un proceso de adaptación y crecimiento en el medio; no obstante a pesar de constituir un medio apropiado para el desarrollo, no todos los microorganismos son capaces de crecer en la leche cruda, puesto que algunas barreras naturales presentes en la leche (inmunoglobulinas, lisozima, lactoferrina, transferrinas) impiden su crecimiento (Claeys *et al.*, 2013).

Las fuentes de contaminación biológica de la leche cruda son múltiples y diversas; aunque, en general, se admite que la leche en el interior de la glándula mamaria de los animales sanos es prácticamente estéril, las posibilidades de contaminación durante el ordeño y su manejo posterior determinan que en condiciones de máxima asepsia la leche recién ordeñada pueda tener valores normales comprendidos entre 5×10^3 y 5×10^4 ufc/mL. Además, en ocasiones, los microorganismos presentes en el propio animal pueden contaminar directamente la leche (contaminación endógena) bien a partir de una infección sistémica bien a partir de una infección localizada en la ubre (Ferrús Pérez *et al.*, 2015).

Un indicador útil para monitorear las condiciones sanitarias presentes durante la producción, recolección y manejo de la leche cruda es el recuento bacteriano "total" o el recuento estándar en placa. Su principal valor es indicar cambios en el entorno de producción, recolección, manejo y almacenamiento, pero no da información sobre las fuentes de contaminación bacteriana o la identidad de las deficiencias de producción.

También hay otros indicadores útiles, como el recuento de microorganismos coliformes o de bacterias formadoras de esporas, que pueden ayudar a determinar deficiencias higiénicas (Chambers, 2002).

Buena parte de las bacterias deseables en la leche están incluidas en el grupo de las bacterias ácido lácticas (BAL). En la leche fresca, cuando la contaminación es pequeña, la microbiota ideal está constituida predominantemente por BAL de los géneros *Lactobacillus* y *Lactococcus*. Las BAL son bacterias (cocos y bacilos) Gram positivas, no formadoras de esporos y productoras de ácido láctico, pueden ser homofermentativas o heterofermentativas y crecen mal a temperaturas por debajo de 5 °C. Los géneros de bacterias incluidas en el grupo BAL han sido objeto de muchas controversias y más de 20 géneros pueden encajarse en la definición del grupo, pero los principales son: *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Aerococcus*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weisella*. Entre estos, se destacan como de interés tecnológico, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Pediococcus* y *Leuconostoc* (Robison, 2002).

Antes de la adopción de la pasteurización de rutina, la leche era un vehículo importante para la transmisión de una amplia gama de enfermedades microbianas, como la fiebre tifoidea, la brucelosis y la difteria. La pasteurización y las mejoras en la medicina veterinaria han supuesto una reducción muy grande en la incidencia de enfermedades tradicionalmente transmitidas por la leche. Sin embargo, la leche cruda todavía puede contener una gama muy amplia de patógenos como *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., *Escherichia coli* verotoxigénico, *Yersinia enterocolitica* y *Listeria monocytogenes*, así como las intoxicaciones por enterotoxina producida por *Staphylococcus aureus*, serían los agentes identificados con mayor frecuencia en los brotes relacionados con el consumo de leche cruda o productos derivados de la misma (Claeys *et al.*, 2013). En resumen, la leche cruda es un producto potencialmente peligroso, cuya seguridad microbiológica no se puede garantizar sin el uso de pasteurización o un proceso equivalente (Djuretic *et al.*, 1997).

Otro importante peligro de origen microbiológico es la presencia de micotoxinas en la leche. Las micotoxinas pueden estar presentes en la leche como resultado de la ingestión de piensos contaminados con mohos por el ganado. Se ha demostrado que los piensos contaminados con aflatoxina B1 como resultado del crecimiento de *Aspergillus flavus* o *Aspergillus parasiticus* dan lugar a la presencia de aflatoxina M1 en la leche de las vacas lecheras que la consumen. Sin embargo, solo un pequeño porcentaje (0,4 -

2,2%) de la toxina ingerida aparece en la leche, las aflatoxinas son compuestos persistentes y no se ven muy afectados por el procesado, por lo que podrían estar presentes en la leche pasteurizada y envasada (Hairston *et al.*, 2016).

1.2. CARACTERÍSTICAS DEL QUESO CASTELLANO

La producción mundial de queso es de aproximadamente 19 millones de toneladas por año y sigue aumentando un 4% anual en los últimos 30 años, Europa es la mayor productora a nivel mundial con una producción que oscila en torno a 11 millones de toneladas por año (Fox *et al.*, 2017). Según el Real Decreto 1113/2006, se entiende por queso al 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.

España fue responsable de un 30% de la producción de queso puro de oveja y de un 39% del queso de mezcla producidos en toda Unión Europea (MAPAMA, 2018). El Queso Castellano es una marca de calidad colectiva creada por la Federación Castellano Leonesa de Industrias lácteas y es un queso graso o extra-graso de coagulación enzimática y de prensado intenso con una larga vida útil que está elaborado con leche cruda o pasteurizada de oveja procedente de explotaciones ubicadas en Castilla y León (www.quesocastellano.es).

El Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPAMA, 2018) ha publicado un “Catálogo Electrónico de Quesos de España” y define las siguientes características del “Queso Castellano” como: “Razas de ganado: el queso tradicional se elabora con leche de las razas ovinas autóctonas, churra y castellana. Zona de elaboración: comunidad autónoma de Castilla y León. Origen: Se sabe que desde la Edad Media en esta región eran tan importantes los quesos que se empleaban como moneda de cambio en los negocios entre los habitantes. Esta comunidad posee en la actualidad una materia prima de gran calidad, y en abundancia, ya que es la primera comunidad en cuanto a cabezas de ganado ovino y bovino. Por otro lado es su clima mediterráneo continental, el contraste de su relieve mostrando un contorno montañoso y un interior liso, lo que propicia su diversa vegetación, en ella crecen un sinfín de plantas

aromáticas (espliego, tomillo, romero, salvia, hierbabuena, orégano...), cuyos aromas, al ser estas plantas parte de la alimentación del ganado, se transmiten al queso y esto junto a una tradicional forma de hacer el queso, hacen que el “Queso Castellano” tenga unas cualidades peculiares que le distinguen de otros quesos de oveja de coagulación enzimática y de pasta prensada”.

1.3. RAZONES POR LAS QUE EL QUESO ES UN SUSTRATO FAVORABLE PARA BACTERIAS Y MOHOS.

1.3.1. BACTERIAS

Las características de las variedades individuales de queso influyen en gran medida en la presencia de diferentes bacterias y su supervivencia. La temperatura de proceso y almacenamiento, la producción de ácido por los cultivos iniciadores y la adición de sal son aspectos importantes. En general, los quesos blandos y semiblandos con altas actividades de agua presentan menos barreras para la supervivencia y el crecimiento de microorganismos patógenos que los quesos curados. En los quesos frescos con un pH suficientemente alto, como el requesón, puede ocurrir un deterioro bacteriano, normalmente debido a especies Gram negativas, psicrotofas, como *Pseudomonas* y bacterias coliformes. Estos organismos pueden contaminar el producto a través del agua utilizada en los distintos procesos. *Pseudomonas* spp., *Alcaligenes* spp., *Achromobacter* spp. y *Flavobacterium* spp. son las bacterias psicrotofas de mayor preocupación. *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas fragi* y *Pseudomonas putida* causan amargor, putrefacción y olor rancio, licuefacción, gelatinización de la cuajada y formación de mucosidad en las superficies de los quesos. *Alcaligenes viscolactis* provoca una alteración característica en el requesón y el queso “cottage”. Asimismo, especies psicrotofas del género *Bacillus* causan amargor y defectos proteolíticos en los quesos (Robison, 2002).

Las bacterias también pueden causar deterioro por la producción de gas en la masa del queso, dando lugar a hendiduras, pequeños agujeros o hinchazón. Esto puede suceder en el queso fresco, al principio de la fase de maduración (hinchazón temprana), o bien en la etapa de maduración (hinchazón tardía). Las especies comúnmente involucradas son *Clostridium butyricum*, *Clostridium tyrobutyricum* y *Clostridium sporogenes*, cuyas esporas sobreviven a la pasteurización y pueden estar presentes en la leche destinada a la fabricación de queso. En general, aunque el queso puede ser portador de bacterias patógenas, es un producto relativamente seguro, considerando su

elevado consumo mundial. Sin embargo, ha habido una serie de brotes de enfermedades transmitidas por los alimentos asociadas con el queso bien documentados. Los brotes más graves han sido causados por *Listeria monocytogenes* y *Salmonella*. En los últimos años, han ocurrido una serie de brotes de *Escherichia coli* O157, vinculados al queso. En este sentido, los quesos elaborados con leche cruda constituyen el principal riesgo (Fernandes, 2010; Aesan, 2012).

1.3.2. MOHOS

El queso es un excelente sustrato para el crecimiento de los mohos (Bullerman 1981; Pitt y Hocking 2009), así como las condiciones ambientales durante la producción y la maduración son favorables para los hongos: alta humedad, temperaturas relativamente bajas, circulación de aire, maduración al aire libre en algunos casos y con muchos quesos almacenados juntos. En tales condiciones, el crecimiento de hongos puede ocurrir fácilmente. Los lugares más húmedos son los sitios de producción, prensado y plastificación, mientras que en las salas de maduración las condiciones son de menor humedad relativa. Cada sección del proceso de producción de queso tiene una microbiota fúngica típica, que puede diferir según la fábrica y las condiciones de elaboración (Stark, 2007).

Los mohos pueden desempeñar diferentes funciones a lo largo de la vida útil del queso, tanto beneficiosas como perjudiciales (alteración, producción de micotoxinas). Los factores que permiten que los hongos causen deterioro en el queso son la capacidad de crecer a temperaturas de refrigeración, crecer en bajas concentraciones de oxígeno, actividad lipolítica, resistencia a la acción conservadora de ácidos grasos libres y crecimiento a agua reducida (Pitt y Hocking 2009). A pH neutro los procariontes tienen ventaja y los hongos filamentosos son a menudo superados por las bacterias, aunque en algunos casos la producción de antibióticos y otros metabolitos extracelulares les confiere una buena capacidad competitiva (Fernandes, 2010).

Los quesos pueden alterarse por el crecimiento de colonias visibles en la superficie o en pequeñas fisuras de la masa del queso o la producción de olores y sabores desagradables. El crecimiento de los mohos puede observarse en el queso durante la maduración (bastante común en algunas variedades de queso), en el almacenamiento y en la distribución minorista e incluso a nivel doméstico. Además, el crecimiento de hongos también puede representar un riesgo para la salud del

consumidor, ya que muchas especies pueden producir micotoxinas (Bullerman, 1981; Lund *et al.*, 1995).

1.4. PRINCIPALES MOHOS Y MICOTOXINAS EN QUESOS

Aunque el queso y otros productos lácteos constituyen un buen sustrato para el crecimiento de numerosas especies de mohos, se suelen citar principalmente especies de los géneros *Penicillium*, *Cladosporium*, *Mucor*, *Aspergillus* y *Geotrichum* (Ledenbach y Marshall, 2009; Pitt y Hocking, 2009). Los defectos resultantes en el producto incluyen el crecimiento visible del moho en la superficie, que puede producir cambio de coloración, sabores desagradables (Rowe y Donaghy, 2011) y en algunos casos micotoxinas (Gourama y Bullerman, 1995).

En un estudio llevado a cabo sobre diversas variedades de quesos en España, Italia, Suiza, Dinamarca, Francia, Grecia, Reino Unido y otros países, se identificaron un 91% de los hongos aislados como del género *Penicillium* y de estos el 42% pertenecía a la especie *Penicilium commune*, siendo otras especies encontradas *P. palitans* y *P. nalgiovense* y, con menor importancia, *P. verrucosum*, *P. nordicum*, *P. solitum*, *P. roqueforti*, *Scopulariopsis brevicaulis* y *Aspergillus versicolor* (Lund *et al.*, 1995).

Según Frisvad y Samson (2004), Frisvad *et al.* (2007) y Pitt y Hocking (2009) existen 15 especies de *Penicillium* subgénero *Penicillium* asociadas al deterioro del queso que pertenecen a cinco secciones, revisadas recientemente por Houbraken *et al.* (2016) (Tabla 2).

Tabla 2. Especies de *Penicillium* (subgénero *Penicillium*) asociadas a la alteración del queso y micotoxinas que producen y que han sido encontradas en este alimento.

Sección <i>Brevicompecta</i>	Sección <i>Roquefortorum</i>	Sección <i>Chrysogena</i>	Sección <i>Penicillium</i>	Sección <i>Fasciculata</i>
Serie <i>Olsonii</i>	Serie <i>Roqueforti</i>	Serie <i>Chrysogena</i>	Serie <i>Expansa</i>	Serie <i>Viridicata</i>
<i>P. brevicompactum</i> ^a	<i>P. roquefortia</i> ^{bc}	<i>P. chrysogenum</i> ^b	<i>P. expansum</i> ^{bd}	<i>P. viridicatum</i> ^e
		<i>P. nalgiovense</i>		
				Serie <i>Verrucosa</i>
				<i>P. nordicum</i> ^f
				<i>P. verrucosum</i> ^f
				Serie <i>Camemberti</i>
				<i>P. solitum</i>
				<i>P. discolor</i>
				<i>P. echinulatum</i>
				<i>P. commune</i> ^g
				<i>P. palitans</i> ^{cg}
				<i>P. crustosum</i> ^b
				<i>P. atramentosum</i> ^b

^a ácido micofenólico; ^b roquefortina C; ^c isofumigaclavina; ^d patulina; ^e ácido penicílico; ^f ocratoxina A; ^g ácido ciclopiazónico.

Penicillium es el género de hongos contaminantes más importante encontrado en los quesos madurados (Bullerman, 1981; Frisvad *et al.*, 2007; Frisvad y Samson, 2004; Lund *et al.*, 1995; Pitt y Hocking, 2009). Este género incluye más de 200 especies. La característica definitoria es la estructura reproductora en forma de pincel (“penicillus” en latín), que produce esporas mitóticas exógenas llamados conidios (Figura 1). El penicilio está compuesto por un conidióforo que contiene células fiálides (conidios), que determinan uno o varios verticilos (Perrone y Susca, 2017).

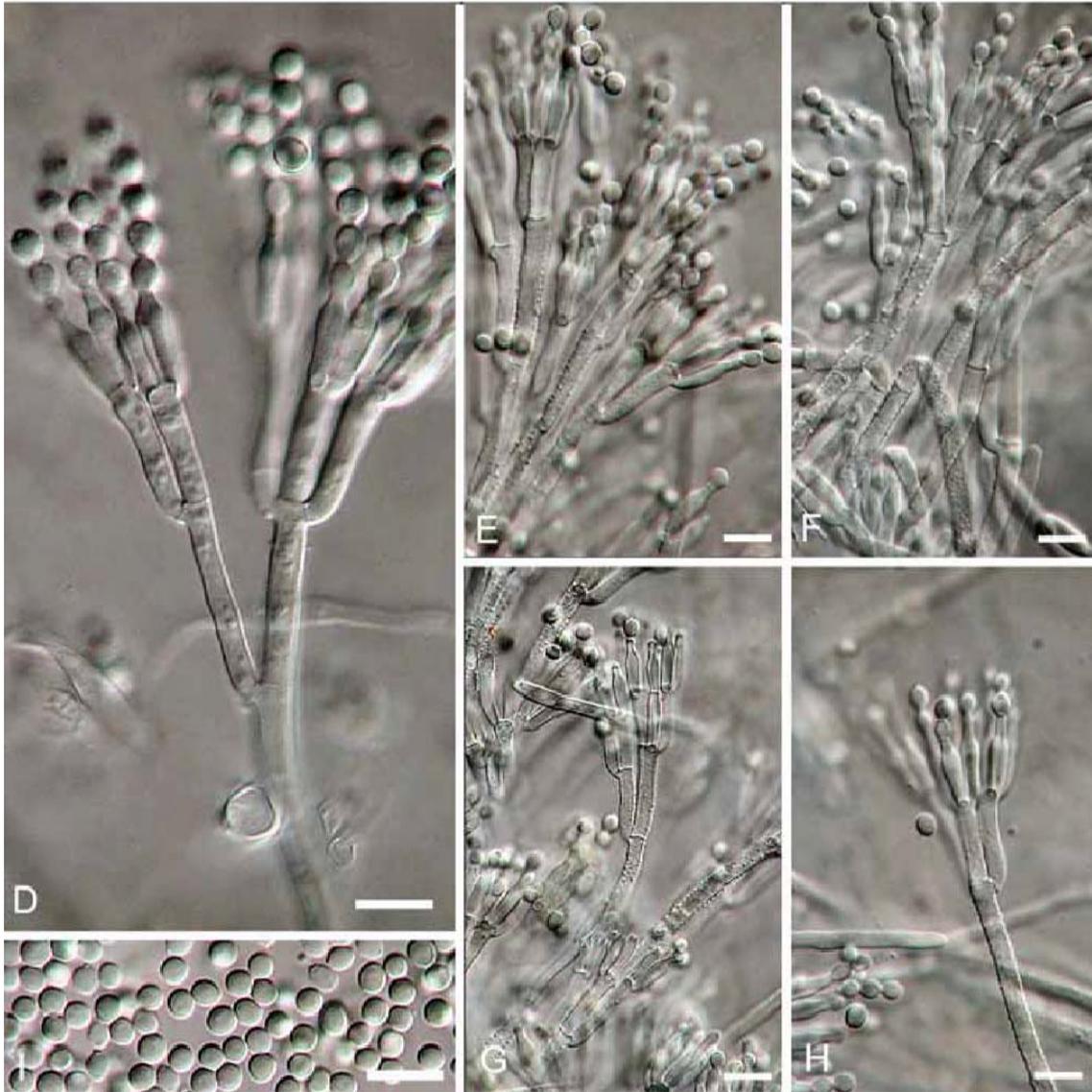


Figura 1. D-H Conidióforos y conidios de *Penicillium* (*P. commune*) (Frisvad y Samson, 2004).

La identificación de este género a nivel de especie es una tarea muy compleja, ya que la mayoría de las especies tienen características muy similares. La morfología ha sido el principal método de definición taxonómica, basado en la observación de micro- y macro-caracteres, utilizando también otros caracteres fenotípicos, por ejemplo, crecimiento a diferentes temperaturas y en diferentes medios de cultivo o la presencia de pigmento y exudado (Figura 2) (Pitt, 1979).

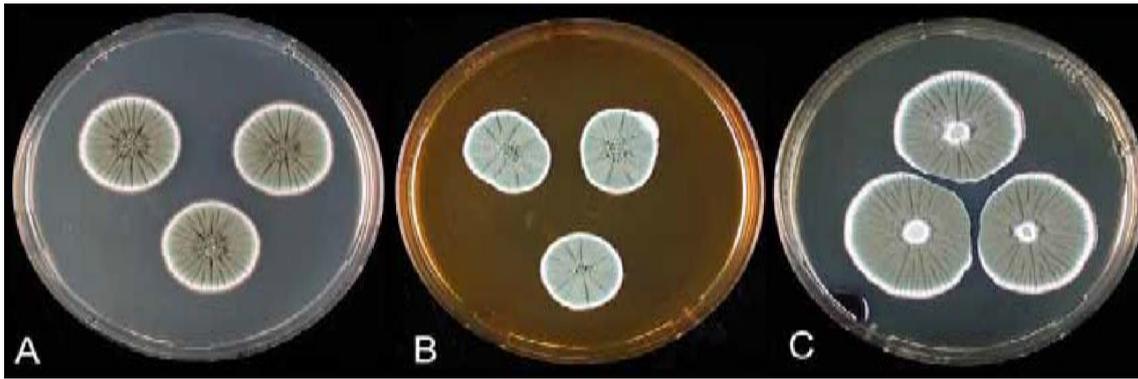


Figura 2. Colonias de 7 días *Penicillium commune* en CYA (Agar Czapek Extracto de Levadura), B. MEA (Agar de extracto de malta), C. YES (Agar extracto de levadura sacarosa) (Frisvad y Samson, 2004).

La técnica estándar para la identificación y clasificación de hongos filamentosos sigue siendo la morfología, aunque la variabilidad dentro de los caracteres morfológicos de las especies reconocidas lo convierte en un método dificultoso. Los métodos convencionales de identificación se basan en la observación microscópica, las tasas de crecimiento y los colores/morfología en los medios de crecimiento (Frisvad y Samson, 2004; Pitt y Hocking, 2009) y también el análisis de metabolitos secundarios, introducidos por Frisvad y Samson (2004).

Por lo tanto, un enfoque general basado en la observación de los caracteres morfológicos, fisiológicos y bioquímicos (análisis de extrolitos) es necesario para caracterizar estos hongos. Además de estos análisis, las técnicas de biología molecular han sido señaladas en los últimos años como un paso a más para la identificación, según Perrone y Susca (2017), siendo su principal ventaja el análisis de características genotípicas estables que no se ven afectados por las condiciones de cultivo ni sujetas a la interpretación del operador. La identificación molecular se basa en un sistema de referencia filogenético preciso, que ofrece una gran ventaja sobre los métodos fenotípicos convencionales (difíciles de usar por no especialistas y responsables de las frecuentes identificaciones erróneas) para el diagnóstico de especies. Así, Frisvad y Samson (2004) propusieron un enfoque con distintas fases para identificar *Penicillium* subgénero *Penicillium* basado en análisis morfológico, químico y molecular y denominado enfoque polifásico (Figura 3).

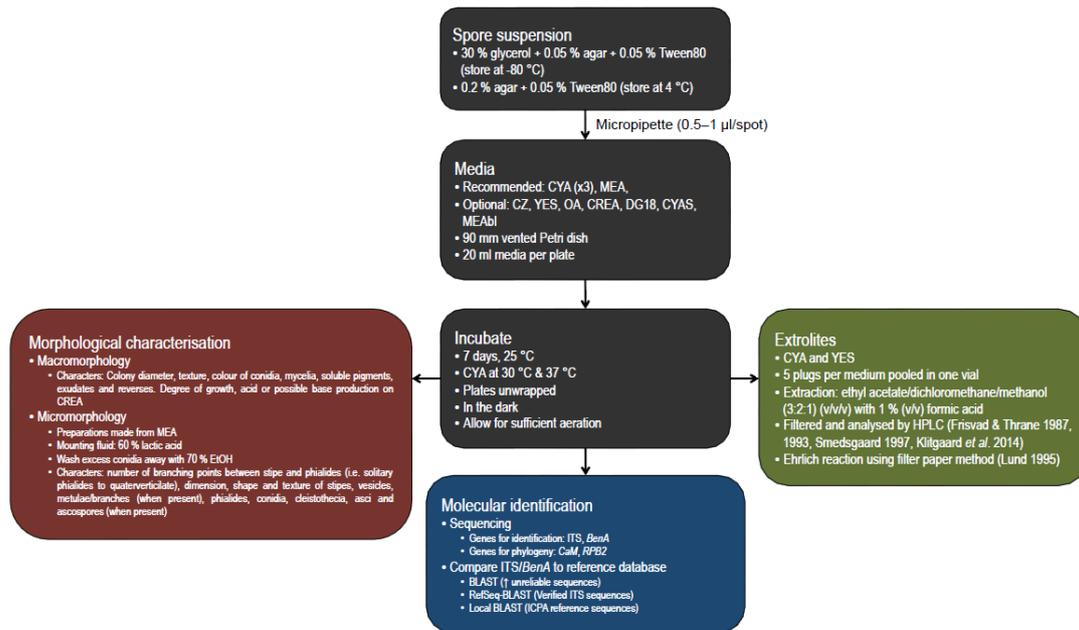


Figura 3. Esquema de la identificación polifásica de hongos (Visagie *et al.*, 2014).

La mayoría de especies del género *Penicillium* asociadas a la alteración en quesos son productoras de micotoxinas. Las micotoxinas asociadas a los quesos son: ácido micofenólico, roquefortina C, isofumigaclavina, patulina, ácido penicílico, ocratoxina A, ácido ciclopiazónico (Tabla 2).

Las ocratoxinas son metabolitos secundarios de *Aspergillus* y *Penicillium* (Tabla 2), son peligrosos para la salud por medio de la contaminación de los alimentos. La ocratoxina A (OTA) sigue siendo el miembro más potente del grupo de las micotoxinas, tiene una larga vida media en los humanos 840 h (35 días) y por lo tanto es fácilmente detectable en suero. Los estudios de su ingesta en la dieta han confirmado la relación entre la nefrotoxicidad endémica en humanos y la ingesta diaria de OTA. Se ha informado que la OTA contribuye a la nefrotoxicidad y carcinogenicidad endémicas en humanos y animales. Produce tumores renales, alteraciones en el DNA y aberraciones cromosómicas en los riñones, puede ser embriotóxica, teratogénica e inmunotóxica solo en dosis más altas de las que causan nefrotoxicidad. La incidencia de nefrotoxicidad endémica se ha registrado principalmente en el noreste de Europa desde principios de los años cincuenta (Reddy y Bhoola, 2010). La normativa actual de la Comisión Europea (2006) actualmente excluye el queso de los alimentos con niveles máximos de OTA.

La patulina es altamente tóxica para las células animales y vegetales. Puede reaccionar con los grupos sulfhidrilo de proteínas y polipéptidos presentes en los

alimentos. Se ha observado que provoca disrupción de la membrana plasmática, inhibición del transporte de aminoácidos dependiente de sodio, interfiere en la traducción y la transcripción, inhibe la síntesis de ADN. También pueden inhibir la actividad de numerosas enzimas debido a su afinidad por los grupos sulfhidrilo y tiene un efecto inhibitorio sobre parámetros bioquímicos tales como la actividad ATPasa, alcalina fosfatasa, aldolasa y hexoquinasa. En estudios donde la patulina era administrada a dosis altas durante dos meses se observó un efecto carcinogénico con la producción de sarcomas, pero en estudios con dosis bajas no se observó efecto (Welke *et al.*, 2009). La IARC (International Agency for Research on Cancer) concluye que no hay evidencia adecuada que demuestre un efecto carcinogénico de la patulina en animales de experimentación y no se ha evaluado su efecto en humanos (IARC, 1986). La normativa actual en la Unión Europea excluye el queso de los productos alimenticios con niveles máximos de patulina (Comisión Europea, 2006).

Como ya dicho anteriormente la especie dominante del género *Penicillium* en los aislados de quesos es *P. commune* (42%) (Lund *et al.*, 1995) y la mayoría de las cepas de esta especie es productora de ácido ciclopiazónico.

El ácido ciclopiazónico (Holzapfel, 1968) es un potente ácido orgánico quelante del calcio que produce necrosis focal en la mayoría de los órganos internos de los vertebrados. En un principio se creía que las aflatoxinas eran responsables de todos los efectos tóxicos del maíz contaminado con *Aspergillus flavus* en los pavos en la enfermedad X del pavo, pero más tarde se demostró que el ácido ciclopiazónico tenía un efecto grave en los músculos y los huesos de los pavos (Jand *et al.*, 2005; Dorner *et al.*, 1983).

Aspergillus flavus y la forma domesticada *Aspergillus oryzae* producen a menudo grandes cantidades de ácido ciclopiazónico. *Aspergillus flavus* es común en el aceite semillas, nueces, cacahuetes y cereales, pero también pueden producir aflatoxina en frutos secos (Pitt y Hocking, 2009).

Penicillium commune, su forma domesticada *Penicillium camemberti* y la especie estrechamente relacionada *Penicillium palitans* se encuentran regularmente en los quesos y productos cárnicos y pueden producir ácido ciclopiazónico en estos productos (Pitt *et al.*, 1986; Polonelli *et al.*, 1987; Frisvad y Samson, 2004). *Penicillium griseofulvum* también es un importante productor de ácido ciclopiazónico, y puede aparecer en cereales almacenados durante mucho tiempo y productos de cereales, como pasta (Pitt y Hocking, 2009). Otros productores de ácido ciclopiazónico en *Aspergillus*

incluyen *Aspergillus parvisclerotigenus*, *Aspergillus pseudotamarii* y *Aspergillus tamarii*, pero el papel de estos hongos con respecto a la producción de CPA no es claro. *Penicillium dipodomyicola*, otro buen productor de CPA, hasta ahora solo se ha encontrado raramente en alimentos (Frisvad *et al.*, 2007). Es importante tener presente que la presencia de CPA en alimentos no está regulada en la Unión Europea (no se contempla en el Reglamento 1881/2006; Comisión Europea, 2006).

1.5. CONTROL DE MOHOS EN QUESO

En la mayoría de los países, la natamicina y/o los sorbatos son los únicos agentes antimicóticos aprobados para el tratamiento de la superficie de quesos y embutidos secos. Aunque los sorbatos inhiben eficazmente el crecimiento de muchos organismos alterantes que aparecen en estos productos, debido a la inhibición de la actividad de enzimas respiratorias, también presentan algunos inconvenientes: se necesitan concentraciones relativamente altas para prevenir el crecimiento de moho y algunas especies de mohos han desarrollado una considerable resistencia al sorbato; además al contrario que la natamicina, que permanece en la superficie, el sorbato migra hacia el interior del producto, lo que reduce su efectividad. Por su parte, la natamicina se une al ergosterol en la membrana celular del hongo, alterando sus funciones, lo que lleva a la muerte celular. La natamicina parece tener un efecto de "todo o nada", tal vez explicado por la teoría de un solo golpe, que sugiere que incluso en soluciones diluidas, la natamicina forma micelas. Si una célula fúngica entra en contacto con tal micela, la concentración local de natamicina siempre es lo suficientemente alta y el moho no sobrevivirá. Dado que no hay separación entre concentraciones fungistáticas y fungicidas, es poco probable que se desarrolle resistencia (Frisvad *et al.*, 2007).

En Europa (Comisión Europea, 2008), se permite un tratamiento en superficie de los quesos curados con ácido sórbico y sorbatos (E200-203, máx. 1000 mg/kg) en queso en lonchas, cortado y envasado; queso en capas y queso con otros alimentos añadidos y "quantum satis" solo tratamiento de superficie de productos curados. También se permite natamicina (E234; 1 mg/dm² de superficie, no presente a 5 mm de profundidad) como tratamiento de superficie de queso duro, semiduro y semiblando sin cortar.

1.6. BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS COMO CULTIVO PROTECTOR

Las tendencias modernas de los consumidores suponen la elaboración de alimentos de alta calidad, seguros y mínimamente procesados con una vida útil más larga. Por su parte, las autoridades responsables de legislar sobre alimentos restringen el uso y el nivel permitido de los aditivos que se pueden utilizar actualmente en diferentes alimentos. Esta situación obliga a la industria alimentaria a desarrollar enfoques innovadores para conseguir la conservación de los alimentos. Durante muchos siglos, el antagonismo microbiano se ha utilizado en el procesado de alimentos para mejorar la seguridad alimentaria. En los últimos años se ha adquirido una comprensión del modo de acción de los antagonismos microbianos, aumentando su atención como un medio para aumentar la vida útil y la seguridad de los alimentos, por lo que la conservación biológica se ha convertido en una herramienta prometedora para garantizar la calidad higiénica de los alimentos (Jordan *et al.*, 2014).

Las fermentaciones llevadas a cabo por BAL se han utilizado desde hace miles de años (al menos desde el año 6000 a. C.) para conseguir la conservación de alimentos (Beloti *et al.*, 2015). Además, en los últimos años, se han asociado las BAL con aspectos saludables, lo que ha hecho que se hayan vuelto cada vez más populares. Por estas razones, los consumidores favorecen estos métodos de preservación natural en comparación con los tratamientos químicos o fisicoquímicos. Además, la extensión de vida útil de los alimentos con simples procedimientos tecnológicos accesibles a economías más pequeñas, la posibilidad de resolver problemas emergentes en la cadena alimentaria, y la mejora de la salud animal y humana por medios naturales también deben tenerse en cuenta. Por lo tanto, debido a la mayor demanda de los consumidores de alimentos naturales y de mayor calidad, y las estrictas regulaciones gubernamentales para garantizar la inocuidad de los alimentos, los productores de alimentos se enfrentan al problema de producir alimentos seguros para el consumo y aceptables para las exigencias de los consumidores. Basándose en el amplio espectro de compuestos antimicrobianos producidos, las BAL pueden utilizarse en varias aplicaciones, como biopreservación, extensión de vida útil, biocontrol de fermentación, medicina humana/veterinaria y agricultura (Ahmad *et al.*, 2017; Yang *et al.*, 2014).

La producción de ácidos orgánicos por las BAL y la disminución del pH constituyen los principales mecanismos de biopreservación en alimentos fermentados. Sin embargo, las cepas de BAL son capaces de producir otras sustancias antimicrobianas como bacteriocinas, diacetilo, ácidos grasos, peróxido de hidrógeno,

compuestos antifúngicos (propionato, fenil-lactato, hidroxifenil-lactato y 3-hidroxi ácidos grasos) que pueden ser utilizadas en la biopreservación de alimentos. El uso tecnológico de BAL como cultivos iniciadores ya está sobradamente consolidado en la industria alimentaria, pero de forma más reciente se ha explorado una nueva generación de cultivos iniciadores que ofrecen funcionalidades más allá de la acidificación. Las BAL son capaces de inhibir diferentes microorganismos en los alimentos, mostrando efectos antimicrobianos cruciales con un fuerte impacto en la conservación y la seguridad. Además, debido al modo de acción de las bacteriocinas, formando poros en las membranas, tienen menos probabilidades de inducir resistencia y podrían ser una solución potencial al problema creciente de la resistencia a los antibióticos convencionales (Cotter *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2014).

A pesar del amplio campo de aplicación, una de las principales limitaciones de muchas bacteriocinas es su estrecho espectro de inhibición. Aunque la mayoría de las bacteriocinas solo son activas contra las bacterias Gram positivas, se describió que algunas bacteriocinas producidas por BAL exhiben actividad contra organismos Gram negativos de interés en alimentos y en el tracto intestinal humano / animal (Line *et al.*, 2008). Dado que algunos de los patógenos que causan enfermedades transmitidas por los alimentos son bacterias Gram negativas, se han evaluado estrategias para el uso de bacteriocinas frente a estos microorganismos. Las bacteriocinas tienen una mayor eficacia frente a patógenos Gram negativos si la membrana externa se ha desestabilizado por la acción de otros factores. Se han descrito varios tratamientos posibles, como el uso de ácidos orgánicos, agentes quelantes y aceites esenciales de plantas o tratamientos físicos como calentamiento, congelación, procesamiento a alta presión o campos eléctricos pulsados (Prudêncio *et al.*, 2015).

La seguridad y estabilidad microbiana, así como los métodos más importantes utilizados en la preservación de los alimentos y la calidad nutricional de la mayoría de los alimentos, se basan en la temperatura (alta o baja), la actividad del agua y en una aplicación de factores conservantes combinados (llamados obstáculos) y entre ellos están (a), acidez (pH), potencial redox (Eh), cuanto más obstáculos en un alimento, más difícil será el desarrollo de un microorganismo no deseado, resultando en mayor calidad y seguridad (Leistner y Gorris, 1995).

La tecnología de obstáculos es especialmente atractiva para el empleo de bacteriocinas, ya que algunos péptidos han demostrado efectos aditivos o sinérgicos cuando se usan en combinación con otros compuestos o tratamientos físicos, lo que

proporciona un enfoque útil para minimizar el desarrollo de resistencias (Gálvez *et al.*, 2008). Los ácidos orgánicos pueden actuar como potenciadores del efecto de las bacteriocinas, ya que el aumento de la carga neta de los péptidos a bajo pH facilita la translocación de las bacteriocinas a través de la pared celular, así como su solubilidad (Barboza de Martinez *et al.*, 2002). Aunque el uso de BAL como bioprotectoras en alimentos está bastante documentado, hay pocos trabajos que aborden su utilización como antifúngicos y no se ha estudiado con profundidad los posibles mecanismos de acción (Schnürer y Magnusson, 2005).

2. REFERENCIAS

- Aesan, 2012. Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) sobre medidas de prevención y recomendaciones aplicables para evitar posibles infecciones alimentarias por cepas de *Escherichia coli* verotoxigénicos/ productores de toxinas Shiga/ enterohemorrágicos (VTEC/ STEC/ EHEC). Revista del Comité Científico. 16, pp.71 - 100.
- Ahmad, V. et al., 2017. Antimicrobial potential of bacteriocins: in therapy, agriculture and food preservation. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 49(1), pp.1–11.
- Barboza de Martinez, Y., Ferrer, K. & Salas, E.M., 2002. Combined effects of lactic acid and nisin solution in reducing levels of microbiological contamination in red meat carcasses. *Journal of food protection*, 65(11), pp.1780–1783.
- Beloti, V. et al., 2015. Leite: Obtenção, Inspeção e Qualidade. 1st ed. Planta, ed., Londrina.
- Bullerman, L.B., 1981. Public Health Significance of Molds and Mycotoxins in Fermented Dairy Products. *Journal of Dairy Science*, 64(12), pp.2439–2452.
- Chambers, J. V., 2002. The microbiology of raw milk. In *Dairy Microbiology Handbook-The Microbiology of Milk Products*. New York, pp. 39–78.
- Claeys, W.L. et al., 2013. Raw or heated cow milk consumption: Review of risks and benefits. *Food Control*, 31(1), pp.251–262. Available at:
- Comisión Europea, 2006. Reglamento (CE) nº 1881/2006 de la Comisión, de 19 de diciembre de 2006, que establece niveles máximos para ciertos contaminantes en los productos alimenticios. *J. Union Eur.* 1L364, 49. Última modificación por el Reglamento (UE) 2018/290 de 26 de febrero de 2018.
- Comisión Europea, 2008. Reglamento (CE) nº 1333/2008 Del Parlamento Europeo y Del Consejo de 16 de diciembre de 2008 sobre aditivos alimentarios. *DO L* 354 de 31.12.2008, pp. 16.
- Cotter, P.D., Ross, R.P. & Hill, C., 2012. Bacteriocins — a viable alternative to antibiotics. *Nature Reviews Microbiology*, 11, pp.95.
- Djuretic, T., Wall, P.G. & Nichols Communicable Disease Surveillance Centre, 61 Colindale Avenue, London NW9 5EQ (United Kingdom), G. (Gastrointestinal D.S., 1997. General outbreaks of infectious intestinal disease associated with milk and dairy products in England and Wales: 1992 to 1996. *CDR Review (United Kingdom)*, v. 7.
- Dorner, J.W., 1983. Production of cyclopiazonic acid by *Aspergillus tamarii* Kita. *Applied and Environmental Microbiology*, 46(6), pp.1435–1437.
- Fernandes, R., 2010. *Microbiology Handbook*. Royal Society of Chemistry, Londres.
- Ferrús Pérez, M.A. et al., 2015. Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición (AECOSAN) sobre los riesgos

- microbiológicos asociados al consumo de leche cruda y productos lácteos elaborados a base de leche cruda. *Revista del Comité Científico*, 21, pp.45–78.
- Fox, P.F. et al., 2017. *Fundamentals of Cheese Science*, Boston, MA: Springer US.
- Frisvad, J.C. & Samson, R.A., 2004. Polyphasic taxonomy of *Penicillium* subgenus *Penicillium*: A guide to identification of food and air-borne terverticillate *Penicillia* and their mycotoxins. *Studies in Mycology*, 2004(49), pp.1–173.
- Frisvad, J.C., Thrane, U. & Samson, R.A., 2007. Micotoxin producers. In *Food mycology - a multifaceted approach to fungi and food*. Lyngby, Denmark, pp. 135–159.
- Gálvez, A. et al., 2008. Application of Bacteriocins in the Control of Foodborne Pathogenic and Spoilage Bacteria. *Critical Reviews in Biotechnology*, 28(2), pp.125–152.
- Gourama, H. & Bullerman, L.B., 1995. Antimycotic and Antiaflatoxigenic Effect of Lactic Acid Bacteria: A Review. *Journal of Food Protection*, 57(11), pp.1275–1280.
- Hairston, H. et al., 2016. Aflatoxin Residues in Milk of Dairy Cows after Ingestion of Naturally Contaminated Grain. *Journal of Food Protection*, 49(10), pp.781–785.
- Holzappel, C.W., 1968. The isolation and structure of cyclopiazonic acid, a toxic metabolite of *penicillium cyclopium* westling. *Tetrahedron*, 24(5), pp.2101–2119.
- Houbraken, J. et al., 2016. New sections in *Penicillium* containing novel species producing patulin, pyripyropens or other bioactive compounds. *Persoonia - Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 36(1), pp.299–314.
- Jand, S.K., Kaur, P. & Sharma, N.S., 2005. Mycoses and mycotoxicosis in poultry: A review. *Indian Journal of Animal Sciences*, 75, pp.465–476.
- Jandal, J.M., 1996. Comparative aspects of goat and sheep milk. *Small Ruminant Research*, 22(2), pp.177–185.
- Jordan, K. et al., 2014. Microbes versus microbes: Control of pathogens in the food chain. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(15), pp.3079–3089.
- Ledenbach, L.H. & Marshall, R.T., 2009. *Compendium of the Microbiological Spoilage of Foods and Beverages*, Springer-Verlag, New York. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/978-1-4419-0826-1>.
- Leistner, L. & Gorris, L.G.M., 1995. Food preservation by hurdle technology. *Trends in Food Science and Technology*, 6(2), pp.41–46.
- Line, J.E. et al., 2008. Isolation and purification of enterocin E-760 with broad antimicrobial activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52(3), pp.1094–1100.
- Lund, F., Filtenborg, O. & Frisvad, J.C., 1995. Associated mycoflora of cheese. *Food Microbiology*, 12, pp.173–180.

- IARC-International Agency for Research on Cancer. Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemical to humans, v.40, pp.83-98, 1986.
- MAPAMA, 2018. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Available at: <https://www.mapa.gob.es/es/> [Accessed April 3, 2019].
- Perrone, G. & Susca, A., 2017. *Penicillium* Species and Their Associated Mycotoxins. In H. Press, ed. *Toxigenic Fungi. Methods in Molecular Biology*, Vol 1542. New York, pp. 107–119.
- Pitt, J.I., 1979. *The Genus Penicillium and its Teleomorphic States Eupenicillium and Talaromyces*. Academic Press, London.
- Pitt, J.I., Cruickshank, R.H. & Leistner, L., 1986. *Penicillium commune*, *P. camembertii*, the origin of white cheese moulds, and the production of cyclopiazonic acid. *Food Microbiology*, 3(4), pp.363–371.
- Pitt, J.I. & Hocking, A.D., 2009. *Fungi and Food Spoilage*, New York: Springer US. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/978-0-387-92207-2>.
- Polonelli, L. et al., 1987. Antigenic characterization of *Penicillium camemberti* and related common cheese contaminants. *Applied and Environmental Microbiology*, 53(4), pp. 872-878.
- Posati, L.P. & Orr, M.L., 1976. *Composition of foods--dairy and egg products: raw, processed, prepared*. Agriculture Handbook-U.S. Dept. of Agriculture (USA), nº8-1.
- Prudêncio, C.V., dos Santos, M.T. & Vanetti, M.C.D., 2015. Strategies for the use of bacteriocins in Gram-negative bacteria: relevance in food microbiology. *Journal of Food Science and Technology*, 52(9), pp.5408–5417.
- Real Decreto 1113/2006, de 6 de octubre de 2006, por el que se aprueban las normas de calidad para quesos y quesos fundidos. *Boletín Oficial del Estado*. núm. 239, pp.34717-34720.
- Reddy, L. & Bhoola, K., 2010. Ochratoxins-food contaminants: Impact on human health. *Toxins*, 2(4), pp.771–779.
- Robison, R.K., 2002. *Dairy Microbiology Handbook- The microbiology of milk and milk products*. Microbiology of starter cultures, pp.1–11.
- Rowe, M. & Donaghy, J., 2011. *Microbiological Aspects of Dairy Ingredients*. In *Dairy Ingredients for Food Processing*. Oxford, UK: Wiley-Blackwell, pp. 59–101.
- Schnürer, J. & Magnusson, J., 2005. Antifungal lactic acid bacteria as biopreservatives. *Trends in Food Science and Technology*, 16(1-3), pp. 70-78.
- Stark, J., 2007. Cheese and fermented sausages. In C. Press, ed. *Food Microbiology: A Multifaceted Approach to Fungi and Food*. Boca Raton, FL.
- Visagie, C.M. et al., 2014. Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. *Studies in Mycology*, 78, pp.343–371.

Welke, J.E. et al., 2009. Ocorrência, aspectos toxicológicos, métodos analíticos e controle da patulina em alimentos. *Ciência rural*. Santa Maria, 39 (1) pp. 300-308.

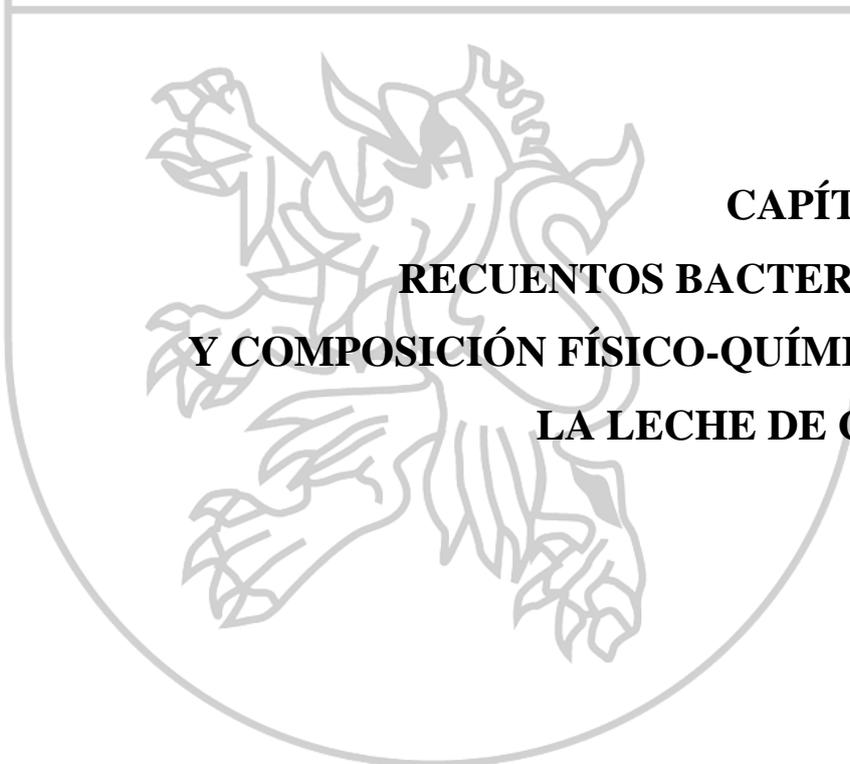
Yang, S.C. et al., 2014. Antibacterial activities of bacteriocins: Application in foods and pharmaceuticals. *Frontiers in Microbiology*, 5, pp.1–10.

3. OBJETIVOS DE LA TESIS DOCTORAL

El objetivo general de esta tesis doctoral fue aportar conocimiento sobre la calidad de la leche de cabra producida en el noroeste de España, estudiar la microbiota del queso Castellano y explorar la utilización de un cultivo iniciador compuesto de BAL con capacidad antifúngica para la elaboración de queso madurado de pasta prensada (tipo Castellano).

El objetivo general se desarrolló a partir de la consecución de los siguientes objetivos concretos:

1. Analizar los recuentos de la microbiota mesófila y de diferentes grupos de BAL, así como determinar la composición físico-química de la leche de cabra producida en explotaciones del noroeste de España en diferentes estaciones.
2. Identificar hongos aislados de quesos madurados (tanto alterados como no alterados) tipo Castellano para conocer la diversidad fúngica de este tipo de productos y poder seleccionar cepas para los ensayos posteriores de actividad antifúngica.
3. Aislar directamente de muestras de leche de vaca, cabra y oveja bacterias ácido-lácticas con actividad antifúngica frente a dos cepas de *Penicillium* (*P. nordicum*-M32 y *P. commune*-M35) alterantes y toxigénicas aisladas de queso madurado tipo Castellano.
4. Identificar las cepas de BAL con capacidad antagonista detectadas en el objetivo 3.
5. Evaluar la capacidad antifúngica de las cepas de BAL con mayor capacidad antagonista frente a diversas cepas de *Penicillium* alterantes y toxigénicas.
6. Analizar la capacidad antagonista de cepas de *Lactobacillus* que muestran actividad antifúngica, frente a cepas seleccionadas de bacterias pertenecientes a especies patógenas que se pueden transmitir por la leche y los productos lácteos e identificar la naturaleza de la actividad antagonista.
7. Evaluar la actividad inhibidora de crecimiento y la identificación de los posibles compuestos responsables de la actividad antifúngica de las cepas de *Lactobacillus*.
8. Comprobar la utilidad de una cepa de BAL seleccionada para el desarrollo de un cultivo protector antifúngico útil para la industria quesera.



**CAPÍTULO I.
RECUENTOS BACTERIANOS
Y COMPOSICIÓN FÍSICO-QUÍMICA DE
LA LECHE DE CABRA**

1. INTRODUCCIÓN

España es uno de los líderes mundiales en la producción de leche de cabra y el segundo país en producción de queso de cabra de toda la Unión Europea, responsable de 25% de la producción (Faostat 2019; Eurostat 2017), observándose una tendencia al alza en la población caprina en los últimos 5 años. Castilla y León se encuentra en el sexto puesto nacional en el censo caprino, con más de 153.000 cabezas (MAPAMA, 2018).

A nivel mundial, la leche de cabra es consumida como un producto fluido sin una transformación de la misma en otros derivados lácteos, principalmente porque su composición y características químicas son muy apreciadas e importantes desde el punto de vista nutricional y también por el menor potencial alergénico que presenta respecto a leches de otras especies (Haenlein, 2004). Asimismo, se ha observado el uso cada vez más frecuente para la elaboración de quesos a base de leche de cabra (Quigley *et al.*, 2013).

La leche de cabra tiene color blanco, y un sabor y olor característicos, diferenciándose de la leche de vaca en la mayor digestibilidad de la proteína y la grasa, su capacidad amortiguadora y otros aspectos importantes en nutrición humana (como el bajo potencial alergénico) (Haenlein, 2004; Park, 2010). El contenido medio en proteína (3,5%) y minerales (0,8%) es mayor que el de la leche humana, aunque presenta un menor contenido en lactosa (4,1%) y un porcentaje similar de grasa (3,8%) (Park, 2010). Se trata por tanto de una alternativa interesante para sustituir a la leche de vaca, ya que puede ser consumida por niños y ancianos, por su alta digestibilidad, y por las personas alérgicas a la leche de vaca (Park *et al.*, 2007). Su composición, como ocurre con la leche de otras especies, está influenciada por factores como la raza, edad, estado de lactación, estado general de salud, cantidad de leche producida, fisiología, factores genéticos, alimentación o localización geográfica (Goetsch *et al.*, 2011).

Con respecto a las razas productoras, la alpina y la murciano-granadina (esta última autóctona) están ampliamente distribuidas en España; concretamente la raza alpina supone el 73% del censo en Castilla y León (MAPAMA, 2018). La producción de leche por ambas razas es similar (600-700 l/lactación) con un contenido en grasa que oscila desde 3,7% en la raza alpina hasta 5,6% en la murciano-granadina, de acuerdo con los datos del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPAMA, 2018).

Los estudios sobre la microbiología de la leche de cabra en España no son muy abundantes (Mor-Mur *et al.*, 1994; Zárate *et al.*, 1997; Mas *et al.*, 2002; Álvarez-Suárez

et al., 2015), aunque hay algunos trabajos detallados sobre el comportamiento de diferentes grupos microbianos durante la maduración de queso (Tornadijo *et al.*, 1995; Alonso-Calleja *et al.*, 2002). La leche de cabra es un medio de cultivo ideal para el crecimiento de numerosos microorganismos, entre los que las bacterias ácido-lácticas (BAL). Las BAL constituyen una parte significativa de la microbiota de la leche, a la que acceden a partir de diversos orígenes (Quigley *et al.*, 2013), y son las principales responsables de la transformación de la leche en queso y otros productos lácteos y también de la inhibición/inactivación de otros microorganismos, incluyendo microorganismos patógenos.

2. OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo fue analizar los recuentos de la microbiota mesófila y de diferentes grupos de BAL, así como determinar la composición físico-química de la leche de cabra producida en explotaciones del noroeste de España en diferentes estaciones. Este estudio se realizó paralelamente al muestreo llevado a cabo para el aislamiento de BAL con actividad antifúngica

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. RECOGIDA DE MUESTRAS

Entre los meses de febrero a octubre de 2015, se tomaron 27 muestras de tanque de leche cruda de cabra de las razas alpina y murciano-granadina, en 4 granjas en la provincia de León (A-D) (Tabla 1). Las granjas A y B tenían ejemplares de murciano-granadina, mientras que C y D eran explotaciones de alpina. Tres de las granjas (A, B y D) tenían más de 500 cabezas. En todas ellas la producción era intensiva, con una alimentación mixta con forraje y pienso granulado (en la granja D también se utilizaba ensilado) y ordeño mecánico. Todas las granjas estaban incluidas en los planes de control sanitario de las explotaciones y no presentaban casos recientes de mamitis clínica/subclínica.

Las muestras de leche se tomaron de forma aséptica en recipientes estériles y se llevaron al laboratorio a temperatura de refrigeración, manteniéndose a esta temperatura hasta su análisis.

Tabla 1. Recogida de muestras de leche cruda de cabra.

Granja	Nº muestras (27)	Estación	Raza
A	6	Invierno (2), primavera (2), verano (2)	Murciano-granadina
B	6	Invierno (2), primavera (2), verano (2)	Murciano-granadina
C	4	Invierno (2), primavera (2)*	Alpina
D	11	Invierno (3), primavera (3), verano (5)	Alpina

*No se pudo tomar muestras de leche de cabra en la granja C en verano por cese de producción.

3.2. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO

Se realizaron recuentos de los siguientes grupos microbiológicos:

- a) Aerobios mesófilos: Agar para Recuento en Placa (Plate Count Agar, PCA, OXOID), incubado a 30 °C/72 horas (ISO 4833-2, 2013).
- b) *Lactobacillus*: Agar MRS (De Man Rogosa and Sharpe Agar, OXOID), pH 5,2, anaerobiosis (con jarra y sobres de anaerobiosis OXOID) 37 °C/72 horas (Carr *et al.*, 2002; Randazzo *et al.*, 2009).
- c) *Leuconostoc*: Agar MSE (Mayeux, Sandine y Elliker Agar, OXOID), siembra en superficie, 30 °C/ 4 días (Guiraud y Galzy, 1980).
- d) *Lactococcus*: Agar M17 (CONDA), siembra en superficie, 30 °C/24 horas (Terzaghi y Sandine, 1975).

3.3. ANÁLISIS FÍSICO-QUÍMICOS

Los análisis de grasa, proteína, lactosa y extracto seco, así como el recuento de células somáticas (SCC), fueron realizados en el Laboratorio Regional de Sanidad Animal, Junta de Castilla y León (León-Villaquilambre), utilizando el aparato MilkoScan™ FT 6000. La medición del pH fue hecha en el laboratorio donde fueron realizados los análisis microbiológicos utilizando el pHmetro Testo 205 (Instrumentos Testo, Lenzkirch, Alemania).

3.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los análisis estadísticos fueron realizados utilizando el programa SPSS “Statistical Package for the Social Sciences” (IBM). Se utilizó para análisis de normalidad y homogeneidad de varianza de los datos el test ANOVA de un factor para comparar los recuentos entre las diferentes estaciones del año entre las razas y, cuando las diferencias fueron significativas, se compararon las medias individuales con el test de Tukey. La diferencia significativa se estableció en el nivel $p < 0,05$. Los recuentos en los diferentes medios fueron presentados en log ufc/mL.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados de los diferentes recuentos se muestran en la Tabla 2 y en la Figura 1. En la Tabla 3 se muestran los resultados obtenidos en otros trabajos de investigación, pudiéndose apreciar diferencias importantes entre los diversos estudios.

El recuento medio de bacterias mesófilas detectado en este estudio (5.66 ± 1.43 log ufc/mL) se encuentra por debajo de los límites establecidos en la legislación europea para leche cruda de especies distintas de la vaca 6.17 log ufc/mL para leche destinada a tratamiento térmico y 5.69 log ufc/mL para la leche destinada a la fabricación de productos elaborados con leche cruda) (Parlamento Europeo y Consejo, 2004). En cuanto a los resultados en las diferentes estaciones, la media de los datos obtenidos en invierno es el único valor que está por encima de los límites mencionados (6.43 ± 1.55 log ufc/mL en invierno, 5.69 ± 1.30 log ufc/mL en primavera y 4.85 ± 0.54 log ufc/mL en verano; Figura 1), aunque no se detectan diferencias significativas en los recuentos obtenidos en las diferentes estaciones, resultado similar al encontrado en un estudio llevado a cabo en Francia (Delavenne *et al.*, 2012).

Tabla 2. Recuentos microbiológicos (media±desviación estándar, log ufc/mL) y de células somáticas (SCC x 10³ células/mL) obtenidos en las cuatro granjas muestreadas.

Granja	Raza	PCA	MRS	MSE	M17	SCC x10 ³
A (n = 6)	MG	4.48±0.44	3.79±0.49	3.80±0.58	5.41±1.93	1487.50±226.73
B (n = 6)	MG	4.73±0.84	3.51±0.29	3.31±0.13	4.22±0.38	1568.17±201.38
C (n = 4)	ALP	5.79±0.67	4.09±0.28	3.89±0.07	4.50±1.59	2476.25±120.43
D (n= 11)	ALP	6.75±1.40	5.27±0.48	5.91±1.23	6.77±1.49	1676.82±199.75
Media (n = 27)		5.66±1.43	4.38±0.87	4.56±1.41	5.57±1.82	1730.61±369.35

MG, murciano-granadina; ALP, alpina; PCA, microorganismos mesófilos; MRS, presuntos *Lactobacillus* spp.; MSE, presuntos *Leuconostoc* spp.; M17, presuntos *Lactococcus* spp.; SCC, recuento de células somáticas.

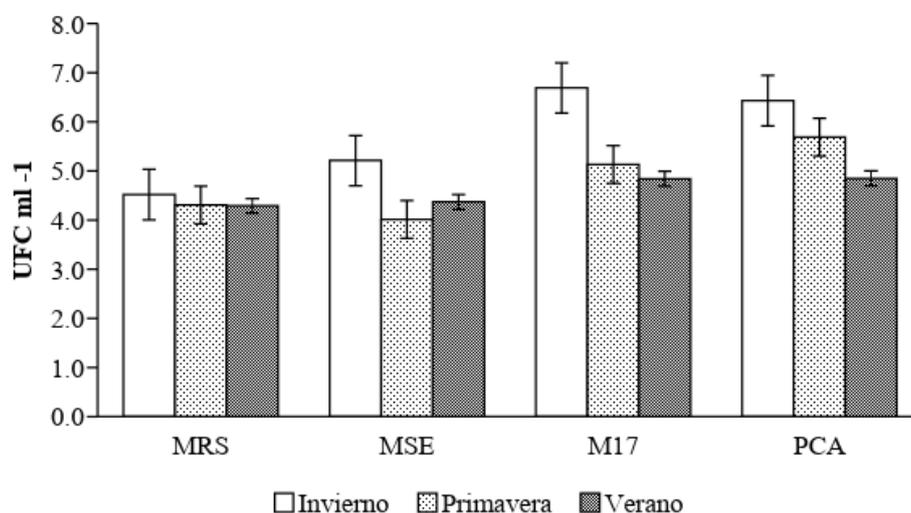


Figura 1. Recuentos microbiológicos en diferentes medios (media ± desviación estándar, log ufc/ mL/1) de 27 muestras de leche de cabra en tres estaciones del año (9 muestras/estación).

Tabla 3. Medias de los recuentos microbiológicos (log ufc/mL) encontrados en leche de cabra en este estudio y en otros estudios similares.

País	PCA	MRS	MSE	M17	Referencia
España	5.66	4.38	4.56	5.57	Este estudio
España	6.72	4.84	5.37	6.72	(Tornadijo <i>et al.</i> , 1995)
España	5.54	3.59	5.10	5.39	(Zárate <i>et al.</i> , 1997)
España	7.66	6.13	6.91	7.57	(Alonso-Calleja <i>et al.</i> , 2002)
España	-----	4.11	3.78	5.39	(Mas <i>et al.</i> , 2002)
España	4.8	-----	-----	-----	(Álvarez-Suárez <i>et al.</i> , 2015)
España	4.75	2.72	-----	-----	(Medina <i>et al.</i> , 1992)
Italia	4.70	3.48	-----	3.53	(Foschino <i>et al.</i> , 2002)
Francia	5.5	4.5	4.7	5.4	(Delavenne <i>et al.</i> , 2012)

PCA, microorganismos mesófilos; MRS, presuntos *Lactobacillus* spp.; MSE, presuntos *Leuconostoc* spp.; M17, presuntos *Lactococcus* spp.

Si analizamos los resultados por explotación, las granjas A y B estarían por debajo de los límites marcados en la UE, mientras que en las granjas C y D se obtiene un valor superior al establecido para la leche destinada a la fabricación de productos elaborados con leche cruda (<5.69 log ufc/mL). En estas mismas dos granjas también se obtuvieron los recuentos más elevados en MSE y MRS (Tabla 2). Hay que tener presente que en todas las granjas las condiciones eran similares: producción intensiva, ordeño mecánico (aunque la limpieza y desinfección de las ubres no se realizaba de forma rutinaria y se hacía según el criterio del granjero, excepto en la explotación D) y tanques de refrigeración, además la leche se mantuvo a baja temperatura hasta el análisis en todos los casos.

Aunque los valores de los recuentos en PCA encontrados en este estudio están en consonancia con los observados en otros trabajos de investigación (Tabla 3), es importante tener en cuenta que algunos de estos otros trabajos tienen más de 15 años de

antigüedad. Las condiciones de manejo e higiene en las explotaciones españolas han mejorado desde entonces. No obstante, teniendo en cuenta los resultados hallados en otros países europeos parece recomendable mejorar las condiciones higiénicas de las granjas investigadas.

El recuento medio de células somáticas (SCC, $1730.61 \pm 369.35 \times 10^3$ células/mL; Tabla 2) no supera los límites considerados normales en la leche de cabra (en ausencia de mamitis) (entre 270×10^3 and $2,000 \times 10^3$ células/mL; Paape *et al.* 2001). No se observan diferencias significativas entre los recuentos medios obtenidos en las diferentes estaciones, detectando los valores más elevados en invierno (1792×10^3 células/mL). Tampoco se encontró correlación entre los recuentos de bacterias mesófilas en PCA y los recuentos de células somáticas (Tabla 2), lo que indica una condición sanitaria correcta de los rebaños y son resultados que están en consonancia con la situación general en Castilla y León (la mayoría de las muestras presentan SCC superiores a 1100×10^3 células/mL; Jiménez-Granado *et al.* 2014). En la granja C la media SCC fue cerca de 2500×10^3 células/mL.

En cuanto a las BAL, el grupo dominante son los presuntos *Lactococcus* (recuento en agar M17) ($5.57 \log$ ufc/mL; Tabla 2), también similares o ligeramente superiores a los datos obtenidos en otros estudios en España (Tabla 3). En un estudio realizado en Francia, también se encontró dominancia de este grupo, con unos valores similares a los encontrados en nuestro trabajo, mientras que en Italia los valores detectados fueron menores (Tabla 3; Delavenne *et al.* 2012; Foschino *et al.* 2002). Los microorganismos del género *Lactococcus* son, por tanto, una parte importante de la microbiota mesófila natural de la leche de cabra y además desempeñan un papel importante en la producción de quesos artesanales elaborados con leche cruda (Franciosi *et al.*, 2009).

Los recuentos de presuntos *Leuconostoc* en agar MSE muestran un valor medio de $4.56 \pm 1.41 \log$ ufc/mL, siendo el segundo grupo de BAL en importancia. Este resultado es relativamente frecuente en leche de cabra, como se ve reflejado en otros estudios realizados (Tabla 3) y parece estar relacionado con el patrón de alimentación (Badis *et al.*, 2004).

Por último, el recuento en agar MRS de presuntos *Lactobacillus* ($4.38 \pm 0.87 \log$ ufc /mL) fue inferior al de otros grupos de BAL y similar al detectado en otros trabajos en España (Tabla 3).

En ninguno de los grupos microbianos estudiados se encuentran diferencias significativas entre las muestras tomadas en diferentes estaciones, aunque de forma general los recuentos son siempre más elevados en invierno que en primavera y verano (Figura 1).

Las BAL en su conjunto constituyen una parte esencial de la microbiota natural de la leche de cabra, teniendo en cuenta de que la relación entre BAL y recuento de bacterias mesófilas es prácticamente de 1. También es prácticamente seguro que existe un solapamiento entre los recuentos de los diferentes grupos de BAL, ya que los medios de cultivo no presentan una selectividad alta (Ordóñez, 1979; Reuter, 1985; López-Díaz *et al.*, 2000).

La composición química de las muestras analizadas en este estudio se muestra en la Tabla 4 y en la Figura 2, mientras que una comparación de los resultados obtenidos por diferentes autores se presenta en la Tabla 5.

Tabla 4. Composición química (g/100 mL; media±desviación estándar) y valores de pH de las muestras de leche analizadas en este estudio.

Granja	Raza	Grasa	Proteína	Lactosa	Extracto seco	pH
A (n=6)	MG	5.98±0.47	4.01±0.45	4.66±0.05	15.41±1.01	6.76±0.09
B (n=6)	MG	5.35±0.45	3.65±0.15	4.72±0.04	14.39±0.67	6.89±0.10
C (n=4)	ALP	*	3.74±0.42	4.50±0.02	*	6.79±0.04
D (n=11)	ALP	5.25±0.26	3.66±0.09	4.72±0.04	14.32±0.33	6.61±0.15
Media (n=27)		5.52±0.54	3.78±0.36	4.67±0.09	14.71±0.91	6.73±0.16

MG, murciano-granadina; ALP, alpina.*Los datos de grasa y extracto seco de la granja C se han retirado de los análisis de los resultados por presentar valores anormales.

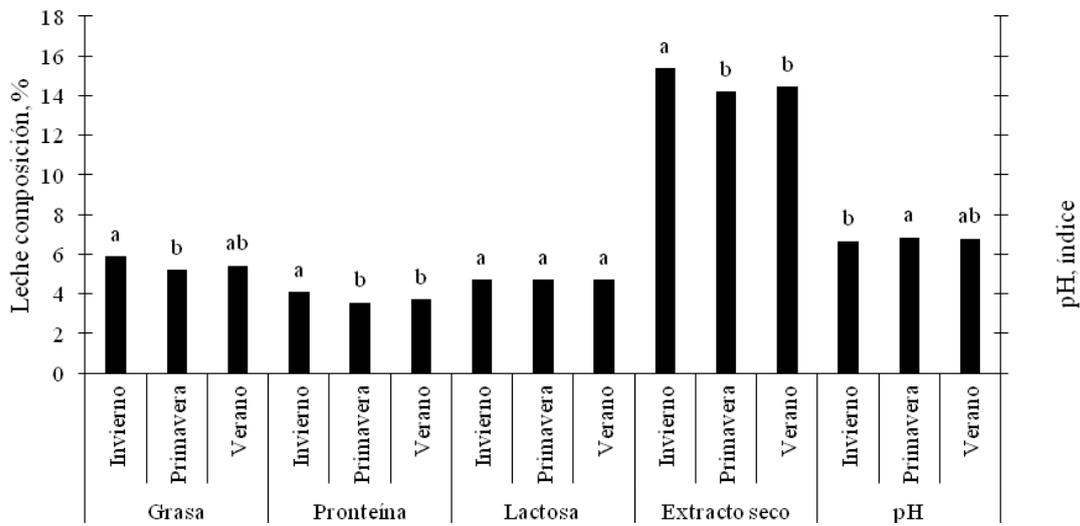


Figura 2. Composición química (g / 100 mL) y pH (media ± desviación estándar) de 27 muestras de leche de cabra en tres estaciones del año (9 muestras / estación). Los valores en la misma columna con letras diferentes son significativamente diferentes ($P < 0.05$).

En cuanto a los resultados obtenidos por estaciones, se observaron diferencias significativas en todos los parámetros de composición, con la excepción de la lactosa, que se mantuvo en valores estables entre las diferentes estaciones (Figura 2). Los valores medios de grasa, proteína y extracto seco fueron más elevados en invierno. Estas variaciones estacionales se atribuyen a la fase de lactación, ya que al final de la misma el contenido de sólidos totales, grasa, proteína y minerales se incrementa (Haenlein, 2004).

Tabla 5. Comparación de los resultados de composición físico-química obtenidos en este estudio con los datos disponibles en la bibliografía.

País	Grasa (g/100 mL)	Proteína (g/100 mL)	Lactosa (g/100 mL)	Extracto seco (g/100 mL)	pH	Referencia
España	5.47	3.75	4.67	14.64	6.73	Este estudio
España	3.79	3.83	-----	13.21	6.72	(Fontecha <i>et al.</i> , 1990)
Grecia	-----	-----	-----	-----	6.72	(Medina <i>et al.</i> , 1992)
España	5.26	-----	-----	14.08	6.63	(Mas <i>et al.</i> , 2002)
Portugal	4.27	3.49	4.21	12.8	6.59	(Morgan <i>et al.</i> , 2003)
Francia	3.44	3.44	4.56	11.8	6.51	(Morgan <i>et al.</i> , 2003)
Grecia	4.8	5.41	3.92	14.4	6.63	(Morgan <i>et al.</i> , 2003)
Grecia	4.12	3.44	4.26	12.57	6.65	(Kondyli <i>et al.</i> , 2012)

El valor medio obtenido para la grasa ($5.52 \pm 0.54\%$; Tabla 4) fue mucho más elevado que la concentración media descrita para esta especie (3.80%) (Park, 2010) y que el encontrado en otros trabajos desarrollados en España, Francia, Grecia y Portugal (Tabla 5). El contenido en grasa fue similar en las dos razas estudiadas, aunque de acuerdo con los datos del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPAMA, 2018) la raza alpina produce leche con menor porcentaje de materia grasa (3,7%); el menor valor encontrado en nuestro estudio para esta raza fue del 5%, lo que sugiere que puede ser necesaria una revisión de los datos disponibles en el MAPAMA.

El porcentaje de proteína fue ligeramente superior en invierno ($4,05 \pm 0.36$ g/100 mL; Figura 2), a diferencia de los observado por otros autores (Haenlein y Caccese, 1984), que no detectan diferencias entre las distintas estaciones. Sin embargo, el valor

medio obtenido en nuestro estudio ($3,78 \pm 0.36$ g/100 mL) es similar al encontrado en otros estudios en España y superior al reportado en estudios en Francia y Portugal (Tabla 5) (Peris *et al.*, 1997; Morgan *et al.*, 2003).

La lactosa presentaba valores normales para la leche de cabra ($4,67 \pm 0.09\%$), superiores al contenido mínimo deseable ($4,10\%$) (Park, 2010) y a los valores encontrados en otros países europeos (Tabla 5). Además, mostraba poca variación entre las estaciones (Figura 2). Este parámetro es uno de los más estables dentro de la composición química de la leche y está directamente relacionado con la regulación de la presión osmótica. En general, una mayor producción de lactosa determina más producción de leche.

El contenido en extracto seco ($14,71 \pm 0.91\%$; Tabla 4) fue mayor que el reportado en otros trabajos (Tabla 5) y también que el valor mínimo sugerido para la elaboración de queso ($12,97$ g/100 mL). Finalmente, el valor medio de pH encontrado ($6,73 \pm 0.16$) está dentro de los valores normales de la leche de cabra ($6,50-6,80$), aunque se detectaron diferencias significativas entre las estaciones, con un valor más bajo en invierno ($6,63 \pm 0.17$; Figura 2); esta observación puede estar relacionada con los elevados recuentos de presuntos *Lactococcus* (recuento en agar M17; Figura 1), ya que es un grupo microbiano con capacidad acidificante, y el resto de los factores (estado sanitario del rebaño, tiempo transcurrido entre el ordeño y el muestreo y entre el muestreo y el análisis) no variaron entre las muestras tomadas en las diferentes estaciones.

5. CONCLUSIONES

La calidad microbiológica de las muestras de leche de cabra tomadas en las explotaciones muestreadas es parcialmente satisfactoria, tomando como referencia los límites establecidos en la Unión Europea, así como los resultados hallados en otros países europeos. Por ello, parece recomendable mejorar las condiciones higiénicas de algunas de las granjas investigadas.

Además, las muestras examinadas presentan unas características físico-químicas deseables en este tipo de alimento, tanto para su consumo en forma de leche líquida como para la transformación en queso u otros productos lácteos con elevado extracto seco y contenido en grasa, lo que resulta de interés para la industria láctea.

6. REFERENCIAS

- Alonso-Calleja, C. *et al.*, 2002. Changes in the microflora of Valdeteja raw goat's milk cheese throughout manufacturing and ripening. *LWT - Food Science and Technology*, 35(3), pp.222–232.
- Álvarez- Suárez, M.-E. *et al.*, 2015. Microbiological Examination of Bulk Tank Goat's Milk in the Castilla y León Region in Northern Spain. *Journal of Food Protection*, 78(12), pp.2227–2232.
- Badis, A. *et al.*, 2004. Identification of cultivable lactic acid bacteria isolated from Algerian raw goat's milk and evaluation of their technological properties. *Food Microbiology*, 21(3), pp.343–349.
- Carr, F.J. *et al.*, 2002. Critical Reviews in Microbiology The Lactic Acid Bacteria : A Literature Survey. *Critical Reviews in Microbiology*, 28, pp.281–370.
- Delavenne, E. *et al.*, 2012. Biodiversity of antifungal lactic acid bacteria isolated from raw milk samples from cow, ewe and goat over one-year period. *International Journal of Food Microbiology*, 155(3), pp.185–190.
- Eurostat, 2017. Eurostat. Available at: <https://ec.europa.eu/eurostat> [Accessed April 1, 2019].
- FAOSTAT, 2019. FAOSTAT. Available at: <http://www.fao.org/faostat/en/#home> [Accessed April 1, 2019].
- Fontecha, J. *et al.*, 1990. Biochemical and Microbiological Characteristics of Artisanal Hard Goat's Cheese. *Journal Dairy Science*, 73, pp.1152-1157.
- Foschino, R. *et al.*, 2002. Microbial composition, including the incidence of pathogens, of goat milk from the Bergamo region of Italy during a lactation year. *Journal of Dairy Research*, 69(2), pp.213–225.
- Franciosi, E. *et al.*, 2009. Biodiversity and technological potential of wild lactic acid bacteria from raw cows' milk. *International Dairy Journal*, 19(1), pp.3–11.
- Goetsch, A.L., Zeng, S.S. & Gipson, T.A., 2011. Factors affecting goat milk production and quality. *Small Ruminant Research*, 101(1–3), pp.55–63.
- Guiraud, J. & Galzy, P., 1980. L'analyse microbiologique dans les industries alimentaires. L'Usine Nouvelle, Paris.
- Haenlein, G.F.W., 2004. Goat milk in human nutrition. *Small Ruminant Research*, 51(2), pp.155–163.
- Haenlein, G.F.W. & Caccese, R., 1984. Goat milk versus cow milk. In D. L. Ace, ed. *Goat Extension Handbook*. USDA, Washington.
- ISO 4833-2, 2013, 2013. Microbiology of the food chain - Horizontal method for the enumeration of microorganisms,
- Jimenez-Granado, R. *et al.*, 2014. Factors affecting somatic cell count in dairy goats: A review. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 12(1), pp.133–150.

- Kondyli, E. *et al.*, 2012. Chemical composition and microbiological quality of ewe and goat milk of native Greek breeds. *Small Ruminant Research*, 103(2–3), pp.194–199.
- López-Díaz, T. *et al.*, 2000. Lactic acid bacteria isolated from a hand-made blue cheese. *Food Microbiology*, 17(1), pp.23–32.
- MAPAMA, 2018. Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente. Razas de Cabras. Available at: <http://www.mapama.gob.es/es/ganaderia/temas/zootecnia/razas-ganaderas/razas/catalogo/autoctona-fomento/caprino/murciano-granadina/default.aspx> [Accessed May 4, 2018].
- Mas, M. *et al.*, 2002. Ibores goat's milk cheese: microbiological and physicochemical changes throughout ripening. *Lait*, 82(4), pp.579–587.
- Medina, M., Gaya, P. & Núñez, M., 1992. Gredos goat's milk cheese: microbiological and chemical changes throughout ripening. *Journal of Dairy Research*, 59, pp.563–566.
- Mor-Mur, M. *et al.*, 1994. Microbiological changes during ripening of Cendrat del Montsec, a goat's milk cheese. *Food Microbiology*, 11, pp.177–185.
- Morgan, F. *et al.*, 2003. Characteristics of goat milk collected from small and medium enterprises in Greece, Portugal and France. *Small Ruminant Research*, 47(1), pp.39–49.
- Ordoñez, J.A., 1979. Random Number Sampling Method for Estimation of Lactic Acid Bacteria. *Journal of Applied Bacteriology*, 46(2), pp.351–353.
- Paape, M.J. *et al.*, 2001. Milk Somatic Cells and Lactation in Small Ruminants. *Journal of Dairy Science*, 84, pp.E237–E244.
- Park, Y., 2010. Goat Milk Products: Quality, Composition, Processing, and Marketing. In N. B. W.G. Pond, ed. *Encyclopedia of Animal Science*. Boca Raton, Florida.
- Park, Y.W. *et al.*, 2007. Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk. *Small Ruminant Research*, 68, pp.88–113.
- Peris, S. *et al.*, 1997. Influence of Kid Rearing Systems on Milk Composition and Yield of Murciano-Granadina Dairy Goats. *Journal of Dairy Science*, 80(12), pp.3249–3255.
- Quigley, L. *et al.*, 2013. The complex microbiota of raw milk. *FEMS Microbiology Reviews*, 37, pp. 664–698.
- Randazzo, C.L., Caggia, C. & Neviani, E., 2009. Application of molecular approaches to study lactic acid bacteria in artisanal cheeses. *Journal of Microbiological Methods*, 78(1), pp.1–9.
- Reglamento (CE) 853/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 29 de abril de 2004, relativo a la higiene de los productos alimenticios. *Diario Oficial de la Unión Europea* L139 de 30.4.2004, pp. 1–151.

- Reuter, G., 1985. Elective and selective media for lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 2(1-2), pp.55-68.
- Terzaghi, B.E. & Sandine, W.E., 1975. Improved medium for lactic streptococci and their bacteriophages. *Applied microbiology*, 29(6), pp.807-13.
- Tornadijo, M.E. *et al.*, 1995. Microbiological changes throughout the manufacturing and ripening of a Spanish goat's raw milk cheese (Armada variety). *Lait*, 75, pp. 551-570.
- Zárate, V. *et al.*, 1997. Changes in the microbial flora of Tenerife goats' milk cheese during ripening. *International Dairy Journal*, 7(10), pp.635-641.



VNIVERSITAS
LEGIONENSIS



CAPÍTULO II.
IDENTIFICACIÓN POLIFÁSICA DE *PENICILLIUM*
SPP. AISLADOS DE QUESO MADURADO Y
CUANTIFICACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ÁCIDO
CICLOPIAZÓNICO POR *P. COMMUNE*

1. INTRODUCCIÓN

Penicillium es el género de hongos contaminantes más importante encontrado en los quesos madurados (Bullerman, 1981; Lund *et al.*, 1995; Frisvad y Samson, 2004; Frisvad *et al.*, 2007; Pitt y Hocking, 2009). La identificación de este género a nivel de especie es una tarea muy compleja, ya que la mayoría de las especies tienen propiedades muy similares. La identificación convencional se basa en estudios morfológicos (macroscópicos y microscópicos) y en la caracterización fenotípica (crecimiento a diferentes temperaturas, presencia de pigmento y exudado o métodos de cultivo) (Pitt, 1979). Últimamente, ha surgido la identificación molecular para ayudar en la identificación, ofreciendo la ventaja de medir características genotípicas estables y ser independiente de las condiciones de cultivo y la interpretación del operador (Perrone y Susca, 2017). La identificación molecular se basa en el análisis de las secuencias de genes conservados, siendo el marcador principal las secuencias intergénicas ribosómicas (ITS), aunque estas secuencias son muy similares entre algunas especies del género *Penicillium*, por lo que es recomendable utilizar algún marcador alternativo, recomendándose la secuenciación del gen *BenA*, que codifica para la β -tubulina, o el *CaM*, que codifica la calmodulina, entre otros. Además, debido a la gran cantidad de secuencias depositadas en GenBank, es conveniente utilizar bases de datos verificadas o construir árboles filogenéticos utilizando secuencias de referencia (Visagie *et al.*, 2014). Así, Frisvad y Samson (2004) propusieron un enfoque polifásico para identificar *Penicillium* subgénero *Penicillium* basado en análisis morfológico, químico y molecular.

El subgénero *Penicillium* es el más numeroso en alimentos (tan solo algunos pocos representantes de otros subgéneros está asociados a estos substratos). Los miembros de este subgénero poseen colonias entre verde y azul cuando crecen en agar de extracto de malta (MEA), conidióforos ramificados (*ter-* a *quater-verticillata*) y fiálides en forma de botella. *P. glabrum* sería la única especie perteneciente a otro subgénero (*Aspergilloides*, debido al conidióforo *monoverticillata*) asociada al deterioro del queso, aunque no micotoxigénica (Pitt y Hocking, 2009). Al menos cinco especies (*P. expansum*, *P. nordicum*, *P. verrucosum*, *P. commune* y *P. palitans*) son micotoxigénicas, siendo algunas micotoxinas producidas en queso (ocratoxina A (OTA), patulina (PAT) y ácido ciclopiazónico (CPA) (Weidenböner, 2008). De este subgénero, muy pocas especies están asociadas al queso (Tabla 1, INTRODUCCIÓN GENERAL Y OBJETIVOS) (un ejemplo es *P. glabrum*, subgénero *Aspergilloides*,

monoverticillata). Debido a la complejidad de la identificación señalada, en este trabajo se propone una clave simplificada de identificación de las principales especies de *Penicillium* asociadas a queso, construida a partir de las características fenotípicas y de producción de metabolitos reseñadas en la bibliografía (Tabla 1).

La especie de *Penicillium* que domina la alteración de los quesos madurados es *P. commune* (Frisvad y Samson, 2004; Pitt y Hocking, 2009) y es una especie micotoxigénica. La producción de CPA se considera un rasgo definido, aunque probablemente sea un riesgo pequeño para los consumidores (Pitt y Hocking, 2009). Lund *et al.* (2003) encontraron en un extenso estudio, que el 94% de las cepas de *P. commune* eran productores de CPA. CPA es una potente micotoxina que produce necrosis focal en la mayoría de los órganos internos de vertebrados en altas concentraciones (Perrone y Susca, 2017) y fue responsable de los efectos graves en el músculo y los huesos de los pavos afectados por la enfermedad X de los pavos en asociación con la contaminación por aflatoxina de cacahuets (Jand *et al.*, 2005). Riñones y tracto gastrointestinal son los órganos diana en mamíferos y, en el hombre, se supone que puede ser responsable de una micotoxicosis aguda (llamada “kodua”) que induce a problemas nerviosos (Hymery *et al.*, 2014).

Esta micotoxina se considera estable en el queso (Sengun *et al.*, 2008) y se ha encontrado en quesos de capa blanca superficial (tipo Camembert y Brie, Le Bars, 1979; Schoch *et al.*, 1993; Ansari y Häubl, 2016; Zambonin *et al.*, 2001) (no inesperado ya que *P. camemberti*, especie domesticada derivada de *P. commune*, es un productor; Pitt *et al.*, 1986) y en otras variedades como el queso Kasar (Aran y Eke, 1987) y el queso Taleggio (Finoli *et al.*, 1999). El CPA no está regulado en la Unión Europea (no aparece en el Reglamento de Contaminantes, 1881/2006; Comisión Europea, 2006).

Tabla 1. Clave dicotómica simple basada en algunas micotoxinas y características fenotípicas propuesta para la identificación de especies de *Penicillium* (subgénero *Penicillium*) asociadas al deterioro del queso (adaptada de Samson *et al.*, 2010) .

1a	CPA production	2
1b	No CPA production	3
2a	CYA conidia blue green to green, reverse cream to beige or cream yellow	<i>P. commune</i>
2b	CYA conidia dark green to green, reverse cream with brown center	<i>P. palitans</i>
3a	OTA production	4
3b	No OTA production	5
4a	Reverse on YES agar red brown/terracota	<i>P. verrucosum</i>
4b	Reverse on YES cream yellow	<i>P. nordicum</i>
5a	PAT production	<i>P. expansum</i>
5b	No PAT production	6
6a	Smooth-walled stipes	7
6b	Rough-walled stipes	9
7a	Conidiophores large (up to 500-2000 µm tall, stipes 4-5 µm wide), no or very weak growth on CYA/30 °C	<i>P. brevicompactum</i>
7b	Conidiophores smaller, colonies on CYA/30 °C often > 15 mm diameter	8
8a	No reaction on CREA, good growth on CYA/30 °C	<i>P. chrysogenum</i>
8b	Good acid reaction on CREA, no or weak growth on CYA/30 °C	<i>P. atramentosum</i>
9a	Rough-walled conidia	10
9b	Smooth-walled conidia	11
10a	Reverse on YES agar orange to red with time	<i>P. discolor</i>
10b	Reverse on YES agar yellow	<i>P. echinulatum</i>
11a	Colonies on MEA, CYA and YES > 40 mm diameter	<i>P. roqueforti</i>
11b	Colonies on MEA, CYA and YES < 40 mm diameter	12
12a	Reverse on YES yellow to orange, no growth on CYA/30 °C, colonies on CYA, YES, MEA < 25 mm diameter	<i>P. solitum</i>
12b	Moderate to good growth on CYA/30 °C	13
13a	Good growth on CREA, CYA/30 °C > 20-35 mm diameter, smooth conidia	<i>P. crustosum</i>
13b	Weak growth on CREA, CYA/30 °C < 20 mm diameter, finely rough conidia	<i>P. viridicatum</i>

Algunas variedades populares de quesos (quesos semiduros como el Castellano) elaborados con leche cruda de oveja en el noroeste de España tienen un periodo de maduración variable (generalmente varios meses) en condiciones ambientales que permiten el crecimiento de mohos en la superficie, creando una capa de micelio azul

grisáceo que se retira periódicamente con un pincel. En algunas variedades similares, el moho permanece en el producto final. No hay estudios previos sobre la identificación de la micobiota del queso tipo Castellano.

2. OBJETIVOS

El objetivo de este capítulo fue identificar hongos aislados de quesos madurados (tanto alterados como no alterados) para poder seleccionar después cepas para los ensayos posteriores de actividad antifúngica. La identificación se basó en la morfología, la identificación molecular y la producción de tres extrolitos (CPA, OTA y PAT) siguiendo un enfoque “polifásico” recomendado en los últimos años, contribuyendo así al conocimiento de estos contaminantes y la utilidad de las técnicas de identificación actuales. Además, se cuantificó la producción de CPA por parte de la especie mayoritaria (*P. commune*) para valorar el riesgo derivado de su crecimiento en la superficie del queso.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. AISLAMIENTO DE HONGOS

Se analizaron 8 muestras de queso (Q1-Q7 y Q15). Además, se incluyeron en el estudio cepas de *Penicillium* aisladas previamente (muestras Q8-Q14). En total, las cepas procedieron de 15 muestras de queso. De dichas muestras, 10 eran quesos de oveja (leche cruda) semiduros de pasta prensada tipo “castellano” con alteración fúngica (procedentes de diversas fábricas diferentes ubicadas en las provincias de León y Zamora) y 5 quesos con crecimiento de moho azul superficial natural no deteriorados (4 quesos de oveja de pasta prensada y formato rectangular tipo “pata de mulo” y 1 queso de cabra no prensado elaborado en los Picos de Europa) (Tabla 2).

El aislamiento de las cepas se llevó a cabo mediante diferentes técnicas:

- siembra directa (transfiriendo pequeñas partículas de queso a placas de agar),
- siembra por dilución (después de la homogeneización de 10 g de queso en 90 mL de peptona al 0,1% y una dilución adicional de 10 veces)
- técnica de aislamiento directo con cinta adhesiva (celo) para tomar una muestra de la superficie y ubicarla en placas de agar (Samson *et al.*, 2010).

Medios de cultivo: Agar Extracto de malta (MEA, Oxoid Thermo Fisher, Reino Unido) y Agar Cloranfenicol Glucosa (GCA, Scharlab, España).

Después de la incubación (25 °C/5-7 d), se seleccionaron 1-3 colonias con diferentes morfologías por muestra y se inocularon en placas de MEA hasta que se obtuvieron cultivos puros. Los aislamientos se mantuvieron a 4 °C en inclinaciones MEA hasta su identificación.

3.2. IDENTIFICACIÓN

La identificación a nivel de género de los aislados se realizó de acuerdo con Samson *et al.* (2010) según las características macro y microscópicas. La Tabla 1 es una clave simplificada para la identificación de estas especies, adaptada de Samson *et al.* (2010) diseñada por los autores. La identificación a nivel de especie se realizó mediante un enfoque polifásico (Frisvad y Samson 2004; Visagie *et al.* 2014) que consistió en una caracterización morfológica según las claves y descripciones de Frisvad y Samson (2004), Frisvad *et al.* (2007) y Pitt y Hocking (2009), análisis de extrolitos (CPA, OTA y PAT) y secuenciación de genes marcadores. En el estudio, se incluyó una cepa de colección (*P. verrucosum* CECT20766) para ayudar en la diferenciación de *P. nordicum*.

3.2.1. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA

Las cepas se inocularon en tres puntos equidistantes en placas de los siguientes medios según Frisvad y Samson (2004): agar Czapek Extracto de Levadura (CYA), agar extracto de levadura sacarosa (YES), agar extracto de malta (MEA) y agar creatina (CREA) (Anexo I). Las placas se incubaron durante 7 días a 25 °C y también a 30 °C (placas CYA).

Caracteres morfológicos:

- diámetro de la colonia,
- textura,
- color de los conidios,
- colores del anverso y reverso,
- existencia de pigmento soluble y exudado,
- grado de crecimiento y
- producción de ácido/base en CREA.

A partir de las placas de MEA se realizaron preparaciones al microscopio, utilizando ácido láctico (60%) como líquido de montaje, y se estudiaron los siguientes aspectos.

Caracteres microscópicos:

- grado de ramificación de los conidióforos,
- dimensión, forma y ornamentación de los estipes
- dimensión, forma y ornamentación de los conidios.

3.2.2. Análisis de extrolitos (OTA, CPA y PAT) por cromatografía en capa fina (TLC)

La detección de OTA, CPA y PAT se llevó a cabo por cromatografía en capa fina (TLC) a partir de cultivos en placas de YES (25 °C/7-14 días) utilizando la técnica de trozo de agar (“agar plug”) descrita por Samson *et al.* (2010). Las placas de aluminio (gel de sílice 60 F254, Merck, Alemania) se usaron directamente para el análisis OTA y PAT. Para la detección de CPA, las placas se sumergieron previamente en ácido oxálico al 10% en metanol durante 2 minutos y se calentaron en un horno a 110 °C/2-5 minutos (Gqaleni *et al.*, 1996). La inoculación de las placas se realizó con un aparato Camag Nanomat 4 (Camag, Suiza). Los patrones de CPA y PAT se obtuvieron de Sigma (Sigma-Aldrich Merck, España) y de OTA de Cayman Chemical (Cayman Chemical Company, EE. UU.). En caso de resultado negativo, todo el contenido de una placa de agar se extrajo con 50 mL de diclorometano/metanol (80/20, v/v), se homogeneizó, se filtró y el disolvente se evaporó al vacío hasta sequedad (Gqaleni *et al.* 1996). El extracto se disolvió en 1 mL de metanol y se depositaron 10 µL del mismo en las placas de TLC. Fase móvil: TEF (tolueno/acetato de etilo/ácido fórmico 90%, 5/4/1, v/v/v) (la atmósfera del tanque se saturó echando la mezcla al menos 20 minutos antes) (Samson *et al.* 2010). Después del secado, las placas se trataron de la siguiente manera: OTA (vapores de NH₃ durante 2 minutos; se visualizaron manchas de azul turquesa fluorescentes bajo una lámpara UV a 365 nm) (Frisvad *et al.*, 1989); CPA (pulverización con reactivo de Ehrlich; se observó una mancha azul violeta después de unos minutos (Gqaleni *et al.*, 1996); PAT (pulverización con MBTH al 0,5% y calentamiento en un horno a 105 °C/10 min; una mancha amarilla aparece a la luz visible (Frisvad *et al.*, 1989). En todo momento, se trabajó en campana de flujo laminar.

3.2.3. Test de Ehrlich

La prueba de Ehrlich se realizó en todas las cepas mediante el método de papel de filtro descrito por Lund (1995) consistente en depositar un trozo de agar de unos 4 mm (cultivo en CYA (25 °C/7 d) en un trozo de papel de filtro empapado con el reactivo. Antes de 10 minutos, en caso de un resultado positivo (por producción de CPA y ciertos alcaloides relacionados) debe aparecer un anillo violeta. Si el anillo aparece después de 7-10 minutos la reacción se considera débil. Algunas cepas producen anillo de rosa a rojo o amarillo (Frisvad y Samson, 2004).

Reactivo Ehrlich: 4-dimetilaminobenzaldehído (Sigma-Aldrich Merck, España) disuelto en etanol al 96% y ácido clorhídrico al 37% (ambos de Panreac Química, España).

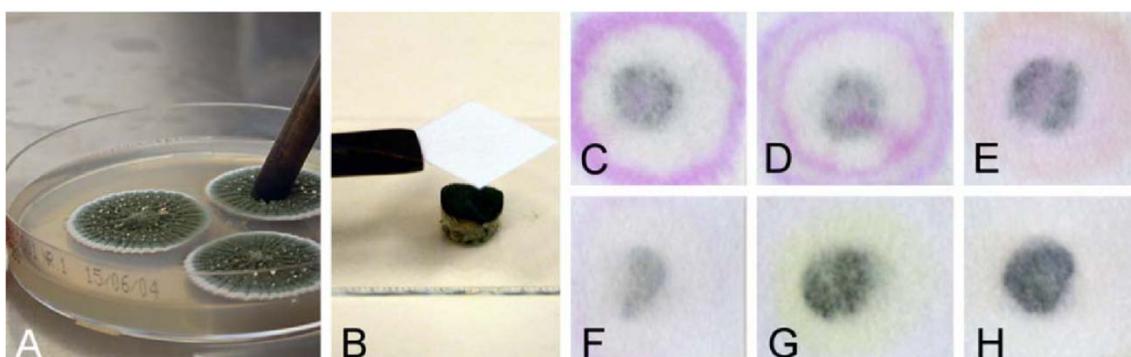


Foto 1. Test de Ehrlich (Frisvad y Samson 2004).

3.2.4. Identificación molecular

Las cepas de *Penicillium* se cultivaron en frascos de agar inclinado de MEA a 25 °C durante 7 días. El micelio se recogió con 5 mL de Tween 80 estéril (0,05%), frotando con ayuda de un asa de platino estéril. A continuación, se transfirieron 2 mL de la suspensión a un vial Eppendorf y se centrifugaron a 16000 g/3 min. El sedimento se lavó dos veces con 1 mL de agua bidestilada, se suspendió en 250 µL de matriz de Instagene (Bio-Rad, EE. UU.) y el ADN se extrajo calentando durante 3 horas a 56 °C y 10 minutos a 95 °C. Después de mezclar en vórtice y centrifugar a 12000 g/3 min, el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo y se utilizaron 5 µL para la amplificación por PCR (Ciardo *et al.*, 2007). La PCR se realizó en reacciones de 25 µL en un

Mastercycler Personal (Eppendorf Ibérica, España). La amplificación de la región ITS, el gen *BenA* de β -tubulina y el gen *CaM* de la calmodulina se realizó utilizando los cebadores y las condiciones descritas por Visagie *et al.* (2014). Los productos de PCR se purificaron con el kit NucleoSpin Gel y PCR Clean-up (Macherey-Nagel, Alemania). Ambas cadenas se secuenciaron en un secuenciador MegaBACE 500 (GE Healthcare Life Sciences, Reino Unido). La identificación de la cepa se realizó mediante la comparación BLAST en la base de datos RefSeq para las secuencias ITS y en una base de datos verificada para las secuencias de β -tubulina y calmodulina (Visagie *et al.*, 2014). Los árboles filogenéticos se construyeron utilizando el método UPGMA, con las distancias estimadas por el modelo Kimura de 2 parámetros y un análisis “bootstrap” de 1000 repeticiones utilizando el software MEGA7 (Kumar *et al.*, 2016).

3.3. CUANTIFICACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE CPA EN PLACA POR *P. COMMUNE* POR HPLC

3.3.1. Siembra y extracciones

Para cuantificar las micotoxinas, se inocularon 15 cepas de *P. commune* identificadas en este estudio y la cepa de referencia (MP82= *P. commune*, CBS 468.84) en placas de Petri (siembra en tres puntos) con 20 mL de YES. Después de la incubación (7d/25°C), el porcentaje de micelio seco se determinó en una de las colonias según Taniwaki *et al.* (2006) y este valor se aplicó a las otras dos colonias. Estas dos colonias se analizaron de acuerdo con Gqaleni *et al.* (1996), utilizando 50 mL del disolvente (diclorometano: metanol, 80:20 v: v). Los extractos finales se resuspendieron en 1 mL de metanol y se analizaron por HPLC (Fig. 1). Todas las muestras fueron realizadas por duplicado.

3.3.2. Análisis por HPLC

Los extractos se analizaron mediante HPLC en el Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos (ICTAL) de la U. de León.

Equipo: Waters 2690 (detector de absorbancia doble Waters 2487, detector de fluorescencia de barrido Waters 474, Waters, Milford, EEUU).

Columna Supelco Ultrabase C18 con un tamaño de poro de 5 μ m (150 x 4,6 mm) (Sigma Merck). Se aplicó un gradiente lineal (Frisvad, 1987) : disolvente A (agua), disolvente B (ácido trifluoroacético al 0,05% en acetonitrilo).

Condiciones HPLC: el porcentaje inicial de B fue del 10%, que se elevó al 50% en 3 min, luego al 90% en 10 min, se mantuvo en 90% durante 3 min, se redujo

nuevamente al 10% en 6 min y se mantuvo en 10% en 1 min a un caudal de 2,0 mL / min. La detección de CPA se realizó a 254 nm (los tiempos de retención fueron 32.6 min, respectivamente). El límite de detección fue 0.83 µg / mL, repetibilidad, 90.41; linealidad (R2), 0.9995.

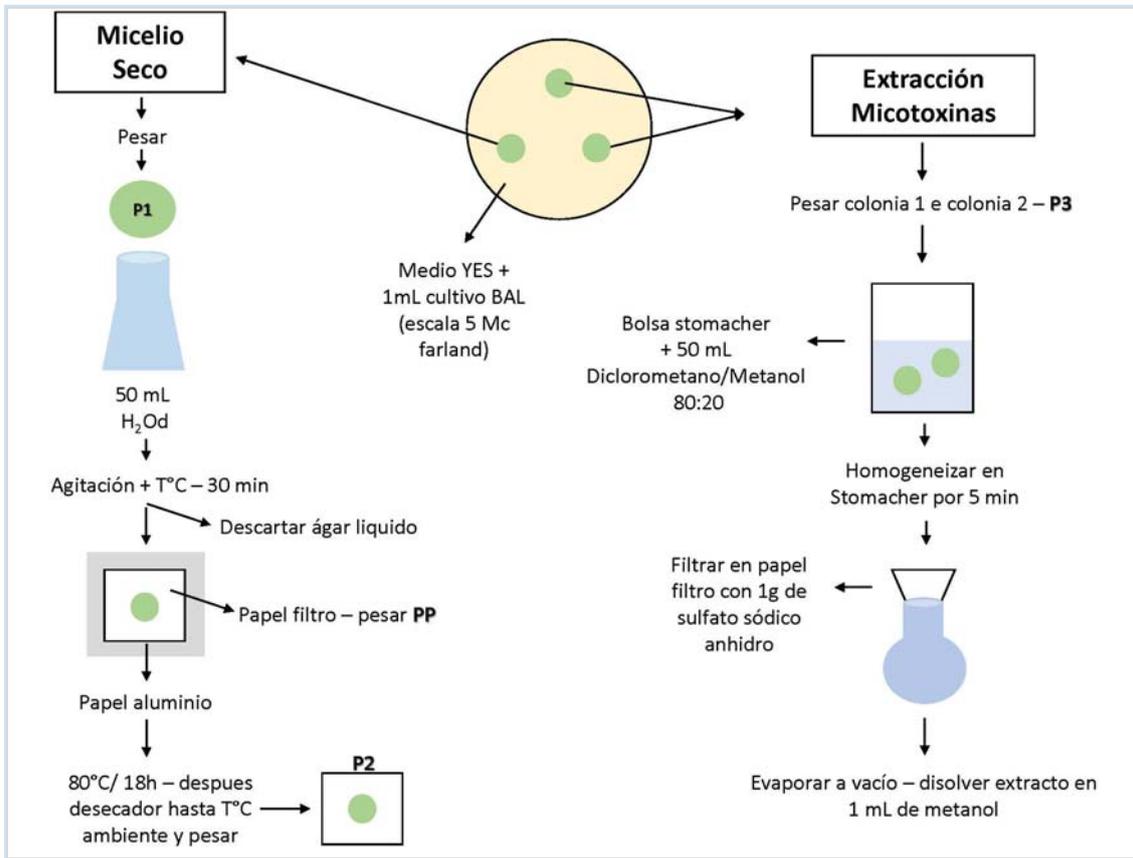


Figura 2. Esquema de la técnica de cuantificación de CPA en agar YES.

3.4. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA Y LIPOLÍTICA DE UNA SELECCIÓN DE CEPAS DE *PENICILLIUM*

Una selección de cepas de *Penicillium* fue evaluada frente a su actividad proteolítica y lipolítica. La actividad proteolítica fue evaluada en agar leche 10% (Harrigan y McCance, 1979), la lipolítica en agar Tween 80 (Harrigan y McCance, 1979) y también en agar tributirina (OXOID). Se inoculó en 3 puntos equidistantes el la cepa de *Penicillium*, midiendo, después de la incubación (25 °C / 5 días) los halos formados alrededor de las colonias. Los ensayos se realizaron en duplicado.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se identificaron un total de 32 aislados de hongos que se identificaron como pertenecientes al género *Penicillium* subgénero *Penicillium* (16 de ellos se aislaron de quesos con deterioro y 16 de quesos no deteriorados) (Tabla 2).

La identificación a nivel de especie se logró mediante caracterización morfológica, análisis de extrolitos y secuenciación del ADN. La Tabla 3 muestra los resultados del análisis fenotípico y de extrolitos de nuestros aislamientos en comparación con una referencia (Frisvad y Samson, 2004). La Tabla 4 muestra los resultados de la identificación polifásica y las Figs. 2 y 3 muestran los resultados del análisis filogenético basado en las secuencias del gen ITS y *BenA*, respectivamente. Finalmente, el Anexo II muestra fotografías de los análisis y resultados realizados.

Tabla 2. Origen de los aislados de *Penicillium* identificados.

Muestra de queso n=15	Tipo	S/NS	Cepas n=32	Identificación n=32
Q1, Q4, Q8, Q9, Q10, Q11, Q12, Q13, Q14, Q15	Oveja, pasta prensada, madurado o semimadurado (formato cilíndrico, tipo “castellano”).	S	P1, P2, P3, QLM1, QLM2, M35, M170, M30, M34, M32, M76, M123, M124, M57, M145, Q3M1 n=16	<i>P. commune</i> (9) <i>P. solitum</i> (3) <i>P. chrysogenum</i> (2) <i>P. nordicum</i> (1) <i>P. cvjetkovicii</i> (1)
Q3, Q5, Q6, Q7	Oveja, madurado o semimadurado, con capa azul superficial de origen natural (rectangular, tipo “pata de mulo”).	NS	Q2M1, Q2M2, Q2M3, Q2M4, Q2M5, Q2M11, Q2M7 QP1, QP2, QP3, QPA3, QPA4, QZ1, n=13	<i>P. commune</i> (9) <i>P. solitum</i> (3) <i>P. expansum</i> (1)
Q2	Cabra, no prensado, con capa azul superficial de origen natural	NS	P4, P5, P6 n=3	<i>P. commune</i> (3)

S, alterado; NS, no alterado.

Las especies halladas fueron: *P. commune* (21; 65,6%), *P. solitum* (6; 18,8%), *P. chrysogenum* (2; 6,3%), *P. nordicum* (1; 3,1%), *P. expansum* (1; 3,1%), and *P. cvjetkovicii* (1; 3,1%).

Después de la identificación polifásica, 21 aislados se identificaron como *P. commune*, 9 se obtuvieron de quesos en mal estado y 12 de quesos no deteriorados (Tabla 2). Todos ellos eran productores de CPA, lo que concuerda con la descripción de la especie (Tabla 3; Foto 11 Anexo II), siendo esta una de las principales características diagnósticas para la diferenciación de especies de *Penicillium* con potencial de deterioro en los quesos. Cinco especies de *Penicillium* son productoras de CPA, pero solo *P. commune* y *P. palitans* son importantes como contaminantes del queso. *P. camemberti* también produce CPA, pero no se considera un contaminante (Frisvad y Samson, 2004). Es una especie que raramente se halla en lugares lejanos a fábricas de queso que lo utilicen como cultivo de superficie (Pitt y Hocking, 2009).

La morfología macroscópica aparece detallada en la Tabla 3 (ver también, fotos 1, 2 y 22 del Anexo II). Microscópicamente mostraron estipes de pared rugosa y conidios globulares a subglobosos (Tabla 3). Todas las cepas de *P. commune* tuvieron una reacción violeta en la prueba de Ehrlich (Foto 10 Anexo II) y una producción de ácido de moderada a buena en creatina (una mostró la reacción solo en la colonia, una excepción aceptada por Frisvad y Samson, 2004). Todo esto cumple con las características de dos especies (*P. commune* y *P. palitans*). *P. palitans* podría diferenciarse por el centro marrón en el reverso de las placas CYA, característica que no se encontró en nuestros aislamientos (sin embargo, esta característica no parece ser muy consistente).

Con respecto a la identificación mediante secuenciación del ADN, la secuenciación de ITS fue de uso limitado, ya que no pudo diferenciar *P. commune* de otras especies de *Penicillium* (Fig. 2); sin embargo, el análisis filogenético de *BenA* permitió la identificación de todos los aislamientos, con una concordancia total con el enfoque fenotípico (Tabla 4 y Fig. 3). La diferenciación entre *P. commune* y *P. camemberti* no fue posible con el análisis molecular, incluso empleando un tercer marcador (*CaM*; Tabla 4), siendo necesaria la caracterización fenotípica. La cepa *P. commune* M35 se ha depositado en la Colección Española de Cultivos Tipo como CECT20940.

El hábitat principal de *P. commune* en los alimentos es el queso, en el cual es la causa principal del deterioro (Filtenborg *et al.*, 1996; Frisvad y Samson, 2004; Pitt y Hocking, 2009). Lund *et al.* (1995) lo encontraron dominante en un extenso estudio sobre diferentes quesos europeos (42% de 371 aislamientos), siendo considerado un hongo alterante. Otros autores también hallaron *P. commune* como el alterante

predominante. Es el caso de Tzanetakis *et al.* (1987) en un queso tradicional griego; Kure (2001) y Kure *et al.* (2004) en queso semiduro; Hayaloglu y Kirbag (2007) en queso turco Kuflu; y Panelli *et al.* (2012) en el queso Taleggio. En contraste, Decontardi *et al.* (2018) encontraron *P. commune* solo en el 7% de las muestras de cortezas de queso grana italiano analizadas, siendo predominante *P. solitum* (55%). La identificación en ese caso se basó en el gen *CaM* (de la calmodulina), que puede ser útil para la identificación de aislados de *P. viridicatum*, pero no puede diferenciar los de la sección *Viridicata* como *P. solitum* o *P. commune*, como concluyeron Prencipe *et al.* (2018). Además, no se había realizado ningún análisis de extrolitos que pudiera haber sido útil en la identificación. Kure *et al.* (2002) aislaron *P. commune* de diferentes hábitats dentro de la industria quesera (equipos, film plásticos pero, fundamentalmente, aire).

Por otro lado, algunos de los autores consideran esta especie (*P. commune*) como parte de la microbiota esencial del queso, contribuyendo, posiblemente, a los cambios de maduración y las características de sabor del producto final (es decir, queso Kopanisti y queso Taleggio) (Tzanetakis *et al.*, 1987; Panelli *et al.*, 2012; Hymery *et al.*, 2014). En el caso de las muestras de queso no deteriorado analizadas en nuestro estudio, presentaban una capa azul superficial debida, principalmente, a la presencia de *P. commune*. Estos quesos son igualmente apreciados por los consumidores por lo que este hongo aparentemente no influyó de manera negativa en las características organolépticas (sabor). Esas muestras no habían sido inoculadas con ningún cultivo de superficie. La prevalencia de este *Penicillium* en quesos se explica por la capacidad de crecer a bajas temperaturas, bajas concentraciones de oxígeno, actividad lipolítica y resistencia a la acción conservante (Pitt y Hocking, 2009).

Como se ha comentado en la introducción, la presencia de CPA en quesos ha sido demostrada por varios autores. Los resultados de los experimentos realizados para cuantificar la producción de CPA en agar YES de 16 cepas de *P. commune* identificadas en nuestro estudio y de una cepa patrón (MP82) se muestran en la Tabla 5. La producción máxima se encontró en los aislados P5 y P1 (procedentes de quesos en mal estado), con un máximo de 7476,94 $\mu\text{g/g}$ de micelio seco por parte de la cepa P5 (valores similares a los hallados en la cepa de referencia MP82; Tabla 5). El valor medio de CPA hallado fue 4126,17 $\mu\text{g/g}$ de micelio seco. Por otro lado, la cepa con la producción mínima fue M57 (procedente de una muestra de queso alterada; 1.4% de la producción máxima; 105,77 $\mu\text{g/g}$ de micelio seco). Este dato tiene interés de cara a

seleccionar una cepa para la producción de queso, además de actividad proteolítica y lipolítica presentada por esta cepa (M57) en la foto 16 y 17 del Anexo II. Hay muy pocas referencias sobre la producción de CPA, pero Le Bars (1979) halló una producción de 272 µg/g de micelio seco por *P. camemberti* en un medio similar al YES, lo cual es superior a la cepa M57.

En nuestro estudio, se identificaron 6 cepas como *P. solitum* (tanto de quesos en mal estado, 3 aislados, como en no deteriorados, 3 aislados; Tabla 3 y Tabla 4). La Tabla 3 detalla las características macroscópicas y microscópicas de nuestros aislados comparados con las referencias (ver también, Foto 23 del Anexo II). Varios autores han encontrado *P. solitum* en el queso (Lund *et al.*, 1995; Hocking y Faedo, 1992; Kure y Skaar, 2000; Kure *et al.*, 2004; Decontardi *et al.*, 2018). Nuestros aislamientos no fueron productores de ninguna de las tres micotoxinas evaluadas, lo cual está de acuerdo con la característica de la especie, sin producción de micotoxinas (Tabla 4; Frisvad y Samson, 2004). Además, la reacción de Ehrlich fue negativa y la reacción sobre la creatina fue ácida. El reverso en agar de YES fue amarillo-naranja. Microscópicamente, los aislamientos tenían estipes de pared rugosa y conidios globosos a subglobosos de pared lisa. No se observó crecimiento en CYA/30 °C (Tabla 3). Como ya se mencionó, la secuenciación de ITS no sirvió para diferenciar entre *P. solitum* y *P. commune*, pero la secuenciación del gen *BenA* confirmó claramente la identificación (Tabla 4 y Fig. 2).

Dos aislados fueron identificados como *P. chrysogenum*. Las principales características que nos llevaron a esta identificación fueron la ornamentación de los estipes (lisa; entre las especies asociadas a los alimentos, esta es la única con esta característica) y la capacidad de crecer bien en CYA a 30 °C (Tabla 3; Fotos 6, 7 y 24 del Anexo II). Además, esta especie no produce CPA, OTA y PAT (Tabla 3). La secuenciación de ITS identificó los aislamientos como *P. rubens* (Tabla 4) (ambas especies son sinónimos según Frisvad y Samson (2004)), y nuevamente el análisis de secuencia *BenA* los identificó correctamente como *P. chrysogenum*, aunque el uso de este marcador molecular con presuntos aislamientos de esta especie se debe hacer con cuidado (Visagie *et al.* 2014). *P. chrysogenum* es un alterante de queso (Aran y Eke, 1987; Lund *et al.*, 1995; López-Díaz *et al.*, 1995; Barrios *et al.*, 1998; Frisvad y Samson, 2004; Hayaloglu y Kirbag, 2007) y produce penicilina y varias micotoxinas, algunas de las cuales se han detectado en el queso, como la roquefortina (López-Díaz *et al.*, 1996; Finoli *et al.*, 2001; Kokkonen *et al.*, 2005).

En nuestro estudio, el aislado M32 fue el único productor de OTA e identificado como *P. nordicum*, por esta característica y por el reverso crema/amarillo en agar YES, que difiere del reverso de color marrón rojizo de *P. verrucosum* (Larsen *et al.*, 2001; Frisvad y Samson, 2004), también productor de OTA (Tabla 3). Pudimos ver esta diferencia entre la cepa M32 y la cepa de referencia de *P. verrucosum* CECT20766 (empleada en este estudio precisamente por la dificultad de diferenciar ambas especies; Foto 9 Anexo II). La Foto 25 (Anexo II) muestra las características morfológicas de la especie. *P. nordicum* generalmente se asocia con alimentos con alto contenido de proteínas, como el queso, mientras que *P. verrucosum* es más común en productos de cereales y otras fuentes de vegetales, aunque también se asocia con el queso (Hocking y Faedo, 1992; Larsen *et al.*, 2001). La identificación de M32 por la secuenciación ITS produjo un resultado incorrecto (Fig. 2), mientras que el análisis de *BenA* lo identificó correctamente como *P. nordicum* (Fig. 3), aunque está muy cerca de *P. verrucosum* (Fig. 2). La cepa *P. nordicum* M32 se ha depositado en la Colección Española de Cultivos Tipo como CECT20939.

La OTA es una nefrotoxina que afecta a todas las especies animales probadas, aunque los efectos en el hombre han sido difíciles de establecer de manera inequívoca (Perrone y Susca, 2017). Está considerado como una sustancia "posiblemente carcinógena para el hombre" (Clase 2B, IARC, 1993). Varios autores han encontrado OTA en el queso (Jarvis, 1993; Sinha y Ranjan, 1991; El-Sawi *et al.*, 1994; Engel, 2000; Dall'Asta *et al.*, 2008; Anelli *et al.*, 2019). Esta micotoxina es bastante estable en el queso, pero la normativa actual en la Unión Europea excluye el queso de los alimentos con niveles máximos de OTA (Bullerman, 1981; Comisión Europea, 2006).

Un aislado fue identificado como *P. expansum*. Morfológicamente, es una de las pocas especies del subgénero *Penicillium* aislada del queso con estipes lisos, siendo característica también una fuerte reacción violeta con el reactivo de Ehrlich y sus conidios elipsoidales (Tabla 3) (ver también fotos 3, 4, 5 y 26 del Anexo II). Nuestra cepa fue positiva para la producción de PAT, que también es típica de esta especie (Pitt y Hocking, 2009) (Tabla 3). La patulina ha sido asociada también al queso (Lafont *et al.* 1979), pero la normativa actual en la Unión Europea excluye el queso de los productos alimenticios con niveles máximos de PAT (Comisión Europea, 2006).

Finalmente, se identificó una cepa como *P. cvjetkovicii*. La identificación se realizó inicialmente mediante secuenciación de secuencias de ADN, ITS y *BenA*, lo que dio lugar a resultados no concluyentes, debido al bajo número de secuencias disponibles

en las bases de datos genéticas (Tabla 4). La identificación final se confirmó por las características morfológicas y el análisis del gen *CaM* (calmodulina). La especie, perteneciente a la sección *Cinnamopurpurea*, subgénero *Aspergilloides*, se ha descrito recientemente (Peterson *et al.*, 2015). Morfológicamente, este hongo se caracteriza por los *penicilios monoverticillata* y la producción de pigmentos solubles de vináceos a pardo rojizos. Un aislado de queso obtenido en España (Marín *et al.*, 2014) fue identificado por Peterson *et al.* (2015) como *P. cvjetkovicii*, aunque inicialmente había sido considerado como *P. chermesinum* (Peterson *et al.*, 2015). El aislado obtenido en nuestro trabajo sería el segundo hallazgo en el queso publicado hasta la fecha. En nuestro caso, el hongo produjo un deterioro en la superficie del queso (la muestra era de queso Castellano) caracterizado por pequeñas manchas oscuras en la superficie. El deterioro ocurrió en una sola fábrica y el origen probable, según algunos autores, sería el aire (Peterson *et al.*, 2015).

En base a la revisión bibliográfica y a raíz de nuestro estudio, consideramos que, entre los metabolitos secundarios producidos por cepas de *Penicillium* asociados al queso, el ácido ciclopiazónico ocupa un lugar relevante ya que permite identificar dos de las 15 especies de *Penicillium* asociadas al queso, siendo una de ellas, *P. commune* dominante en estos alimentos. De ahí la pertinencia de empezar la identificación con la detección de dicha micotoxina como sugerimos en la clave dicotómica propuesta.

Hay tres que destacan con fines de identificación (como característica diagnóstica) y desde el punto de vista de la salud pública: ácido ciclopiazónico, ocratoxina A y patulina. Por ello, consideramos de utilidad la clave dicotómica simplificada diseñada en este estudio basada en la producción de extrolitos y características fenotípicas que permite la identificación de las cepas aisladas en este estudio a excepción de *P. cvjetkovicii* (no considerada ahora como asociada al queso).

En cuanto al análisis molecular, las limitaciones de ITS como marcador de especies para la diferenciación de especies de *Penicillium* se demostraron claramente, ya que no se identificó ninguna cepa, excepto *P. expansum*, de manera inequívoca por este procedimiento. El uso del marcador secundario *BenA*, según lo propuesto por Visagie *et al.* (2014), fue útil para distinguir entre *P. commune* y *P. solitum*, que no fueron resueltos por ITS (aunque su diferenciación no es difícil de probar la producción de CPA), y entre algunas especies que son muy difíciles de identificar utilizando solo características fenotípicas (*P. commune* y *P. palitans/P. nordicum* y *P. verrucosum*) (Tabla 3 y Tabla 4). Un tercer marcador, el gen *CaM*, tuvo que ser usado en este trabajo

para asegurar la identificación del hallazgo inesperado de la especie recientemente descrita *P. cyjetkovicii*. Las secuencias de los tres genes de todas las cepas han sido depositadas en GenBank con los siguientes número de acceso: MK660326-MK660357 para las secuencias ITS, MK675757-MK615788 para las secuencias *BenA* y MK660604-MK660605 para las secuencias del gen *CaM* de las cepas Q2M7 y Q3M1, respectivamente.

5. CONCLUSIONES

Los resultados encontrados en este estudio indican la presencia de especies de deterioro y micotoxígenas dominadas por *P. commune* en la superficie de los quesos investigados. La presencia de mohos micotoxigénicos en la superficie del queso es preocupante, ya que varios autores han detectado CPA, OTA y PAT en el queso. Aunque no está claro si los niveles de las micotoxinas encontradas podrían ser perjudiciales para el consumidor, la práctica de permitir la presencia de una capa azul en la superficie de estos quesos durante la maduración parece no ser aconsejable de acuerdo con las buenas prácticas de fabricación. Sin embargo, el papel de *P. commune* en la maduración del queso aún está por determinarse, ya que algunos autores afirman que tiene una contribución positiva a las características sensoriales del queso y nosotros hemos comprobado la comercialización de quesos con esta especie en la superficie. En este sentido, la cepa M57 podría ser de interés en el diseño de un cultivo de superficie por su baja producción de CPA.

6. REFERENCIAS

- Anelli, P. *et al.*, 2019. Fungal mycobiota and mycotoxin risk for traditional artisan Italian cave cheese. *Food Microbiology*, 78, pp.62–72.
- Ansari, P. & Häubl, G., 2016. Determination of cyclopiazonic acid in white mould cheese by liquid chromatography–tandem mass spectrometry (HPLC–MS/MS) using a novel internal standard. *Food Chemistry*, 211, pp.978–982.
- Aran, N. & Eke, D., 1987. Mould mycoflora of Kaşar cheese at the stage of consumption. *Food Microbiology*, 4(2), pp.101–104.
- Barrios, M.J. *et al.*, 1998. Fungal biota isolated from spanish cheeses. *Journal of Food Safety*, 18(2), pp.151–157.
- Bullerman, L.B., 1981. Public Health Significance of Molds and Mycotoxins in Fermented Dairy Products. *Journal of Dairy Science*, 64(12), pp.2439–2452.
- Ciardo, D.E. *et al.*, 2007. Identification of moulds in the diagnostic laboratory-an algorithm implementing molecular and phenotypic methods. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 59(1), pp.49–60.
- Comisión Europea, 2006. Reglamento (CE) nº 1881/2006 de la Comisión, de 19 de diciembre de 2006 Establecimiento de niveles máximos para ciertos contaminantes en los productos alimenticios. 348 Apagado. J. Eur. Union 1L364, 49. Última modificación por el Reglamento (UE) 2018/290 de 349 26 de febrero de 2018.
- Dall’Asta, C. *et al.*, 2008. The occurrence of ochratoxin A in blue cheese. *Food Chemistry*, 106(2), pp.729–734.
- Decontardi, S. *et al.*, 2018. Polyphasic identification of *Penicillia* and *Aspergilli* isolated from Italian grana cheese. *Food Microbiology*, 73, pp.137–149.
- El-Sawi, N.M. *et al.*, 1994. Abnormal Contamination of Cottage Cheese in Egypt. *Journal of Applied Animal Research*, 6(1), pp.81–90.
- Engel, G., 2000. Ochratoxin A in sweets, oil seeds and dairy products, *Archiv für Lebensmittelhygiene*, 51, pp. 98-101
- Filtenborg, O., Frisvad, J.C. & Thrane, U., 1996. Moulds in food spoilage. *International Journal of Food Microbiology*, 33(1), pp.85–102.
- Finoli, C. *et al.*, 1999. Production of Cyclopiazonic Acid by Molds Isolated from Taleggio Cheese. *Journal of Food Protection*, 62(10), pp.1198–1202.
- Finoli, C. *et al.*, 2001. Roquefortine C Occurrence in Blue Cheese. *Journal of Food Protection*, 64(2), pp.246–251.
- Frisvad, J.C., 1987. High-performance liquid chromatographic determination of profiles of mycotoxines and other secondary metabolites. *Journal of Chromatography A*, 392, pp.333–347.

- Frisvad, J.C., Filtenborg, O. & Thrane, U., 1989. Analysis and screening for mycotoxins and other secondary metabolites in fungal cultures by thin-layer chromatography and high-performance liquid chromatography. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 18(3), pp.331–335.
- Frisvad, J.C. & Samson, R.A., 2004. Polyphasic taxonomy of *Penicillium* subgenus *Penicillium*: A guide to identification of food and air-borne terverticillate *Penicillia* and their mycotoxins. *Studies in Mycology*, 2004(49), pp.1–173.
- Frisvad, J.C., Thrane, U. & Samson, R.A., 2007. Micotoxin producers. In *Food mycology - a multifaceted approach to fungi and food*. Lyngby, Denmark, pp. 135–159.
- Gqaleni, N. *et al.*, 1996. The production of cyclopiazonic acid by *Penicillium commune* and cyclopiazonic acid and aflatoxins by *Aspergillus flavus* as affected by water activity and temperature on maize grains. *Mycopathologia*, 136(2), pp.103–108.
- Harrigan, W.F. & McCance, M.E., 1979. Métodos de laboratorio en microbiología de alimentos y productos lácteos. Editorial Acribia, Zaragoza.
- Hayaloglu, A.A. & Kirbag, S., 2007. Microbial quality and presence of moulds in Kuflu cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 115(3), pp.376–380.
- Hocking, A.D. & Faedo, M., 1992. Fungi causing thread mould spoilage of vacuum packaged Cheddar cheese during maturation. *International Journal of Food Microbiology*, 16(2), pp.123–130.
- Hymery, N. *et al.*, 2014. Filamentous Fungi and Mycotoxins in Cheese: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13(4), pp.437–456.
- Jand, S.K., Kaur, P. & Sharma, N.S., 2005. Mycoses and mycotoxicosis in poultry: A review. *Indian Journal of Animal Sciences*, 75, pp.465–476.
- Jarvis, B., 1993. Mould and mycotoxins in mouldy cheeses. *Microbiologie-Aliments-Nutrition*, 1, pp.187–191.
- Le Bars, J., 1979. Cyclopiazonic acid production by *Penicillium camemberti* Thom and natural occurrence of this in cheese. *Applied and environmental microbiology*, 38, pp.1052–1055.
- Kokkonen, M., Jestoi, M. & Rizzo, A., 2005. The effect of substrate on mycotoxin production of selected *Penicillium* strains. *International Journal of Food Microbiology*, 99(2), pp.207–214.
- Kumar, S., Stecher, G. & Tamura, K., 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33(7), pp.1870–1874.
- Kure, C., 2001. Mould contaminants on Jarlsberg and Norvegia cheese blocks from four factories. *International Journal of Food Microbiology*, 70(1–2), pp.21–27.
- Kure, C.F. *et al.*, 2002. Differentiation of *Penicillium commune* and *Penicillium palitans* isolates from cheese and indoor environments of cheese factories using M13 fingerprinting. *Food Microbiology*, 19(2–3), pp.151–157.

- Kure, C.F. & Skaar, I., 2000. Mould growth on the Norwegian semi-hard cheeses Norvegia and Jarlsberg. *International Journal of Food Microbiology*, 62(1–2), pp.133–137.
- Kure, C.F., Skaar, I. & Brendehaug, J., 2004. Mould contamination in production of semi-hard cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 93(1), pp.41–49.
- Lafont, P., Siriwardana, M.G. & Lafont, J., 1979. Contamination de fromages par des metabolites fongiques. *Médecine Nutrition*, 15, pp.257–262.
- Larsen, T.O., Svendsen, A. & Smedsgaard, J., 2001. Biochemical Characterization of Ochratoxin A-Producing Strains of the Genus *Penicillium*. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(8), pp.3630–3635.
- López-Díaz, T. *et al.*, 1995. Microbiological changes during manufacture and ripening of a naturally ripened blue cheese (Valdeón, Spain). *Milchwissenschaft*, 50(January), pp.381–384.
- López-Díaz, T.M. *et al.*, 1996. Mycotoxins in two Spanish cheese varieties. *International Journal of Food Microbiology*, 30(3), pp.391–395.
- Lund, F., Filtenborg, O. & Frisvad, J.C., 1995. Associated mycoflora of cheese. *Food Microbiology*, 12(C), pp.173–180.
- Lund, F., Nielsen, A.B. & Skouboe, P., 2003. Distribution of *Penicillium commune* isolates in cheese dairies mapped using secondary metabolite profiles, morphotypes, RAPD and AFLP fingerprinting. *Food Microbiology*, 20(6), pp.725–734.
- Marín, P., Palmero, D. & Jurado, M., 2014. Effect of solute and matric potential on growth rate of fungal species isolated from cheese. *International Dairy Journal*, 36(2), pp.89–94.
- Panelli, S. *et al.*, 2012. Identification of moulds from the Taleggio cheese environment by the use of DNA barcodes. *Food Control*, 28(2), pp.385–391.
- Perrone, G. & Susca, A., 2017. *Penicillium* Species and Their Associated Mycotoxins. In H. Press, ed. *Toxigenic Fungi. Methods in Molecular Biology*, Vol 1542. New York, pp. 107–119. Available at: http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-6707-0_5.
- Peterson, S.W., Jurjević, Ž. & Frisvad, J.C., 2015. Expanding the species and chemical diversity of *Penicillium* section *cinnamopurpurea*. *PLoS ONE.*, 10(4), e0121987.
- Pitt, J.I., 1979. *The Genus Penicillium and its Teleomorphic States Eupenicillium and Talaromyces*. Associated Press, London.
- Pitt, J.I., Cruickshank, R.H. & Leistner, L., 1986. *Penicillium commune*, *P. camembertii*, the origin of white cheese moulds, and the production of cyclopiazonic acid. *Food Microbiology*, 3(4), pp.363–371.
- Pitt, J.I. & Hocking, A.D., 2009. *Fungi and Food Spoilage*, New York: Springer US. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/978-0-387-92207-2>.

- Prencipe, S. *et al.*, 2018. Several species of *Penicillium* isolated from chestnut flour processing are pathogenic on fresh chestnuts and produce mycotoxins. *Food Microbiology*, 76, pp.396–404.
- Samson, R. *et al.*, 2010. *Food and Indoor Fungi*. CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, Utrecht.
- Schoch, U., Luethy, J. & Schlatter, C., 1993. Mycotoxins in mould-ripened cheese. *Mitteilungen aus dem Gebiete der Leb. und Hyg*, 74, pp.50–59.
- Sengun, I., Yaman, D. & Gonul, S., 2008. Mycotoxins and mould contamination in cheese: a review. *World Mycotoxin Journal*, 1(3), pp.291–298.
- Sinha, A.K. & Ranjan, K.S., 1991. A report of mycotoxin contamination in bhutanese cheese. *Journal Food Science Technol.*, 28, pp.398–399.
- Taniwaki, M. *et al.*, 2006. Comparison of hyphal length, ergosterol, mycelium dry weight, and colony diameter for quantifying growth of fungi from foods. *Advances in experimental medicine and biology*, 571, pp.49–67.
- Tzanetakis, N., Litopoulou-Tzanetaki, E. & Manolkidis, K., 1987. Microbiology of Kopanisti, a traditional Greek cheese. *Food Microbiology*, 4(3), pp.251–256.
- Vandamme, P., De Bruyne, K. & Pot, B., 2014. Phylogenetics and systematics. In *Lactic Acid Bacteria: Biodiversity and Taxonomy*. John Wiley and Sons, New York.
- Visagie, C.M. *et al.*, 2014. Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. *Studies in Mycology*, 78(1), pp.343–371.
- Weidenböerner, M., 2008. *Mycotoxins in Foodstuffs* Springer, ed., New York, NY. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/978-0-387-73689-1>.
- Zambonin, C.G., Monaci, L. & Aresta, A., 2001. Determination of cyclopiazonic acid in cheese samples using solid-phase microextraction and high performance liquid chromatography. *Food Chemistry*, 75, pp.249–254.

Tabla 3. Principales características fenotípicas y de producción de micotoxinas de cepas de *Penicillium* aisladas de queso en comparación con la descripción de la especie según Frisvad y Samson (2004).

Especie	Origen ^a	CYA (mm) ^b	CYA (mm) ^c	YES (mm) ^b	MEA (mm) ^b	CREA (mm) ^b Crecimiento/ Producción de ácido-base	CPA/ OTA/ PAT en YES ^b	Reacción EHRlich ^b	Color conidios CYA ^b	Color reverso CYA ^b	Color reverso YES ^b	Pared estipes	Conidios
<i>P. commune</i>	A n=21	9-39	0-5.5 (10)	25-40	15-26	9-12.7 Bueno/ ácido	CPA	Violeta, generalment e fuerte	Azul verdoso a verde	Crema a amarillo crema	Crema/amar illo/marrón claro ^d	Rugosa	Subglobosos, lisos
	B	(15-) 21-35	0-4	29-50	(16-) 20-37	14-28 Muy bueno/fuerte ácido	CPA	Fuerte violeta	Azul verdoso a verde	Crema a beige o crema- amarillo	Crema a amarillo	Rugosa	Subglobosoas a elipsoidales, lisos
<i>P. chrysogenum</i>	A n=2	37-40	25-27	40-50	30-35	10-27	-	Amarillo	Azul verdoso a verde	Amarillo pálido/ama rillo	Amarillo pálido	Lisa	Globosos a subglobosos, lisos
	B	23-46	14-27	40-64	19-52	16-26 Débil/no ácido o pobre/no base	-	Nada o amarillo	Azul verdoso a verde	Crema, amarillo, raramente marrón	Amarillo limón	Lisa	Globosos a subglobosos a elipsoidales, lisos

Especie	Origen ^a	CYA (mm) ^b	CYA (mm) ^c	YES (mm) ^b	MEA (mm) ^b	CREA (mm) ^b Crecimiento/ Producción de ácido-base	CPA/ OTA/ PAT en YES ^b	Reacción EHRlich ^b	Color conidios CYA ^b	Color reverso CYA ^b	Color reverso YES ^b	Pared estipes	Conidios
<i>P. expansum</i>	A n=1	40	0	50	40	24 Bueno/ ácido seguido de reacción base	PAT	Violeta	Azul verdoso a verde	Naranja marrón	Crema amarillo	Lisa	Elipsoidales, lisos
	B	26-50	0-3	38-65	16-34	23-28 Muy bueno/ácido seguido de base	PAT	Violeta fuerte	Azul verdoso a verde	Crema a Amarillo con centro marron, naranja marron o marron oscuro	Crema amarillo o naranja	Lisa (ocasiona lmente, rugosa)	Elipsoidales, lisos
<i>P. nordicum</i>	A n=1	11-13	0	15-20	12-13	12-13 No	OTA	Amarillo débil	Verde	Crema a marrón claro	Crema amarillo	Rugosa	Globosos a subglobosos, lisos
	B	8-21	0	14-36	6-16	6-12 Débil/ninguno	OTA	Amarillo verde	Verde	Crema a menudo con centro marrón	Crema amarillo	Rugosa	Globosos a subglobosos, lisos

Especie	Origen ^a	CYA (mm) ^b	CYA (mm) ^c	YES (mm) ^b	MEA (mm) ^b	CREA (mm) ^b Crecimiento/ Producción de ácido-base	CPA/ OTA/ PAT en YES ^b	Reacción EHRlich ^b	Color conidios CYA ^b	Color reverso CYA ^b	Color reverso YES ^b	Pared estipes	Conidios
<i>P. solitum</i>	A n=6	11-28	0	24-38	13-25	8-15 Bueno a muy bueno/ácido	-	No	Verde a azul verdoso	Crema a naranja	Amarillo a naranja ^c	Rugosa	Lisos
	B	16-34	0	25-39	14-26	6-22 Bueno a muy bueno/ácido debajo de la colonia, base pobre o retrasada	-	No	Azul verdoso oscuro a ferde, Exudado crema-amarillo ocre frecuente	Crema a beige claro	Amarillo a naranja	Rugosa	Lisos a ligeramente rugosos

^a A, cepas de este estudio; B, datos de la bibliografía; ^b, incubación a 25°C/7 d; ^c, incubación a 30°C/7 d; ^d, 3 cepas mostraron color marrón claro; ^e, 1 cepa mostró centro de la colonia marrón.

Tabla 4. Resultados de la identificación de cepas de *Penicillium* aisladas de queso (n=32).

Cepa	Fenotipo y producción de micotoxinas	ITS	%	BenA	%	CaM	%	Identificación final
M30	<i>P. chrysogenum</i>	<i>P. rubens</i> <i>P.</i> <i>chrysogenum</i>	99 99	<i>P. chrysogenum</i> <i>P. rubens</i>	99 99	nd		<i>P. chrysogenum</i>
M32	<i>P. nordicum</i>	<i>P. viridicatum</i> <i>P. verrucosum</i>	99 99	<i>P. nordicum</i>	99	nd		<i>P. nordicum</i>
M34	<i>P. chrysogenum</i>	<i>P. rubens</i> <i>P.</i> <i>chrysogenum</i>	99 99	<i>P. chrysogenum</i> <i>P. rubens</i>	99 99	nd		<i>P. chrysogenum</i>
M35	<i>P. commune</i>	<i>P. commune</i> <i>P. solitum</i>	99 99	<i>P. biforme</i> <i>P. commune</i> <i>P.camemberti</i>	100 100 100	nd		<i>P. commune</i>
M57	<i>P. commune</i>	<i>P. commune</i> <i>P. solitum</i>	100 100	<i>P. biforme</i> <i>P. commune</i> <i>P.camemberti</i>	100 100 100	nd		<i>P. commune</i>
M76	<i>P. solitum</i>	<i>P. commune</i> <i>P. solitum</i>	99 99	<i>P. solitum</i>	100	nd		<i>P. solitum</i>
M123	<i>P. solitum</i>	<i>P. commune</i> <i>P. solitum</i>	100 100	<i>P. solitum</i>	100	nd		<i>P. solitum</i>
M124	<i>P. solitum</i>	<i>P. commune</i> <i>P. solitum</i>	99 99	<i>P. solitum</i>	100	nd		<i>P. solitum</i>

Cepa	Fenotipo y producción de micotoxinas	ITS	%	BenA	%	CaM	%	Identificación final
M145	<i>P. commune</i>	<i>P. commune</i>	100	<i>P. biforme</i>	100	nd		<i>P. commune</i>
		<i>P. solitum</i>	100	<i>P. commune</i>	100			
				<i>P.camemberti</i>	100			
M170	<i>P. commune</i>	<i>P. commune</i>	99	<i>P. biforme</i>	99	nd		<i>P. commune</i>
		<i>P. solitum</i>	99	<i>P. commune</i>	99			
				<i>P.camemberti</i>	99			
P1	<i>P. commune</i>	<i>P. commune</i>	100	<i>P. biforme</i>	100	nd		<i>P. commune</i>
		<i>P. solitum</i>	100	<i>P. commune</i>	100			
				<i>P.camemberti</i>	100			
P2	<i>P. commune</i>	<i>P. commune</i>	100	<i>P. biforme</i>	100	nd		<i>P. commune</i>
		<i>P. solitum</i>	100	<i>P. commune</i>	100			
				<i>P.camemberti</i>	100			
P3	<i>P. commune</i>	<i>P. commune</i>	99	<i>P. biforme</i>	100	nd		<i>P. commune</i>
		<i>P. solitum</i>	99	<i>P. commune</i>	100			
				<i>P.camemberti</i>	100			
P4	<i>P. commune</i>	<i>P. commune</i>	99	<i>P. biforme</i>	99	nd		<i>P. commune</i>
		<i>P. solitum</i>	99	<i>P. commune</i>	99			
				<i>P.camemberti</i>	99			
P5	<i>P. commune</i>	<i>P. commune</i>	99	<i>P. biforme</i>	100	nd		<i>P. commune</i>
		<i>P. solitum</i>	99	<i>P. commune</i>	100			
				<i>P.camemberti</i>	100			
P6	<i>P. commune</i>	<i>P. commune</i>	100	<i>P. biforme</i>	99	nd		<i>P. commune</i>
		<i>P. solitum</i>	100	<i>P. commune</i>	99			
				<i>P.camemberti</i>	99			

Cepa	Fenotipo y producción de micotoxinas	ITS	%	BenA	%	CaM	%	Identificación final
Q2M1	<i>P. commune</i>	<i>P. commune</i> <i>P. solitum</i>	99 99	<i>P. biforme</i> <i>P. commune</i> <i>P.camemberti</i>	100 100 100	nd		<i>P. commune</i>
Q2M2	<i>P. commune</i>	<i>P. commune</i> <i>P. solitum</i>	99 99	<i>P. biforme</i> <i>P. commune</i> <i>P.camemberti</i>	99 99 99	nd		<i>P. commune</i>
Q2M3	<i>P. commune</i>	<i>P. commune</i> <i>P. solitum</i>	99 99	<i>P. biforme</i> <i>P. commune</i> <i>P.camemberti</i>	99 99 99	nd		<i>P. commune</i>
Q2M4	<i>P. commune</i>	<i>P. commune</i> <i>P. solitum</i>	99 99	<i>P. biforme</i> <i>P. commune</i> <i>P.camemberti</i>	100 100 100	nd		<i>P. commune</i>
Q2M5	<i>P. solitum</i>	<i>P. commune</i> <i>P. solitum</i>	99 99	<i>P. solitum</i>	100	nd		<i>P. solitum</i>
Q2M7	<i>P. commune</i>	<i>P. commune</i> <i>P. solitum</i>	100 100	<i>P. biforme</i> <i>P. commune</i> <i>P.camemberti</i>	99 99 99	<i>P. biforme</i> <i>P. commune</i> <i>P.camemberti</i>	99 99 99	<i>P. commune</i>
Q2M11	<i>P. commune</i>	<i>P. commune</i> <i>P. solitum</i>	99 99	<i>P. biforme</i> <i>P. commune</i> <i>P.camemberti</i>	99 99 99	nd		<i>P. commune</i>
Q3M1	<i>P. cvjetkovicii</i>	<i>P. monsgalena</i> <i>P.</i> <i>salmoniflumine</i>	99 99	<i>P. chermesinum</i>	99	<i>P. cvjetkovicii</i>	99	<i>P. cvjetkovicii</i>
QLM1	<i>P. commune</i>	<i>P. commune</i> <i>P. solitum</i>	99 99	<i>P. commune</i> <i>P.camemberti</i>	99 99	nd		<i>P. commune</i>

Cepa	Fenotipo y producción de micotoxinas	ITS	%	BenA	%	CaM	%	Identificación final
QLM2	<i>P. commune</i>	<i>P. commune</i>	100	<i>P. biforme</i>	99	nd		<i>P. commune</i>
		<i>P. solitum</i>	100	<i>P. commune</i>	99			
QP1	<i>P. commune</i>	<i>P. commune</i> <i>P. solitum</i>	99 99	<i>P. camemberti</i>	99	nd		<i>P. commune</i>
				<i>P. biforme</i>	99			
				<i>P. commune</i>	99			
QP2	<i>P. commune</i>	<i>P. commune</i> <i>P. solitum</i>	98 98	<i>P. camemberti</i>	99	nd		<i>P. commune</i>
				<i>P. biforme</i>	99			
				<i>P. commune</i>	99			
QP3	<i>P. commune</i>	<i>P. commune</i> <i>P. solitum</i>	99 99	<i>P. camemberti</i>	99	nd		<i>P. commune</i>
				<i>P. biforme</i>	100			
				<i>P. commune</i>	100			
QPA3	<i>P. solitum</i>	<i>P. commune</i>	99	<i>P. solitum</i>	100	nd		<i>P. solitum</i>
		<i>P. solitum</i>	99					
QPA4	<i>P. solitum</i>	<i>P. commune</i>	99	<i>P. solitum</i>	100	nd		<i>P. solitum</i>
		<i>P. solitum</i>	99					
QZ1	<i>P. expansum</i>	<i>P. expansum</i>	100	<i>P. expansum</i>	100	nd		<i>P. expansum</i>

nd, no determinada.

Tabla 5. Producción de CPA en agar YES de *Penicillium commune* aislados de queso madurado (15 cepas) y una cepa de colección (MP82) (media±SD de dos experimentos, extracciones en duplicado).

Cepa (n=16)	CPA µg/mL	SD	CPA µg/g micelio seco	SD
P5	2709,99	89,30	7476,94	1212,79
P1	2690,77	138,96	7381,50	195,77
QP1	2341,77	194,47	6667,73	315,17
QLM2	1865,29	290,66	6295,60	1475,27
M170	1635,44	38,55	5543,81	441,62
P3	1293,56	78,73	4404,69	553,13
QP2	1516,66	61,71	3993,70	140,95
P6	1206,34	272,43	3808,42	578,05
QP3	1770,50	291,51	3555,69	73,40
M145	1656,06	53,74	3509,54	148,39
P4	1111,22	118,48	3210,62	306,69
P2	397,39	12,23	1208,28	329,84
QLM1	532,06	35,46	1106,00	167,90
M35	294,32	6,92	533,80	60,13
M57	49,85	2,50	105,77	12,20
MP82	2400,44	164,09	7216,69	2613,55
Media	1466,98		4126,17	
SD	814,82		2410,86	

MP82= *P. commune* (CBS 468.84).

Figura 2. Árbol UPGMA obtenido a partir del análisis filogenético de las secuencias de *ITS*. Se incluyeron secuencias verificadas de especies de *Penicillium* asociadas con el deterioro del queso. Los valores de arranque se muestran en los nodos de rama.

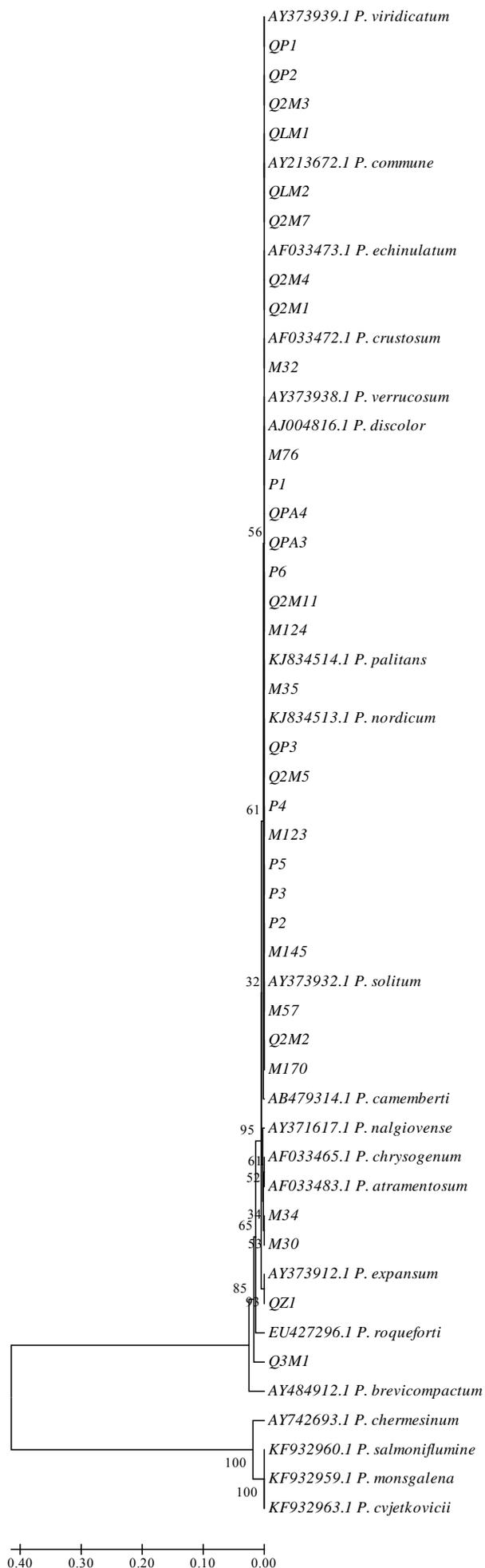
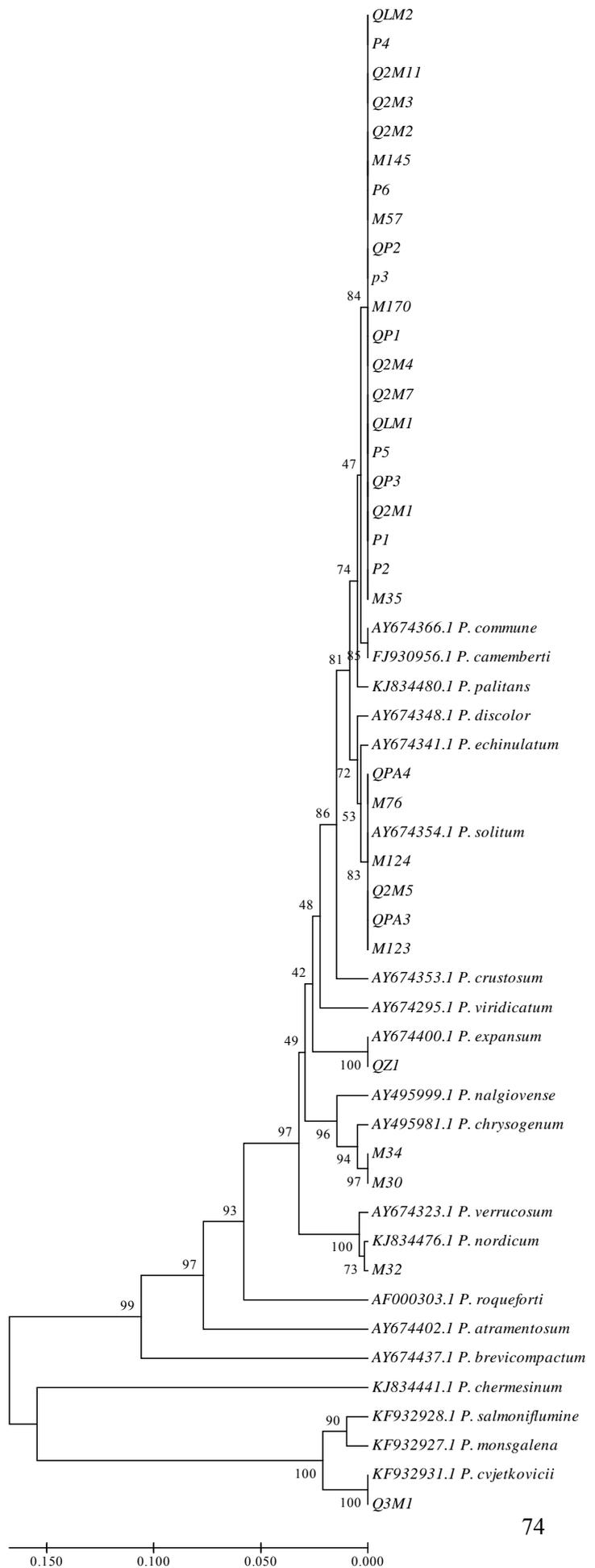


Figura 3. Árbol UPGMA obtenido a partir del análisis filogenético de las secuencias de *BenA*. Se incluyeron secuencias verificadas de especies de *Penicillium* asociadas con el deterioro del queso. Los valores de arranque se muestran en los nodos de rama.





**CAPÍTULO III.
AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y
CARACTERIZACIÓN DE BAL
CON ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE LECHE**

1. INTRODUCCIÓN

Las bacterias ácido-lácticas, bacterias del ácido láctico o bacterias lácticas (BAL) son un grupo heterogéneo de microorganismos Gram positivos, cuya característica principal es la producción de ácido láctico a partir de la fermentación de azúcares. Conforme a la taxonomía actual, el grupo de bacterias ácido-lácticas está constituido por seis familias y al menos 38 géneros, que incluyen, entre otros, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Vagococcus*, y *Weissella* (Vandamme *et al.*, 2014).

Las bacterias del ácido láctico son conocidas por su acción bioconservante y pueden albergar tanto antibacterianos como propiedades antifúngicas (Crowley, 2013). Este efecto se debe a la producción de compuestos y también la competencia por nutrientes (Lindgren y Dobrogosz, 1990; Stiles, 1996).

Las principales sustancias antimicrobianas producidas por BAL son ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno, diacetilo, dióxido de carbono y bacteriocinas. Las bacteriocinas, en particular, son péptidos biológicamente activos que presentan actividad antimicrobiana contra diversos microorganismos, incluso patógenos. Entre las diversas bacteriocinas ya descritas, la nisina es la más estudiada y la única considerada segura para ser utilizada en alimentos (Nero *et al.*, 2009), siendo la única bacteriocina autorizada como aditivo conservador en la Unión Europea.

La mayoría de los estudios sobre la actividad antimicrobiana de las BAL aisladas de leche cruda y de diversas variedades de quesos se centran en la actividad que ejercen frente a otras bacterias, como por ejemplo los realizados por Nero *et al.* (2008), Nero *et al.* (2009) y Tamanini *et al.* (2012) a partir de leche y por Alexandre *et al.* (2002), Caridi *et al.* (2003), Neto *et al.* (2005), Chioda *et al.* (2006), Chioda *et al.* (2007) con bacterias lácticas aisladas de quesos.

En cuanto a los estudios sobre actividad antifúngica, inicialmente la mayoría se concentraban en la inhibición de *Aspergillus flavus*, debido a su carácter aflatoxigénico (Batish *et al.*, 1989; Gourama y Bullerman, 1995; Roy *et al.*, 1996), pero a lo largo del tiempo el interés frente a *Penicillium* ha crecido (Gourama y Bullerman, (1997); (Magnusson *et al.*, (2003); Voulgari *et al.*, (2010); Wang *et al.*, (2012); Delavenne *et al.*, (2012); Cheong *et al.*, (2014)). La actividad antifúngica en la inhibición del crecimiento puede deberse a mismos los compuestos y factores ya mencionados. En un

estudio realizado en la leche por Delavenne *et al.* (2012), la prevalencia de bacterias con este potencial fue de alrededor del 2%, siendo predominantemente aislados del género *Lactobacillus* (94%). La tabla 1 muestra una revisión bibliográfica que cubre los últimos 20 años de estudios sobre la acción antifúngica de BAL sobre mohos con potencial alterante y micotoxigénico.

Entre los microorganismos contaminantes en leche y derivados, los mohos, en particular los pertenecientes al género *Penicillium*, son los principales agentes responsables de la alteración en los quesos curados, causando, además de deterioro del producto, un posible problema sanitario al ser, en muchas ocasiones, potencialmente toxigénicos (Dalié *et al.*, 2010). El queso es un excelente sustrato para su crecimiento y varias micotoxinas pueden ser producidas en el mismo y distribuirse en el producto. Su aparición en el producto ocurre en la fase de maduración, ya que las condiciones ambientales (principalmente, humedad y temperatura) favorecen su desarrollo en la superficie del producto (Jay, 2005).

Las estrategias principales para efectuar un control del crecimiento de *Penicillium* en los quesos se basan en el empleo de conservantes químicos, como la natamicina, el ácido sórbico y los sorbatos. Sin embargo, estos tratamientos se aplican principalmente en la superficie y con frecuencia surgen cepas resistentes, reduciendo la eficacia de los baños antifúngicos utilizados. Según Nielsen y Boer (2004), las especies de más problemáticas de *Penicillium* en este tipo de alimento, como *P. commune* son especialmente resistentes a los sorbatos (Brul y Coote, 1999; Viljoen, 2001).

Dentro de las estrategias modernas para reducir la contaminación de los alimentos por mohos y la producción de micotoxinas se encuentra la aplicación de técnicas de biopreservación, empleando microorganismos antagonistas. En particular, las bacterias ácido-lácticas se consideran microorganismos apropiados para suprimir el crecimiento de otros microorganismos incluyendo levaduras y mohos (Schillinger y Vilarreal, 2010).

La creciente presión de los consumidores hacia el uso de conservantes naturales en alimentos, hace que las BAL emerjan como los candidatos ideales debido a su estado GRAS (“Generally Recognized As Safe”) en Estados Unidos y de presunción cualificada de seguridad QPS (“Qualified Presumption of Safety”) en la Unión Europea y, en consecuencia, la exploración científica de su potencial es de gran interés (Crowley *et al.*, 2013). Para ello es importante estudiar las especies de BAL presentes en la leche

y analizar sus características de interés tecnológico así como su capacidad de inhibición de mohos alterantes y toxigénicos.

Tabla 1. Revisión de estudios sobre BAL con actividad frente a mohos contaminantes de alimentos.

BAL	Fuente del aislamiento	Efecto sobre mohos	Referencia (orden cronológico)
<i>Lactobacillus casei</i> sub. <i>pseuplantarum</i>	ensilado	<i>Aspergillus flavus</i>	(Gourama, 1997)
<i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>rhamnosus</i> , <i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>casei</i> , <i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>pseudoplantarum</i> , <i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>tolerans</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Lactococcus plantarum</i> , <i>Pediococcus pentosaceus</i> , <i>Pediococcus</i> sp., <i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Leuconostoc lactis</i> ,	no descrito	<i>Penicillium discolor</i> , <i>Penicillium commune</i> , <i>Penicillium roqueforti</i> y <i>Aspergillus vesicolor</i>	(Cabo <i>et al.</i> , 2002)
<i>Lactobacillus plantarum</i> y <i>Lactobacillus rhamnosus</i>	no descrito	<i>Penicillium nordicum</i>	(Schillinger y Villarreal, 2010)

BAL	Fuente del aislamiento	Efecto sobre mohos	Referencia (orden cronológico)
<i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Lactobacillus rhamnosus</i> , <i>Lactobacillus paracasei</i> <i>subsp. paracasei</i> , <i>Lactobacillus brevis</i> y <i>Lactobacillus fermentum</i>	queso/ yogur	<i>Penicillium spp.</i> , <i>Penicillium candidum</i> y <i>Debaryomyces hansenii</i>	(Voulgari <i>et al.</i> , 2010)
<i>Lactobacillus casei</i>	no descrito	<i>Penicillium</i> <i>chrysogenum</i>	(Li <i>et al.</i> , 2012)
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> y <i>Lactobacillus</i> <i>fermentum</i>	no descrito	<i>Aspergillus flavus</i>	(Gerbardo <i>et al.</i> , 2012)
<i>Lactobacillus casei</i> y <i>Lactobacillus plantarum</i>	leche	<i>Penicillium expansum</i> , <i>Mucor plumbeus</i> , <i>Kluyveromyces lactis</i> , <i>Pichia anomala</i>	(Delavenne <i>et al.</i> , 2012)
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> , <i>Lactobacillus paracasei</i> y <i>Lactobacillus</i> <i>harbinensis</i> ,	leche	<i>Penicillium</i> <i>brevicompactum</i>	(Delavenne <i>et al.</i> , 2013)
<i>Lactobacillus plantarum</i>	soja	<i>Aspergillus niger</i>	(Ahmad Rather <i>et al.</i> , 2013)
<i>Lactobacillus brevis</i>	masa fermentada	<i>Aspergillus niger</i>	(Biase <i>et al.</i> , 2014)
<i>Lactobacillus plantarum</i>	vegetal fermentado	<i>Aspergillus fumigatus</i> y <i>Pichia kudriavzevii</i>	(Ryu <i>et al.</i> , 2014)
<i>Lactobacillus plantarum</i>	no descrito	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Rhizopus stolonifer</i> , <i>Mucos racemosus</i> y	(Gupta y Srivastava, 2014)

BAL	Fuente del aislamiento	Efecto sobre mohos	Referencia (orden cronológico)
		<i>Penicillium chrysogenum</i>	
<i>Lactobacillus plantarum</i>	queso	<i>Penicillium commune</i>	(Cheong <i>et al.</i> , 2014)
<i>Lactobacillus brevis</i>	yogur	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Aspergillus flavus</i> y <i>Fusarium graminearum</i>	(Tropcheva <i>et al.</i> , 2014)
<i>Lactobacillus paracasei</i>	no descrito	<i>Penicillium sp.</i> y <i>Penicillium solitum</i>	(Aunsbjerg <i>et al.</i> , 2015)
<i>Pediococcus spp.</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Lactobacillus brevis</i> y <i>Lactobacillus sanfranciscensis</i>	alimento fermentado	<i>Aspergillus carbonarius</i> , <i>Aspergillus niger</i> y <i>Aspergillus ochraceus</i>	(Essia Ngang <i>et al.</i> , 2015)
<i>Lactobacillus bulgaricus</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Lactobacillus johnsonii</i> , <i>Lactobacillus rhamnosus</i> y <i>Lactobacillus ruminis</i>	no descrito	<i>Aspergillus parasiticus</i> y <i>Penicillium expansum</i>	(Saladino <i>et al.</i> , 2016)

BAL	Fuente del aislamiento	Efecto sobre mohos	Referencia (orden cronológico)
<i>Lactobacillus citreum</i> , <i>Lactobacillus sakei</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Lactobacillus spicheri</i> , <i>Lactobacillus reuteri</i> , <i>Lactobacillus brevis</i> , <i>Propionibacterium acidipropionici</i> y <i>Propionibacterium freudenreichii</i>	panadería	<i>Aspergillus niger</i> y <i>Penicillium corylophilum</i>	(Le Lay <i>et al.</i> , 2016)
<i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Lactobacillus kefir</i> y <i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i>	kéfir	<i>Aspergillus flavus</i>	(Gamba <i>et al.</i> , 2016)
<i>Lactobacillus casei</i>	planta/ humanos	<i>Alternaria brassicicola</i> , <i>Aspergillus alternata</i> , <i>Aspergillus niger</i> , <i>Fusarium lateritium</i> , <i>Geotrichum candidum</i> , <i>Mucor hiemalis</i>	(Lipińska <i>et al.</i> , 2016)
<i>Lactobacillus fermentum</i>	masa fermentada de yuka	<i>Penicillium expansum</i> , <i>Aspergillus flavus</i> , <i>Aspergillus niger</i> , <i>Candida albicans</i> y <i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	(Adedokun <i>et al.</i> , 2016)

BAL	Fuente del aislamiento	Efecto sobre mohos	Referencia (orden cronológico)
<i>Lactobacillus plantarum</i>	yogur, manzana, frutas cítricas	<i>Penicillium roqueforti</i> , <i>Penicillium citrinum</i> , <i>Penicillium Oxalicum</i> , <i>Aspergillus fumigatus</i> , <i>Aspergillus flavus</i> y <i>Rhizopus nigricans</i>	(Zhang <i>et al.</i> , 2016)
<i>Lactobacillus brevis</i> y <i>Lactobacillus. plantarum</i>	extracto de malta de cebada	<i>Fusarium culmorum</i>	(Peyer <i>et al.</i> , 2016)
<i>Lactobacillus plantarum</i>	alimento no descrito	<i>Fusarium culmorum</i> , <i>Penicillium chrysogenum</i> , <i>Penicillium Expansum</i> , <i>Penicillium Roqueforti</i> y <i>Aspergillus flavus</i>	(Russo <i>et al.</i> , 2017)
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> , <i>Bifidobacterium animalis subsp. lactis</i> y <i>Bifidobacterium animalis</i>	no descrito	<i>Penicillium chrysogenum</i>	(Fernandez <i>et al.</i> , 2017)
<i>Lactobacillus brevis</i>	cerdo	<i>Fusarium culmorum</i> y <i>Fusarium graminearum</i>	(Peyer <i>et al.</i> , 2017)

BAL	Fuente del aislamiento	Efecto sobre mohos	Referencia (orden cronológico)
<i>Lactobacillus harbinensis</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Lactobacillus casei</i> , <i>Lactobacillus rhamnosus</i> , <i>Lactobacillus reuteri</i> , <i>Lactobacillus brevis</i> , <i>Lactobacillus buchneri</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Leuconostoc mes.dextranicum</i> y <i>Propionibacteria acidipropionici</i>	no descrito	<i>Penicillium commune</i> <i>Mucor racemosus</i> <i>Geotrichum geotrichum</i> <i>Yarrowia lipolytica</i>	(Salas <i>et al.</i> , 2018)

2. OBJETIVOS

Los objetivos de este estudio fueron:

1. Aislar directamente, de muestras de leche de cabra, oveja y vaca, bacterias ácido-lácticas con actividad antifúngica frente a dos cepas de *Penicillium* (*P. nordicum*-M32 y *P. commune*-M35) alterantes y toxigénicas aisladas de queso madurado tipo Castellano e identificadas en el capítulo II.

2. Identificar las cepas de BAL con capacidad antagonista detectadas en el objetivo 1.

3. Analizar la capacidad antifúngica de las cepas de BAL con mayor capacidad antagonista frente a diversas cepas de *Penicillium* alterantes y toxigénicas (4 de *P. commune* y 1 de *P. verrucosum*), con el fin de evaluar la amplitud de la actividad antagonista.

4. Cuantificar el efecto antagonista sobre el crecimiento y la producción de micotoxinas de *P. commune* y *P. nordicum*, de 2 cepas de BAL seleccionadas en base a este estudio.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. RECOGIDA DE MUESTRAS DE LECHE

Durante el periodo comprendido entre los meses de enero a octubre de 2015, se tomaron asépticamente, según las recomendaciones de la Asociación Americana de Salud Pública (APHA) (1985), 93 muestras de leche cruda: (27) de cabra, (30) de oveja y (36) de vaca. Las muestras fueron tomadas en 9 granjas de las provincias de León y Zamora (directamente de los tanques de refrigeración) y fueron mantenidas a temperatura de refrigeración hasta el momento de su análisis, realizado al llegar al laboratorio de análisis microbiológico en el Departamento de Higiene y Tecnología de los Alimentos de la Universidad de León.

3.2. CEPAS DE *PENICILLIUM* UTILIZADAS

Para la preselección (aislamiento directo) se utilizaron 2 cepas de *Penicillium* alterantes y toxigénicas de la colección del Departamento de Higiene y Tecnología de los Alimentos de la U. de León, identificadas en el presente trabajo y que se encuentran depositadas en la Colección Española de Cultivos Tipo (*P. nordicum* M32-CECT 20939 y *P. commune* M35-CECT 20940), cepas productoras de ocratoxina y ácido ciclopiazónico, respectivamente.

3.3. AISLAMIENTO DIRECTO A PARTIR DE LECHE, DE CEPAS DE BAL CON ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA

Se llevó a cabo una preselección de cepas con actividad antifúngica directamente en las placas de recuento de agar MRS pH 5 según Carr *et al.* (2002), utilizando la técnica descrita por Magnusson y Schnürer (2001) con ligeras modificaciones como se describe a continuación:

- En primer lugar a partir de un cultivo de 5-7 días/25 °C en medio MEA (Malt Extract Agar, OXOID) en frasco de agar inclinado, se preparó una suspensión de esporas de la cepa de *Penicillium* M32, añadiendo a los frascos 5 mL de una solución de Tween 80 al 0,05% estéril, hasta conseguir una concentración de 10⁵ esporas (recuento en cámara de Neubauer).

- A continuación, se transfirió 1 mL de la suspensión de M32 a 9 mL de MEA licuado mantenido a 45 °C y se vertió dicha mezcla sobre la placa de recuento MRS en sobrecapa, con incubación posterior a 25 °C/5-7 días. Después del período de incubación, se comprobó la aparición de halos de inhibición alrededor de las colonias de BAL y se llevó a cabo el posterior aislamiento de las cepas positivas (Fig. 1), que se almacenaron a congelación en presencia de 30 % de glicerol hasta su caracterización.

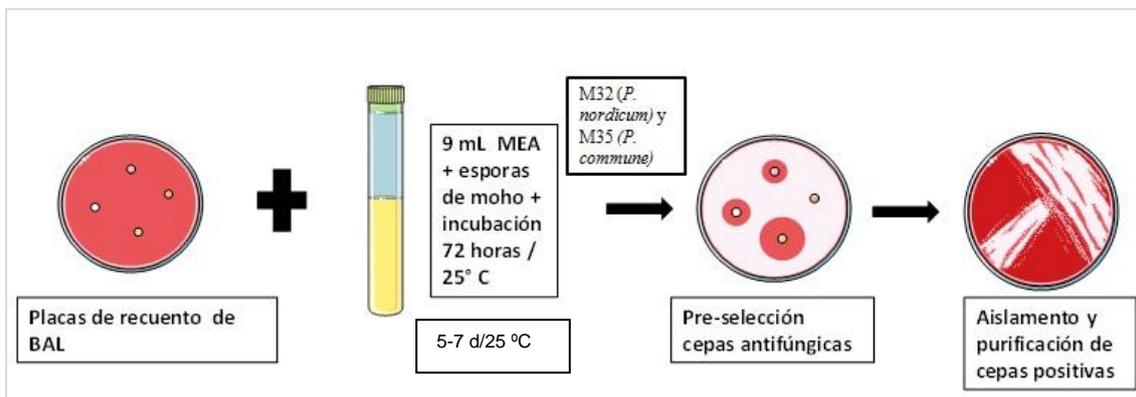


Figura 1. Preselección de las cepas de BAL directamente en las placas de recuento.

3.4. CONFIRMACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA

La confirmación de la actividad antifúngica de las cepas de BAL seleccionadas en el paso anterior se realizó frente a las cepas de *P. nordicum* M32 y *P. commune* M35 mediante una técnica de siembra en placa con sobrecapa del hongo según Magnusson y Schnürer (2001) modificada (Fig. 2). A partir de un cultivo fresco de las cepas de BAL (24 a 48 horas), se hizo una siembra en 3 puntos por duplicado en placas de MRS con incubación a 37 °C/72 horas. La preparación de la sobrecapa de esporas fúngicas fue hecha como se indica en el apartado anterior.

La actividad antifúngica se evaluó por medición del diámetro de los halos de inhibición y clasificación posterior de las cepas con mayor capacidad mediante la siguiente escala:

Baja - 1 a 2,9 milímetros	Media - 3 a 7,9 milímetros	Alta - 8 a 16,1 milímetro
---------------------------	----------------------------	---------------------------

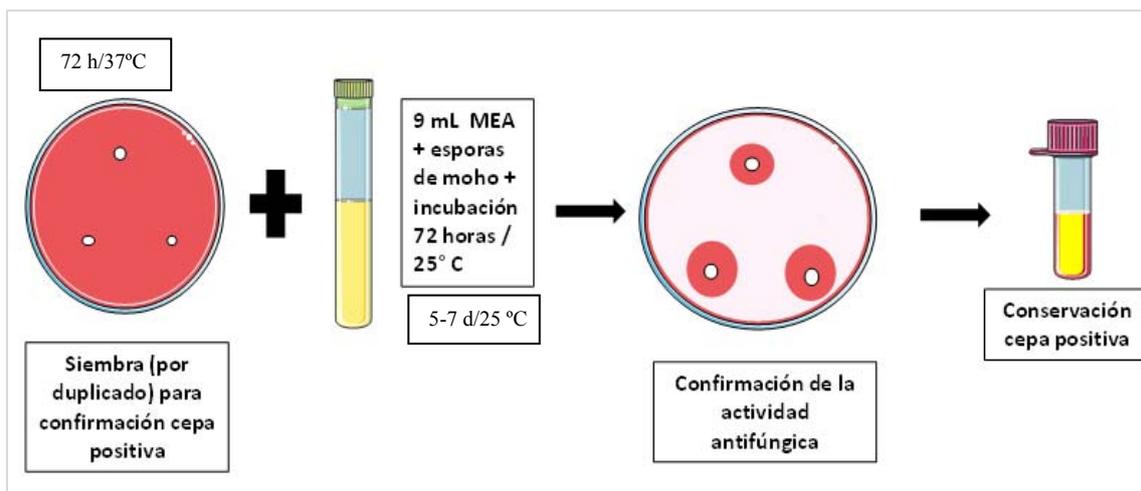


Figura 2. Confirmación de la actividad antifúngica de las cepas de BAL.

3.5. ACTIVIDAD FRENTE A OTRAS CEPAS DE *PENICILLIUM*

Las cepas que obtuvieron mejores resultados en el paso 3.4 fueron evaluadas frente a otras cepas de *Penicillium* alterantes y toxigénicas con el objetivo de evaluar la amplitud de la actividad antagonista, mediante la técnica utilizada descrita en el apartado 3.4.

3.5.1. Cepas de *Penicillium* utilizadas

Para esta etapa se utilizaron 5 cepas (*P. commune* – cepas M57, M145, P3 y MP82 CBS46884 - y *P. verrucosum* –MP88 = CECT 20766) productoras de ácido ciclopiazónico y ocratoxina, respectivamente, consideradas micotoxinas que potencialmente pueden estar presentes en quesos (Frisvad *et al.* 2007). Tres de las cepas habían sido aisladas de queso (M57 y M145, pertenecían a la colección del Departamento de Higiene y Tecnología de los Alimentos de la U. de León; P3, fue aislada en este estudio) y dos eran cepas de colección.

3.6. EFECTO DE BAL EN EL CRECIMIENTO Y LA PRODUCCIÓN DE MICOTOXINAS

El efecto de las BAL con actividad antifúngica en el crecimiento y la producción de micotoxinas se realizó utilizando la metodología de Gqaleni *et al.* (1996) y Taniwaki *et al.* (2006) con algunas modificaciones.

3.6.1. Cultivos de BAL y *Penicillium* spp.

Las 2 cepas de *Penicillium* spp. testadas fueron *P. nordicum* M32 y *P. commune* M35. Las cepas de *Lactobacillus* spp. (25/1 y 51/3) fueron cultivadas en caldo MRS a 30 °C por 48 h. Los inóculos de hongos fueron cultivados en MEA a 25 °C por 7 días. Se recogieron esporas en Tween 80 al 0,05%.

3.6.2. Cuantificación de micotoxinas

1 mL de los cultivos de BAL en la concentración 5 de la escala Mc Farland fueron añadidos en 20 mL del medio YES. Se tomó 2 µL de suspensión de esporas y se sembró en tres puntos distintos en las placas de YES con BAL. Para controles positivos, no se añadió BAL en el medio YES. Se incubó a 25 °C por 7 días.

3.6.3. Técnica de siembra y estimación de micelio seco

Se realizó según se indica en el apartado 3.3.2 del Cap. II.

3.6.4. Extracción de las micotoxinas

Se realizó según se indica en el apartado 3.3 del Cap. II. Los límites de detección para OTA y CPA fueron 1.30 y 0.83 µg / mL, respectivamente; repetibilidad, 88.21 y 90.41; linealidad (R²), 0.9926 y 0.9995.

3.7. IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LAS BAL

3.7.1. Identificación molecular por secuenciación del gen ADNr 16S

Las cepas que obtuvieron mejores resultados en el paso anterior fueron identificadas mediante amplificación y secuenciación del gen ADNr 16S.

- **Microorganismos.** Las cepas de bacterias ácido-lácticas con mayor capacidad antifúngica se recuperaron a partir de los caldos congelados en caldo de lactobacilos con glicerol mediante un pase de recuperación en caldo y posterior comprobación de la pureza mediante siembra en placas de agar MRS a 37 °C.
- **Extracción de ADN.** Un mililitro de cultivos de 24 horas se centrifugó a 10000 g durante 2 minutos, descartando el sobrenadante. El sedimento obtenido se lavó dos veces con 1 mL de agua bidestilada estéril y finalmente se suspendió en 250 µL de reactivo “Instagene”. Las suspensiones bacterianas obtenidas se trataron, de acuerdo con las instrucciones del fabricante, a 56 °C durante 15 minutos y a 100 °C durante 8 minutos para romper las células y, por último, se centrifugaron

a 10000 g durante 2 minutos para sedimentar el reactivo insoluble, conservando el sobrenadante para su utilización en la identificación molecular.

- **Identificación molecular.** Se llevó a cabo una PCR de amplificación del ADNr 16S según el protocolo descrito por De Garnica *et al.* (2014), utilizando 5 µl de los sobrenadantes obtenidos como ADN molde y los cebadores 8F (AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG) y 1541R (AAG GAG GTG ATC CAG CCG CA). El resultado de la reacción se comprobó mediante electroforesis en gel de agarosa de 5 µl de los amplificados. Los fragmentos amplificados se purificaron mediante el kit “PCR clean-up and Gel extraction” y se secuenciaron las dos hebras en el equipo MegaBace mediante los mismos cebadores utilizados para la amplificación. Las secuencias obtenidas se analizaron visualmente empleando el software Chromas Lite 2.01 (<http://technelysium.com.au/>) y se alinearon con el módulo ContigExpress del programa Vector NTI. Las secuencias consenso obtenidas del alineamiento de las dos hebras se compararon con las depositadas en la base de datos GenBank mediante la plataforma BLAST (“Basic Local Alignment Search Tool”, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

3.7.2. Características fenotípicas

Dos cepas que presentaron mejores resultados en la etapa 3.5 (Lc-25/1, identificada como *Lactobacillus casei* y Lp-51/3 como *Lactobacillus paracasei*) fueron analizadas por sus perfiles de fermentación de azúcares y de actividad enzimática mediante galerías miniaturizadas.

3.7.2.1. Perfil de fermentación de azúcares (API50CHL)

Las dos cepas se cultivaron en agar MRS a 30 °C durante 48 h. Se suspendieron de cinco a diez colonias de cada una en medio API 50 CHL y se mezclaron vigorosamente en vórtex, luego se transfirieron a cada uno de los 50 pocillos en las tiras API 50 CHL. Todos los pocillos se cubrieron con aceite de parafina estéril (Merck) para efectuar la anaerobiosis, según lo recomendado por el fabricante y se incubaron a 30 °C durante 48 h. Los cambios de color de violeta a amarillo se presentaron mediante un signo positivo (+), mientras que un signo negativo (-) no representó ningún cambio. El perfil bioquímico obtenido para las cepas se identificó utilizando el software de identificación Apiweb mediante comparación con la base de datos del fabricante (BioMérieux, España, S.A).

3.7.2.2. Perfil enzimático (APIZYM)

Para cada una de las 2 cepas se agregaron 25 microlitros de suspensión celular a cada uno de los 19 pocillos de la galería APIZYM que contenían sustratos enzimáticos cromogénicos deshidratados y las tiras se incubaron durante 4 horas a 37 °C. La adición de la muestra acuosa rehidrata los sustratos e inicia las reacciones. La acción hidrolítica de las enzimas respectivas en sustratos derivados de naftilo da como resultado la liberación de naftol, que fue visualizada por adición de los reactivos de detección (A y B) suministrados con el sistema.

Se mantuvo una atmósfera húmeda durante la incubación dispensando aproximadamente 5 mL de agua estéril en la bandeja de incubación provista con el kit de enzimas. La reacción se terminó mediante la adición de una gota de reactivo A y el color se desarrolló mediante la adición de una gota de reactivo B. La actividad se midió comparando el grado de color desarrollado en 5 minutos con la tabla de colores proporcionada por el fabricante y fue expresado en una escala de cero (sin actividad) a 5 (actividad máxima).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. AISLAMIENTO DE BAL CON ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA Y CUANTIFICACIÓN DE LA ACTIVIDAD EN EL CRECIMIENTO DE *P. COMMUNE* Y *P. NORDICUM*

De las 93 muestras de leche analizadas, en 29 se detectó capacidad antifúngica frente a al menos una de las cepas de *Penicillium*, correspondiendo a 12 (41%) muestras de leche de cabra, 11 (38%) de leche de vaca y 6 (21%) de leche de oveja, consiguiendo el aislamiento de un total de 57 cepas de BAL (Fig. 3; Foto 1).

La mayoría de los 57 aislados activos frente a *P. nordicum* (M32) tuvieron origen en la leche de cabra (41%) seguido de leche de vaca (38%) y leche de oveja (21%). Treinta y cuatro cepas (59,6%) se clasificaron como de alta actividad (halos entre 8-16,1 mm) y la mayoría de ellas se encontraron entre los aislados obtenidos de leche de vaca (22 de las 34 cepas, 64,7%). (Tabla 2).

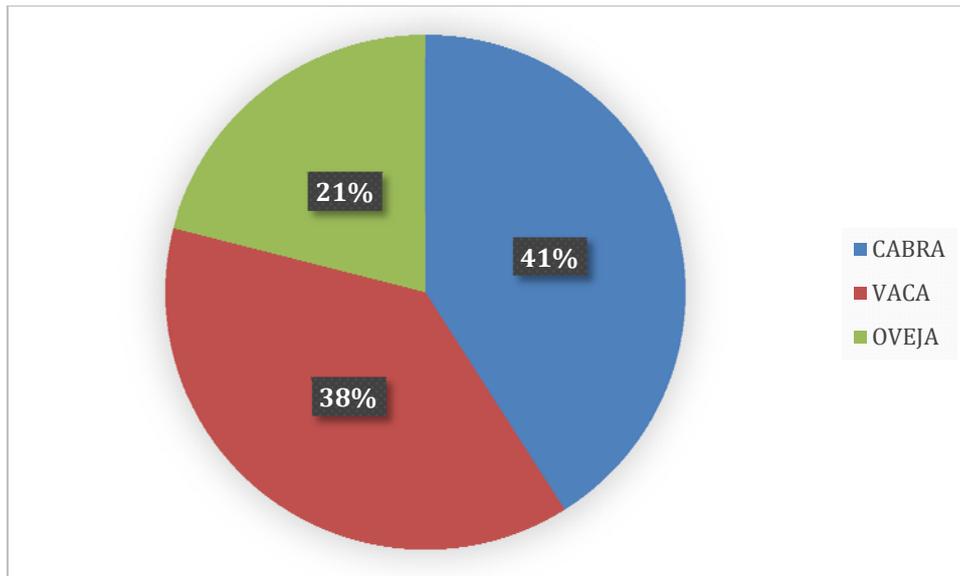


Figura. 3. Procedencia (tipo de leche) de las cepas de BAL con actividad antifúngica frente a *P. nordicum* (porcentaje de muestras positivas).

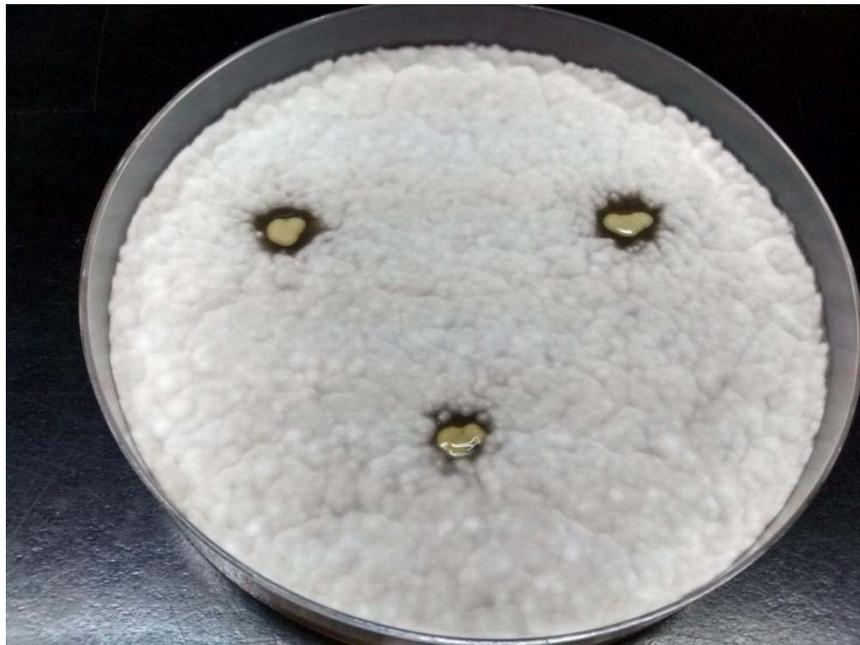


Foto 1. Confirmación de la actividad antifúngica de la cepa Lb-26/2 (*Lactobacillus brevis*) frente a *Penicillium nordicum*.

Tabla 2. Actividad antifúngica de BAL aisladas de leche de cabra, oveja y vaca frente a *Penicillium nordicum* (M32).

Actividad de BAL (57 cepas) frente a <i>P. nordicum</i>									
Tipo de leche	Muestras positivas n (%)	H	%	M	%	W	%	Total cepas	% cepas
Cabra (n=27)	12 (41)	8	24	13	57	0	0	21	37
Oveja (n=30)	6 (21)	4	12	2	9	0	0	6	11
Vaca (n=36)	11 (38)	22	65	8	35	0	0	30	53
Total (n=93)	29 (100)	34	100	23	100	0	0	57	100

H, alta (1-2,9 mm halo); M, media (3-7,9 mm halo); W, débil (8-16,1 mm halo). n, número de muestras de leche.

Solo 7 cepas presentaron actividad frente a *P. commune* (M35), nuevamente la mayoría fueron obtenidas de la leche de cabra (57%), seguidas de leche de vaca (29%) y leche de oveja (14%) (Fig. 4).

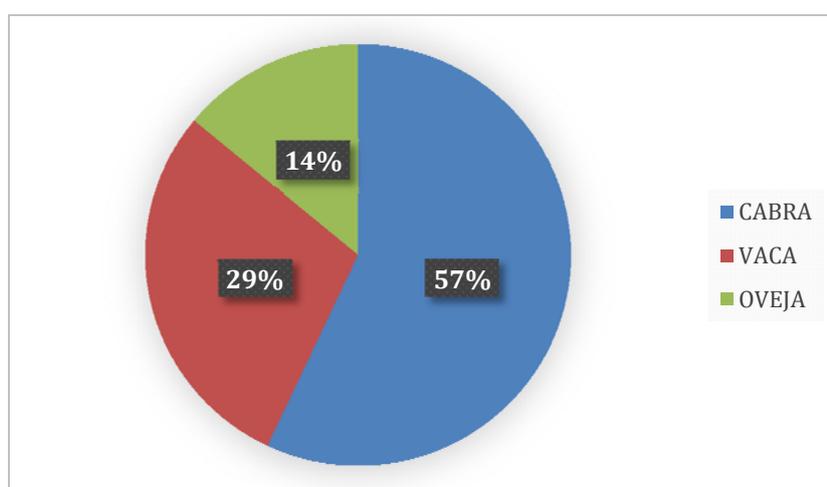


Figura 4. Procedencia (tipo de leche) de las cepas de BAL con actividad antifúngica frente a *P. commune* (porcentaje de muestras positivas).

Los mayores halos de inhibición los presentaban los procedentes de leche de cabra (2 de las 3 cepas tenían halos entre 8-16,1 mm 66,6%) (Tabla 3).

Tabla 3. Actividad antifúngica de BAL aisladas de leche de cabra, oveja y vaca frente a *Penicillium commune* (M35).

Actividad de BAL (7 cepas) frente a <i>P. commune</i>									
Tipo de leche	Muestras	H	%	M	%	W	%	Total	%
	positivas							cepas	cepas
	n (%)								
Cabra (n=27)	4 (57)	2	67	2	50	0	0	4	57
Oveja (n=30)	1 (14)	0	0	1	25	0	0	1	14
Vaca (n=36)	2 (29)	1	33	1	25	0	0	2	29
Total (n=93)	7 (100)	3	100	4	100	0	0	7	100

H, alta (1-2,9 mm halo); M, media (3- 7,9 mm halo); W, débil (8-16,1 mm halo). n, número de muestras de leche.

En la revisión bibliográfica realizada sobre publicaciones de los últimos 20 años se ha observado que hay pocos estudios que aborden el aislamiento de BAL con actividad antifúngica a partir de leche (Tabla 1). Delavenne *et al.* (2012) aisló la mayor parte de BAL de leche de vaca (49%) y de cabra (43%), mientras que solo el (8%) fueron aisladas de la leche de oveja pero frente a hongos distintos a los utilizados en este estudio (*Penicillium expansum*, *Mucor plumbeus*, *Kluyveromyces lactis* y *Pichia anomala*). Estos autores también detectaron actividad antifúngica de BAL aisladas de leche sobre *Penicillium brevicompactum* (Delavenne *et al.*, 2013). También se ha encontrado algún trabajo sobre el aislamiento de BAL activas frente a *P. commune* a partir de muestras de queso (Cheong *et al.*, 2014).

Un 50% (29 de las 57 cepas con capacidad antifúngica) fueron aisladas en invierno, seguidas de 19 cepas en primavera y 9 en verano (Fig. 5). También en invierno fueron aisladas la mayoría de las cepas con doble capacidad 5 de las 7 encontradas (Tabla 4 y Fig. 5). Este resultado contrasta con el encontrado por Delavenne *et al.* (2012) en Francia donde la mayoría de los aislados activos se obtuvieron en muestras tomadas en verano y otoño, lo que puede estar relacionado con las condiciones ambientales de cría y con la alimentación; los autores sugieren que el uso o no de ensilado puede suponer una variable importante en la presencia de BAL con actividad antifúngica (Delavenne *et al.*, 2012).

Tabla 4. Actividad antifúngica de BAL (57 cepas) aisladas de leche de cabra, oveja y vaca frente a *Penicillium nordicum* (M32), *Penicillium commune* (M35) y frente a ambas especies (D) en diferentes estaciones del año.

	Invierno					Primavera					Verano					Total		
	M32	%	M35	%	D	M32	%	M35	%	D	M32	%	M35	%	D	M32	M35	D
C	11	38	4	67	4	2	11	0	0	0	8	89	0	0	0	21	4	4
V	1	3	0	17	0	5	26	1	50	1	0	0	0	0	6	1	1	
O	17	59	1	17	1	12	63	1	50	1	1	11	0	0	30	2	2	
T	29	100	5	100	5	19	100	2	100	2	9	100	0	0	57	7	7	

D, doble capacidad antifúngica; C, cabra; V, vaca; O, oveja; T, total.

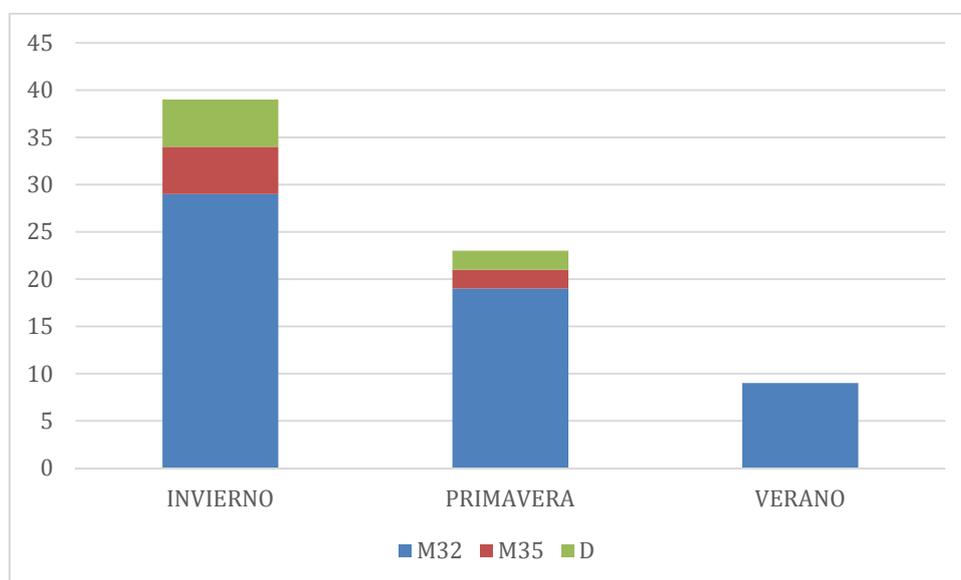


Fig. 5. Actividad antifúngica de BAL (57 cepas) aisladas de leche de cabra, oveja y vaca frente a *Penicillium nordicum* (M32), *Penicillium commune* (M35) y frente a ambas especies (D) en diferentes estaciones del año.

4.2. IDENTIFICACIÓN DE BAL

4.2.1. Secuenciación del ADNr 16S

Se obtuvieron las secuencias completas del ADNr 16S de las 34 cepas de BAL con elevada actividad antifúngica (halos entre 8-16,1 mm), 20 (58,82%) procedentes de leche de vaca, 10 (29,41%) de cabra y 4 (11,76%) de oveja. Todas se identificaron a nivel de especie con porcentajes de similitud superiores al 99%. Once (32,35%) de las

34 cepas se identificaron como *Lactobacillus casei* y se obtuvieron de leche de vaca (6 cepas), oveja (3 cepas) y cabra (2 cepas), 9 se adscribieron a *Lactobacillus paracasei* (4 de leche de vaca, 4 de leche de cabra y 1 de leche de oveja) y 5 a *Lactobacillus rhamnosus* (4 de leche de vaca y 1 de leche de cabra). El resto de las cepas identificadas pertenecieron a las especies *L. parabuchneri*, *L. plantarum*, *L. brevis*, *L. zaeae* y *L. fermentum* y se obtuvieron de leches de vaca (6 cepas) y cabra (3 cepas). Los resultados de la identificación molecular se muestran en la tabla 5, indicando la adscripción y el número y porcentaje de cepas asignadas a cada una de las especies.

Tabla 5. Especies de BAL con actividad antifúngica identificadas.

Especie	Número de cepas (%)	Procedencia
<i>Lactobacillus casei</i>	11 (32,35)	V (6), O (3), C (2)
<i>Lactobacillus paracasei</i>	9 (26,47)	V (4), O (1), C (4)
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	5 (14,71)	V (4), O (1)
<i>Lactobacillus parabuchneri</i>	2 (5,88)	V (1), C (1)
<i>Lactobacillus plantarum</i>	2 (5,88)	V (2)
<i>Lactobacillus brevis</i>	2 (5,88)	V (1), C (1)
<i>Lactobacillus zaeae</i>	2 (5,88)	V (2)
<i>Lactobacillus fermentum</i>	1 (2,94)	C (1)
Total	34 (100)	V (20), O (4), C (10)

V, vaca; O, oveja; C, cabra.

4.2.2. Características fenotípicas

4.2.2.1. Perfil de fermentación de azúcares

Con respecto a los perfiles de fermentación de azúcares (AP50CHL; Tabla 6), Lc-25/1 fue identificado como *Lactobacillus casei* y Lp-51/3 como *Lactobacillus paracasei*. De los 49 azúcares analizados en la galería, 21 reacciones fueron positivas para las dos cepas y 25 fueron negativas para ambas, detectándose solamente 3 reacciones diferentes entre las dos cepas: D-sacarosa, inulina y gentiobiosa, siendo positiva la cepa Lc-25/1 para los dos primeros y negativa para el tercero al contrario que en la cepa Lp-51/3 (negativa para D-sacarosa e inulina y positiva para gentiobiosa). Este resultado está en consonancia con la descripción de estas especies (Collins *et al.*, 1989).

La identificación fenotípica resultó concordante con la identificación molecular mediante secuenciación del ADNr 16S, lo que confirma totalmente la identidad de las cepas, frente a los resultados obtenidos por otros autores, donde la identificación molecular no coincidió con la obtenida mediante pruebas fenotípicas (Moreas *et al.*, 2013; Aymerich *et al.*, 2003; Velasco *et al.*, 2004; Gomes *et al.*, 2008).

Tabla 6. Perfiles de fermentación de bacterias ácido-lácticas (API50CHL).

	Carbohidrato	Cepas	
		Lc-25/1	Lp-51/3
0	Control	-	-
1	Glicerol	-	-
2	Eritritol	-	-
3	D-Arabinosa	-	-
4	L-Arabinosa	-	-
5	D-Ribosa	+	+
6	D-Xilosa	-	-
7	L-Xilosa	-	-
8	D-Adonitol	-	-
9	Metil-D-xilopiranosido	-	-
10	D-Galactosa	+	+
11	D-Glucosa	+	+
12	D-Fructosa	+	+

13	D-Manosa	+	+
14	L-Sorbosa	+	+
15	L-Ramnosa	-	-
16	Dulcitol	-	-
17	Inositol	-	-
18	D-Manitol	+	+
19	D-Sorbitol	+	+
20	Metil-D-manopiranosido	-	-
21	Metil-D-glucopiranosido	-	-
22	N-acetilglucosamina	+	+
23	Amigdalina	+	+
24	Arbutina	+	+
25	Esculina	+	+
26	Salicina	+	+
27	D-Celiobiosa	+	+
28	D-Maltosa	+	+
29	D-Lactosa	+	+
30	D-Melibiosa	-	-
31	D-Saccharosa	+	-

32	D-Trehalosa	+	+
33	Inulina	+	-
34	D-Melezitosa	+	+
35	D-Raffinosa	-	-
36	Almidón	-	-
37	Glucogeno	-	-
38	Xilitol	-	-
39	Gentiobiosa	-	+
40	D-Turanosa	+	+
41	D-Lixosa	-	-
42	D-Tagatosa	+	+
43	D-Fucosa	-	-
44	L-Fucosa	-	-
45	D-Arabitol	-	-
46	L-Arabitol	-	-
47	Potasio gluconato	+	+
48	2-Ceto-gluconato	-	-
49	5-Ceto-gluconato	-	-

+: Positivo, -: Negativo después de 48 horas de incubación a 30 °C.

4.2.2.2. Perfil enzimático

De las 19 actividades enzimáticas analizadas 10 fueron negativas para las dos cepas y 7 fueron positivas para ambas. Las dos cepas presentaron por tanto perfiles enzimáticos muy parecidos, las únicas diferencias encontradas fueron en dos aspectos la presencia de Cistina arilamidasa en Lc-25/1 y presencia de Esterasa (C4) en Lp-51/3 (Tabla 7).

Tabla 7. Perfiles enzimáticos de bacterias ácido-lácticas.

	Enzimas	Cepas	
		Lc-25/1	Lp-51/3
0	Control	-	-
1	Fosfatasa alcalina	-	-
2	Esterasa (C 4)	-	+
3	Esterasa Lipasa (C 8)	+	+
4	Lipasa (C 14)	-	-
5	Leucina arilamidasa	+	+
6	Valina arilamidasa	+	+
7	Cistina arilamidasa	+	-
8	Tripsina	-	-
9	a-quimiotripsina	-	-
10	Fosfatasa ácida	+	+
11	Naftol-AS-BI-fosfosfohidrolasa	+	+

	Enzimas	Cepas	
		Lc-25/1	Lp-51/3
12	a-galactosidasa	-	-
13	b-galactosidasa	+	+
14	b-glucuronidasa	-	-
15	a-glucosidasa	+	+
16	b-glucosidasa	-	-
17	N-acetil-b-glucosaminidasa	-	-
18	a-manosidasa	-	-
19	a-fucosidasa	-	-

+: Positivo, -: Negativo después de 4 horas y media de incubación a 37 °C.

La presencia de enzimas como Naftol-AS-BI-fosfatohidrolasa y esterasa lipasa es de interés para la producción de quesos entre otros alimentos debido a su acción en la fracción lipídica y los productos primarios de su degradación, por ejemplo, ácidos grasos volátiles, libres o ésteres, resultando en características sensoriales deseadas en algunos productos (Oliszewski *et al.*, 2007). Las enzimas con capacidad de degradación de azúcares como b-galactosidasa y a-glucosidasa son interesantes para la acidificación de productos lácteos como yogures y quesos. Perfiles enzimáticos de *Lactobacillus casei* parecidos a lo de este estudio fueron encontrados por Charteris *et al.* (2001) y Lee *et al.* (1986).

4.3. ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA FRENTE A DIVERSAS CEPAS DE *PENICILLIUM* ALTERANTES Y TOXIGÉNICAS

Frente a las 4 cepas de *Penicillium commune*, las cepas de *L. casei*, *L. rhamnosus*, *L. parabuchneri*, *L. brevis* y *L. plantarum* presentaron las mayores

capacidades de inhibición, desde 50 hasta 100% (Tabla 8 y Fig. 6). Las cepas de *L. paracasei* presentaron resultados más bajos, entre 11% y máximo de 33% y la cepa de *L. fermentum* no fue antagonista a ninguna de las cepas de probadas. Frente a *Penicillium verrucosum* las cepas de *L. casei*, *L. paracasei*, *L. rhamnosus*, *L. parabuchneri*, *L. brevis* fueron las que presentaron inhibición con un porcentaje mínimo de 45% y máximo de 89%. Las cepas de *L. zaeae*, *L. plantarum* y *L. fermentum* no presentaron capacidad antagonista frente a esta especie de *Penicillium* (Tabla 8 y Fig. 6).

Tabla 8. Actividad antifúngica de las bacterias ácido lácticas identificadas (34 cepas) frente a *P. commune* (M57, M145, P3, MP82) y *P. verrucosum* (MP88).

	Especie de moho				
	<i>P. commune</i>	<i>P. commune</i>	<i>P. commune</i>	<i>P. commune</i>	<i>P. verrucosum</i>
Cepa	M57	M145	P3	MP82*	MP88*
Nº de cepas antagonistas Total = 34	n=22	n=21	n=21	n=23	n=18
<i>Lactobacillus casei</i> (11)	9 (82%)	8 (73%)	7 (64%)	7 (64%)	5 (45%)
<i>Lactobacillus paracasei</i> (9)	2 (22%)	1 (11%)	2 (22%)	3 (33%)	8 (89%)
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> (5)	5 (100%)	5 (100%)	5 (100%)	5 (100%)	3 (60%)
<i>Lactobacillus zaeae</i> (2)	2 (100%)	2 (100%)	2 (100%)	2 (100%)	0 (0%)
<i>Lactobacillus parabuchneri</i> (2)	1 (100%)	1 (50%)	1 (50%)	2 (100%)	1 (50%)
<i>Lactobacillus brevis</i> (2)	1 (50%)	2 (100%)	2 (100%)	2 (100%)	1 (50%)
<i>Lactobacillus plantarum</i> (2)	2 (100%)	2 (100%)	2 (100%)	2 (100%)	0 (0%)
<i>Lactobacillus fermentum</i> (1)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)

n, número total de cepas antagonistas por cepa de hongo analizada.*Cepas de colección.

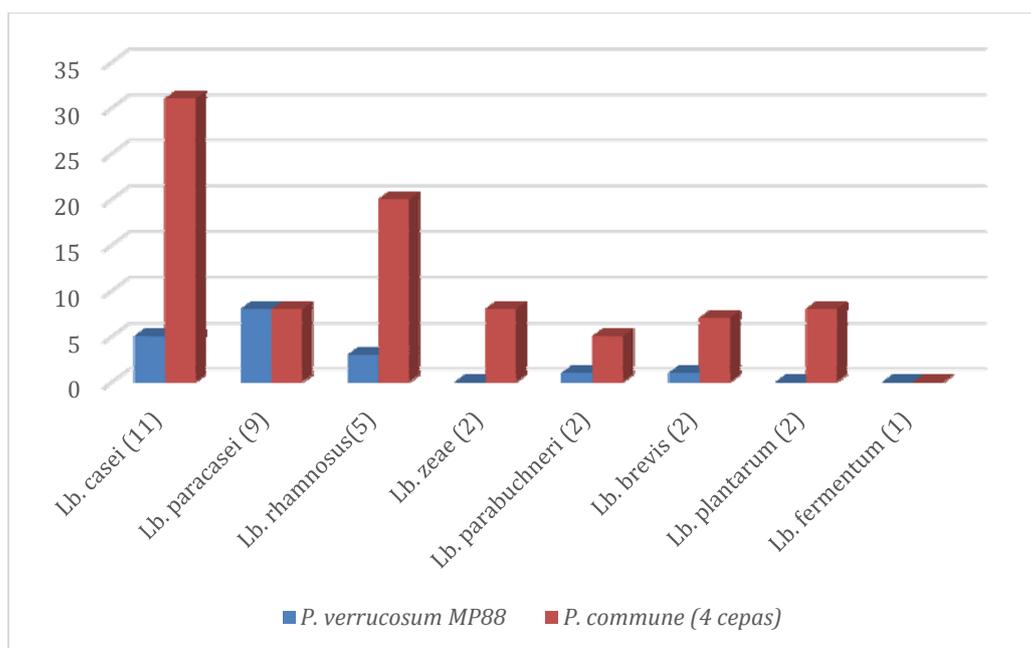


Figura 6. Actividad antifúngica de las bacterias ácido lácticas identificadas (34 cepas) frente a *P. commune* (4 cepas) y *P. verrucosum* (MP88).

Respecto a la cuantificación del efecto antagonista, las tablas 9 y 10 muestran el efecto de las dos BAL seleccionadas en base a los resultados anteriores (Lp-25/1 de la especie *Lactobacillus paracasei* y Lc-51/3 de *Lactobacillus casei*) frente a *P. commune* M35 y *P. nordicum* M32, respectivamente.

Tabla 9. Efecto de las dos BAL seleccionadas en base a los resultados hallados (Lp-25/1 de la especie *Lactobacillus paracasei* y Lc-51/3 de *Lactobacillus casei*) frente a *P. commune* M35.

Muestra (cepa <i>P. commune</i>)	ID	CPA $\mu\text{g/mL}$ Media \pm SD	Reducción %	Micelio seco Media \pm SD	Reducción %
M35	<i>Penicillium commune</i>	957,81 \pm 76,16	-	0,29 \pm 0,04	-
25/1 + M35	<i>L. paracasei</i>	594,82 \pm 8,39	37,90	0,21 \pm 0,02	29,40
51/3 + M35	<i>L. casei</i>	569,54 \pm 205,48	40,54	0,24 \pm 0,02	18,11

Se observa un efecto antagonista de ambas cepas de BAL en el crecimiento de *P. commune*, especialmente de *L. paracasei* (cercana al 30%) que es inferior al efecto en la producción de CPA (37,9%). En el caso de *L. casei*, la diferencia es aún mayor (reducción de 18,11% en el crecimiento frente a 40,54% en la producción de CPA).

Esto indica un efecto superior en la reducción de la capacidad micotoxigénica que en la reducción del crecimiento del micelio.

Tabla 10. Efecto de las dos BAL seleccionadas en base a los resultados hallados (Lp-25/1 de la especie *Lactobacillus paracasei* y Lc-51/3 de *Lactobacillus casei*) frente a *P. nordicum* M32.

Muestra (cepa <i>P. nordicum</i>)	ID	OTA µg/mL Media±SD	Reducción %	Micelio seco Media±SD	Reducción %
M32	<i>Penicillium nordicum</i>	3508,40±197,49	-	0,15±0,00	-
25/1 + M32	<i>L. paracasei</i>	403,17±128,20	88,51	0,02±0,01	87,24
51/3 + M32	<i>L. casei</i>	1893,30±592,21	46,04	0,09±0,01	41,15

En el caso de *P. nordicum*, de nuevo se halló un efecto reductor del crecimiento de las colonias por parte de ambas BAL pero más acentuado que frente a *P. commune*. La reducción fue cercana al 90% para *L. paracasei* y al 40% para *L. casei*. En este caso, la reducción en la producción de OTA fue de un nivel similar a la reducción en el peso del micelio seco 88,5% y 46,04%, respectivamente. Analizando ambos estudios se observa una mayor capacidad antagonista de *L. paracasei* comparado con *L. casei* frente a ambas especies de *Penicillium*.

Como se ha descrito anteriormente, dentro de las 34 cepas consideradas como de alta actividad antifúngica, la especie más común en este estudio fue *L. casei* (11 cepas), *L. paracasei* fue la segunda más aislada (9 cepas) y la tercera fue *L. rhamnosus* (5 cepas) (Tabla 8). En otros estudios también encontraron *Lactobacillus casei* con capacidad antifúngica, pero frente a otras especies de mohos distintas a las utilizadas en este trabajo, como *Penicillium citrinum*, *Penicillium expansum*, *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium* sp., *Aspergillus brassicicola*, *Aspergillus alternata*, *Aspergillus niger*, *Fusarium Lateritium*, *Geotrichum candidum* y *Mucor hiemalis* (Gourama, 1997; Li *et al.*, 2012; Lipińska *et al.*, 2016). Solamente 2 estudios encontraron *Lactobacillus casei* frente a *Penicillium commune* (Cabo *et al.*, 2002; Salas *et al.*, 2018). En cuanto a *Lactobacillus paracasei*, hay varios trabajos en los que detectaron actividad antifúngica frente a mohos: *Penicillium candidum*, *Debaryomyces hansenii*, *Penicillium expansum*, *Mucor plumbeus*, *Kluyveromyces lactis*, *Pichia anomala*, *Penicillium brevicompactum*, *Penicillium* sp. y *Penicillium solitum* (Voulgari

et al., 2010; Delavenne *et al.*, 2012; Delavenne *et al.*, 2013; Aunbjerg *et al.*, 2015). Por último, también hay trabajos con *L. rhamnosus* que presentó actividad frente a *Aspergillus flavus*, *Penicillium brevicompactum* y *Penicillium chrysogenum* (Gerbaldo *et al.*, 2012; Delavenne *et al.*, 2013; Fernández *et al.*, 2017) y en uno de ellos Schillinger y Villarreal (2010) utilizaron *L. rhamnosus* frente a *Penicillium nordicum*, especie también utilizada en nuestro trabajo.

5. CONCLUSIONES

Se puede concluir con este estudio, que las leches de cabra y vaca son una importante fuente de *Lactobacillus* con capacidad antifúngica, superior a la leche de oveja. La mayor parte de los aislados se detectan en los meses de invierno y presentan mayor actividad frente a la cepa de *Penicillium nordicum*. Las especies de BAL más identificadas fueron: *L. casei*, *L. paracasei* y *L. rhamnosus*. Con relación a amplitud de la capacidad antifúngica las especies que presentaron mejores resultados fueron *L. casei*, *L. rhamnosus*, *L. parabuchneri*, *L. brevis* y *L. plantarum*, mientras que *L. fermentum* no mostró ningún tipo de actividad frente a las cepas de mohos utilizadas.

Al cuantificar el efecto antagonista en el crecimiento y producción de micotoxinas de dos cepas de BAL seleccionadas, se ha hallado un efecto sobre *P. commune* y *P. nordicum* especialmente frente a este último. Por otra parte, se ha observado un efecto sobre la producción de CPA por *P. commune* más allá de la reducción en el crecimiento.

Las cepas de BAL identificadas y caracterizadas en este trabajo, especialmente la cepa *L. paracasei* 25/1, pueden ser de utilidad tecnológica en la fabricación de productos lácteos, tanto por sus capacidades fermentadoras y enzimáticas como por la posibilidad de inhibir el crecimiento de algunas especies de *Penicillium* importantes en la alteración de los productos lácteos.

6. REFERENCIAS

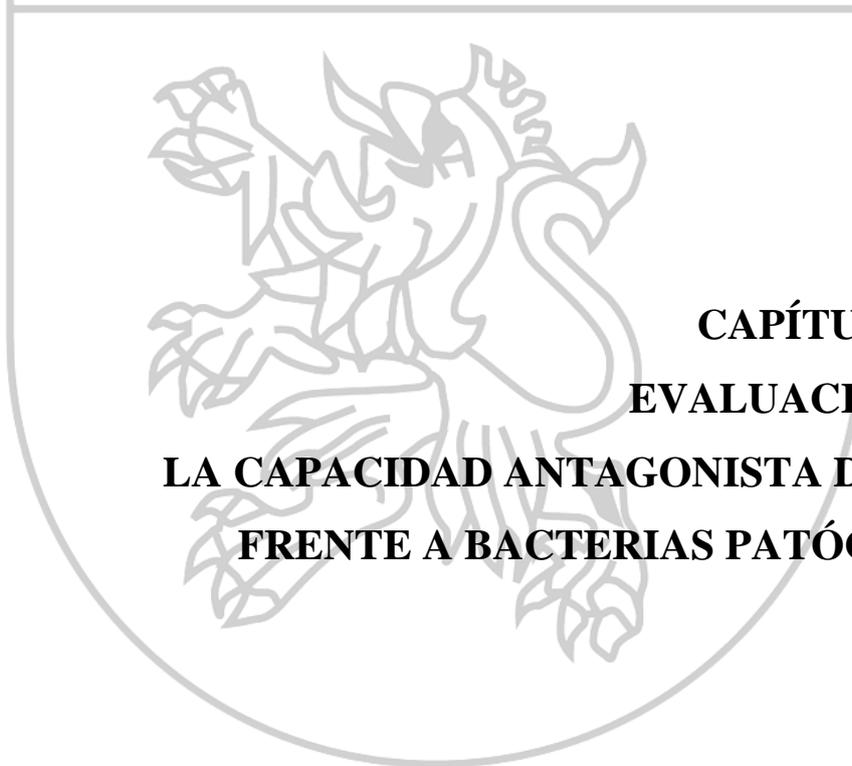
- Adedokun, E.O. *et al.*, 2016. Biocontrol efficacy of *Lactobacillus fermentum* YML014 against food spoilage moulds using the tomato puree model. *Frontiers in Life Science*, 91, pp. 64-68.
- Ahmad Rather, I. *et al.*, 2013. Isolation and characterization of a proteinaceous antifungal compound from *Lactobacillus plantarum* YML007 and its application as a food preservative. *Letters in Applied Microbiology*, 57, pp. 69-76.
- Alexandre, D.P. *et al.*, 2002. Atividade antimicrobiana de bactérias lácticas isoladas de queijo-de-minas artesanal do Serro (MG) frente a microrganismos indicadores. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 54, pp. 424-428.
- Aunbjerg, S.D. *et al.*, 2015. Contribution of volatiles to the antifungal effect of *Lactobacillus paracasei* in defined medium and yogurt. *International Journal of Food Microbiology*, 194, pp.46–53.
- Aymerich, T. *et al.*, 2003. Microbial quality and direct PCR identification of lactic acid bacteria and nonpathogenic staphylococci from artisanal low-acid sausages. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, pp. 4583-4594
- Batish, V.K., Grover, S. & Lal, R., 1989. Screening lactic starter cultures for antifungal activity. *Cultured Dairy Products Journal*, 24, pp.21–25.
- Biase, M. Di *et al.*, 2014. *Lactobacillus brevis*-based bioingredient inhibits *Aspergillus niger* growth on pan bread, *Italian Journal of Agronomy*, 2014, pp. 146-151
- Brul, S. & Coote, P., 1999. Preservative agents in foods: Mode of action and microbial resistance mechanisms. *International Journal of Food Microbiology*, 50, pp. 1-17.
- Cabo, M.L., Braber, A.F. & Koenraad, P.M.F.J., 2002. Apparent Antifungal Activity of Several Lactic Acid Bacteria against *Penicillium discolor* Is Due to Acetic Acid in the Medium. *Journal of Food Protection*, 65, pp. 1309-1316.
- Caridi, A. *et al.*, 2003. Ripening and seasonal changes in microbial groups and in physico-chemical properties of the ewes' cheese Pecorino del Poro. *International Dairy Journal*, 13, pp. 191-200.
- Carr, F.J. *et al.*, 2002. Critical Reviews in Microbiology The Lactic Acid Bacteria : A Literature Survey. *Critical Reviews in Microbiology*, 28(731775937), pp.281–370.
- Charteris, W.P. *et al.*, 2001. Quality control *Lactobacillus* strains for use with the API 50CH and API ZYM systems at 37°C. *Journal of Basic Microbiology*, 41(5), pp.241–251.
- Cheong, E.Y.L. *et al.*, 2014. Isolation of lactic acid bacteria with antifungal activity against the common cheese spoilage mould *Penicillium commune* and their potential as biopreservatives in cheese. *Food Control*, 46, pp.91–97.
- Chioda, T.P. *et al.*, 2007. Inibição do crescimento de *Escherichia coli* isolada de Queijo “Minas Frescal” por *Lactobacillus acidophilus*. *Ciência Rural*, 37, pp.583-585.

- Chioda, T.P. *et al.*, 2006. Inibição do crescimento de *Listeria monocytogenes* em queijo Minas Frescal elaborado com cultura de *Lactobacillus acidophilus*. Revista portuguesa de ciencias veterinárias, 101, pp.121-124.
- Crowley, S., Mahony, J. & Van Sinderen, D., 2013. Current perspectives on antifungal lactic acid bacteria as natural bio-preservatives. Trends in Food Science and Technology, 33(2), pp.93–109.
- Dalie, D.K.D., Deschamps, A.M. & Richard-Forget, F., 2010. Lactic acid bacteria - Potential for control of mould growth and mycotoxins: A review. Food Control, 21(4), pp.370–380.
- De Garnica, M.L. *et al.*, 2014. Diversity of gram-positive catalase-negative cocci in sheep bulk tank milk by comparative 16S rDNA sequence analysis. International Dairy Journal, 34(1), pp.142–145.
- Delavenne, E. *et al.*, 2013. Assessment of lactobacilli strains as yogurt bioprotective cultures. Food Control, 30(1), pp.206–213.
- Delavenne, E. *et al.*, 2012. Biodiversity of antifungal lactic acid bacteria isolated from raw milk samples from cow, ewe and goat over one-year period. International Journal of Food Microbiology, 155(3), pp.185–190.
- Essia Ngang, J.J. *et al.*, 2015. Antifungal properties of selected lactic acid bacteria and application in the biological control of ochratoxin A producing fungi during cocoa fermentation. Biocontrol Science and Technology, 25(3), pp.245–259.
- Fernandez, B. *et al.*, 2017. Antifungal activity of lactic and propionic acid bacteria and their potential as protective culture in cottage cheese. Food Control, 78, pp.350–356.
- Frisvad, J.C., Andersen, B. & Samson, R.A., 2007. Association of moulds to foods. In Food mycology - a multifaceted approach to fungi and food. Lyngby, Denmark, pp. 199–239.
- Gamba, R.R. *et al.*, 2016. Antifungal effect of kefir fermented milk and shelf life improvement of corn arepas. International Journal of Food Microbiology, 235, pp. 85-92.
- Gerbardo, G.A. *et al.*, 2012. Antifungal activity of two *Lactobacillus* strains with potential probiotic properties. FEMS Microbiology Letters, 332(1), pp.27–33.
- Gomes, B.C. *et al.*, 2008. Prevalence and characterization of *Enterococcus* spp. isolated from Brazilian foods. Food Microbiology, 25, pp. 668-675.
- Gourama, H. & Bullerman, L.B., 1997. Anti-aflatoxic activity of *Lactobacillus casei pseudoplantarum*. International Journal of Food Microbiology, 34(2), pp.131–143.
- Gourama, H. & Bullerman, L.B., 1995. Antimycotic and Antiaflatoxic Effect of Lactic Acid Bacteria: A Review. Journal of Food Protection, 57(11), pp.1275–1280.

- Gqaleni, N. *et al.*, 1996. The production of cyclopiazonic acid by *Penicillium commune* and cyclopiazonic acid and aflatoxins by *Aspergillus flavus* as affected by water activity and temperature on maize grains. *Mycopathologia*, 136(2), pp.103–108.
- Gupta, R. *et al.*, 2014. Isolation and characterization of a proteinaceous antifungal compound from *Lactobacillus plantarum* YML007 and its application as a food preservative. *Food Microbiology*, 21(1), pp.1–7.
- Holzappel, W.H. & Wood, B.J.B., 2009. Introduction to the LAB. In *Food quality and standards- Volume III*. pp. 1–9.
- Jay, J.M., 2005. *Microbiología de Alimentos* 6ª Editorial Acribia, Zaragoza.
- Le Lay, C. *et al.*, 2016. Identification and quantification of antifungal compounds produced by lactic acid bacteria and propionibacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 239, pp.79–85.
- Lee, B.H., Haché, S. & Simard, R.E., 1986. A rapid method for differentiation of dairy lactic acid bacteria by enzyme systems. *Journal of Industrial Microbiology*, 1(4), pp.209–217.
- Li, H. *et al.*, 2012. Identification of antifungal compounds produced by *Lactobacillus casei* AST18. *Current Microbiology*, 65(2), pp.156–161.
- Lindgren, S.E. & Dobrogosz, W.J., 1990. Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. *FEMS Microbiology Letters*, 87, pp.149–164.
- Lipińska, L. *et al.*, 2016. Antifungal activity of *Lactobacillus* sp. Bacteria in the presence of xylitol and galactosyl-xylitol. *BioMed Research International*, 2016.
- Lund, F., 1995. Differentiating *Penicillium* species by detection of indole metabolites using a filter paper method. *Letters in Applied Microbiology*, 20(4), pp.228–231.
- Magnusson, J. *et al.*, 2003. Broad and complex antifungal activity among environmental isolates of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 219(1), pp.129–135.
- Magnusson, J. & Schnürer, J., 2001. *Lactobacillus coryniformis* subsp. *coryniformis* strain Si3 produces a broad-spectrum proteinaceous antifungal compound. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(1), pp.1–5.
- Moraes, P.M. *et al.*, 2013. Comparison of phenotypic and molecular tests to identify lactic acid bacteria. *Brazilian Journal of Microbiology*, 44, pp. 109-112.
- Nero, L.A. *et al.*, 2009. Interference of raw milk autochthonous microbiota on the performance of conventional methodologies for *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. detection. *Microbiological Research*, 164(5), pp.529–535.
- Nero, L.A. *et al.*, 2008. *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. in raw milk produced in Brazil: Occurrence and interference of indigenous microbiota in their isolation and development. *Zoonoses and Public Health*, 55, pp. 299-305.
- Neto, L.G.G. *et al.*, 2005. Atividade antimicrobiana de bactérias ácido-lácticas isoladas de queijos de coalho artesanal e industrial frente a microrganismos indicadores.

- Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia, 57(SUPPL. 2), pp.245–250.
- Oliszewski, R. *et al.*, 2007. Esterase activities of indigenous lactic acid bacteria from Argentinean goats' milk and cheeses. *Food Chemistry*, 101(4), pp.1446–1450.
- Peyer, L.C. *et al.*, 2017. *Lactobacillus brevis* R2Δ as starter culture to improve biological and technological qualities of barley malt. *European Food Research and Technology*, 243(8), pp.1363–1374.
- Peyer, L.C., Zannini, E. & Arendt, E.K., 2016. Lactic acid bacteria as sensory biomodulators for fermented cereal-based beverages. *Trends in Food Science and Technology*, 54, pp.17–25.
- Roy, U. *et al.*, 1996. Production of antifungal substance by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CHD-28.3. *International Journal of Food Microbiology*, 32, pp. 27-34.
- Russo, P. *et al.*, 2017. *Lactobacillus plantarum* with broad antifungal activity: A promising approach to increase safety and shelf-life of cereal-based products. *International Journal of Food Microbiology*, 247, pp. 48-54
- Ryu, E.H. *et al.*, 2014. Purification and characterization of antifungal compounds from *Lactobacillus plantarum* HD1 isolated from kimchi. *Food Microbiology*, 41, pp. 19-26.
- Saladino, F. *et al.*, 2016. In vitro antifungal activity of lactic acid bacteria against mycotoxigenic fungi and their application in loaf bread shelf life improvement. *Food Control*, 67, pp. 273-277.
- Salas, M.L. *et al.*, 2018. Antifungal activity of lactic acid bacteria combinations in dairy mimicking models and their potential as bioprotective cultures in pilot scale applications. *Frontiers in Microbiology*, 9, pp. 1787.
- Schillinger, U. & Villarreal, J.V., 2010. Inhibition of *Penicillium nordicum* in MRS medium by lactic acid bacteria isolated from foods. *Food Control*, 21(2), pp.107–111.
- Stiles, M.E., 1996. Biopreservation by lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 70(2–4), pp.331–345.
- Tamanini, R. *et al.*, 2012. Antagonistic activity against *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* from lactic acid bacteria isolated from raw milk. *Semina: Ciências Agrárias*, 33(5), pp.1877–1886.
- Taniwaki, M. *et al.*, 2006. Comparison of hyphal length, ergosterol, mycelium dry weight, and colony diameter for quantifying growth of fungi from foods. *Advances in experimental medicine and biology*, 571, pp.49–67.
- Tropcheva, R. *et al.*, 2014. Antifungal activity and identification of *Lactobacilli*, isolated from traditional dairy product “katak.” *Anaerobe*, 28, pp.78–84.

- Velasco, D. *et al.*, 2004. Lack of correlation between phenotypic techniques and PCR-based genotypic methods for identification of *Enterococcus* spp. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 49, pp. 151-156.
- Viljoen, B.C., 2001. The interaction between yeasts and bacteria in dairy environments. *International Journal of Food Microbiology*, 69, pp. 37-44
- Voulgari, K. *et al.*, 2010. Antifungal activity of non-starter lactic acid bacteria isolates from dairy products. *Food Control*, 21(2), pp.136–142.
- Wang, H.K. *et al.*, 2012. Production and characterization of antifungal compounds produced by *Lactobacillus plantarum* IMAU10014. *PLoS ONE*, 7, pp. e29452.
- Zhang, N. *et al.*, 2016. Characteristics and Application in Food Preservatives of *Lactobacillus plantarum* TK9 Isolated from Naturally Fermented Congee. *International Journal of Food Engineering*, 12, pp. 377-384.



**CAPÍTULO IV.
EVALUACIÓN DE
LA CAPACIDAD ANTAGONISTA DE BAL
FRENTE A BACTERIAS PATÓGENAS**

1. INTRODUCCIÓN

La leche es un alimento rico nutricionalmente y eso hace posible el crecimiento de numerosos microorganismos, incluidos algunos patógenos (Oliveira, 2008). La EFSA (European Food Safety Authority) considera *Listeria monocytogenes*, *Salmonella*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* como algunos de los microorganismos patógenos que pueden ser transmitidos por la leche, además de otros como *Campylobacter* spp., *Bacillus cereus*, *Brucella abortus*, *Brucella melitensis*, *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium bovis*, *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Corynebacterium* spp., *Streptococcus suis* subsp. *zooepidemicus*, los parásitos *Toxoplasma gondii* y *Cryptosporidium* (EFSA, 2015).

Listeria spp. es un cocobacilo Gram positivo, no esporulado, anaerobio facultativo y de amplia distribución ambiental (se puede aislar, por ejemplo, de aguas superficiales, de alcantarillas domésticas, aguas residuales de industrias alimentarias de origen animal, de suelos y de ensilados). Es un importante patógeno de transmisión alimentario, ya que la presencia de este microorganismo en los alimentos puede causar en los consumidores listeriosis, enfermedad caracterizada por cuadros de gastroenteritis y en, casos más graves, septicemia, meningitis y meningoencefalitis. Los brotes de listeriosis, aunque relativamente raros, tienen elevadas tasas de mortalidad, sobre todo en algunos grupos de riesgo (ancianos, neonatos, embarazadas e inmunodeprimidos) (Borges *et al.*, 2009). Este conjunto de características hace que *Listeria monocytogenes* sea un patógeno de gran interés en microbiología de alimentos y explica el lugar destacado que esta especie vienen ocupando en los últimos años en el control microbiológico en la industria de alimentos. En 2017, en la Unión Europea (UE) fueron notificados 10 brotes de listeriosis con 39 casos de los que 22 requirieron hospitalización y hubo dos fallecidos; además se notificaron 2.480 casos humanos confirmados de listeriosis, con una tasa de 0,48 casos por 100.000 habitantes, que se situó en el mismo nivel que en 2016 (EFSA, ECDC, 2018). La mayoría de los brotes reportados dentro de la UE ha involucrado alimentos procesados, refrigerados, listos para comer, incluidos algunos productos vegetales, productos de origen animal, tales como productos cárnicos, salmón ahumado y quesos tiernos (Swaminatha y Gerner-Smidt, 2007).

Las toxiinfecciones alimentarias causadas por *Salmonella* spp. a menudo se asocian a la ingestión de carnes, aves, huevos, leche y derivados sin tratamiento térmico. Las enfermedades transmitidas por alimentos contaminados con este patógeno

son consideradas uno de los más importantes problemas de salud pública, tanto en los países en desarrollo como en los países desarrollados (Jakabi *et al.*, 1999). La taxonomía actual del género *Salmonella* se basa en características bioquímicas, antigénicas (antígenos somáticos, flagelares y de cápsula) y en técnicas moleculares de análisis genético, que divide el género en dos especies denominadas *Salmonella enterica* y *Salmonella bongori*, con numerosos serogrupos que reciben denominaciones particulares (Libby *et al.*, 1994, <http://www.bacterio.net/-salmonellanom.html>). La importancia de este microorganismo para la salud pública reside en su habilidad para causar desde una simple gastroenteritis autolimitante hasta, en casos más extremos, la fiebre tifoidea causada por el serotipo *Salmonella* Typhi (Bibek, 2005). Es un bacilo Gram negativo, móvil y no formador de esporas, que puede permanecer viable por largos períodos en alimentos, incluso en los congelados, haciendo su control de gran importancia en el ambiente industrial. En la UE en 2017 fueron 91.662 casos los casos confirmados de salmonelosis humana, un ligero descenso de 2,9% en comparación con el año de 2016; además fue el principal agente de brotes de enfermedad de transmisión alimentaria, con 1.241 brotes, con más de 9.500 afectados, 2.227 hospitalizados y 11 fallecidos (EFSA, ECDC, 2018).

De 2008 a 2011 *Staphylococcus aureus* fue en agente causal de 91 (3,9%) de los 2.342 brotes de transmisión alimentaria en España (Espinosa *et al.*, 2014). El género *Staphylococcus* pertenece a la familia *Staphylococcaceae*, son cocos Gram positivos, inmóviles, no encapsulados y no esporulados. Son fermentadores de manitol y producen las enzimas coagulasa, termonucleasa y hemolisina. Su importancia está en la habilidad de producir enterotoxinas estables a los tratamientos térmicos (Mhone *et al.*, 2011). Así, incluso aunque el microorganismo sea destruido por los tratamientos térmicos como la pasteurización, sus toxinas pueden permanecer activas en los alimentos. Además, es el principal agente de la mastitis bovina y también la causa más frecuente de mastitis en cabras (Bibek, 2005; Mhone *et al.*, 2011). La presencia de altos recuentos de *Staphylococcus aureus*, además de indicar condiciones de preparación y manipulación del alimento inadecuadas, alerta de la posible presencia de toxinas (Mhone *et al.*, 2011).

Se considera que el mejor indicador de contaminación de origen fecal para agua y alimentos es *Escherichia coli*, una bacteria Gram negativa en forma de bacilo y anaerobia facultativa (Jay, 1995). Su hábitat primario es el tracto gastrointestinal de humanos y otros animales endotérmicos. Las cepas enteropatógenas (EPEC) pueden causar diarrea y vómitos en niños y las cepas productoras de toxina Shiga (STEC),

particularmente las enterohemorrágicas, como *E. coli* O157:H7, pueden causar síndrome urémico hemolítico (Jay, 1995; Mhone *et al.*, 2011). En 2017 se notificaron 37 brotes (con dos fallecidos) y 6.073 casos confirmados de infecciones por *Escherichia coli* (STEC) en la UE. La tasa de notificación de la UE fue de 1.66 casos por 100.000 habitantes (EFSA, ECDC, 2018).

En los países más desarrollados la producción de leche sigue unas estrictas prácticas higiénicas, pero así y todo es común la detección de estas bacterias patógenas (De Buyser *et al.*, 2001). Sin embargo, se ha observado que cuando la leche presenta baja calidad higiénica, el aislamiento de patógenos tiende a ser menor (Nero *et al.*, 2008; Jay, 1995). Esta paradoja sugiere que la microbiota autóctona de la leche cruda puede determinar alguna interferencia en el desarrollo de patógenos, principalmente cuando está presente en altas concentraciones (Nero *et al.*, 2008). Las bacterias del ácido láctico, pertenecientes a esta microbiota autóctona, son consideradas como una de las principales responsables de estas interacciones (Nero *et al.*, 2008) y varios estudios han comprobado su capacidad antagonista frente a patógenos bacterianos (Herrerros *et al.*, 2005; Cocolin *et al.*, 2007; Martín y Platero *et al.*, 2009; Asteri *et al.*, 2010).

En los últimos años, los consumidores demandan alimentos naturales sin conservantes químicos que encajen en un estilo de vida saludable. En este sentido, la conservación biológica se refiere al uso de microorganismos y/o sus metabolitos para el aumento de la vida útil y la mayor seguridad de los alimentos (Ross, Morgan y Hill, 2002).

Las bacterias del ácido láctico (BAL) desempeñan un papel clave en las fermentaciones de alimentos, pues no solo contribuyen al desarrollo de las propiedades sensoriales deseadas en el producto final, sino también a su seguridad microbiológica (Smaoui *et al.*, 2010). Diversos estudios han sugerido que la actividad inhibitoria de BAL frente a los microorganismos puede resultar de la producción de metabolitos tales como ácidos orgánicos (en particular, láctico, propiónico y acético), dióxido de carbono, etanol, peróxido de hidrógeno, diacetilo y otros metabolitos de pequeño peso molecular, producción de compuestos proteicos o péptidos de bajo peso molecular, crecimiento competitivo disminución del pH causado por la producción de ácido o una combinación de estos factores (Bianchini y Bullerman, 2010).

Las bacteriocinas constituyen un grupo heterogéneo de péptidos o proteínas de síntesis ribosomal que presentan una gran variedad de características físico-químicas y espectros de acción antimicrobiana reducidos o amplios frente a bacterias Gram

positivas (Cintas *et al.*, 2001). Según Tagg *et al.* (1976) las bacteriocinas son bactericidas contra bacterias estrechamente relacionadas, esto es, concentran su efecto frente a otras BAL, pero hoy ya se sabe que el efecto de la actividad bactericida está más allá de las especies que están estrechamente relacionadas o confinadas dentro del mismo nicho ecológico que el productor de la bacteriocina (Klaenhammer, 1993; Jack *et al.*, 1995).

Teniendo en cuenta estos antecedentes, la presente investigación se centra en estudiar el efecto antagonista de dos cepas de *Lactobacillus* que han demostrado capacidad antifúngica anteriormente, frente a cepas de bacterias patógenas de las especies mencionadas, que pueden estar presentes en la leche y los productos lácteos, lo que aumentaría el interés de estas cepas de *Lactobacillus* como cultivos lácticos para la fabricación de quesos en función de su doble actividad.

2. OBJETIVOS

El objetivo de este estudio fue analizar la capacidad antagonista de 2 cepas de *Lactobacillus*, seleccionadas en los experimentos anteriores, en función de su actividad antifúngica, frente a cepas seleccionadas de bacterias pertenecientes a especies patógenas que se pueden transmitir por la leche y los productos lácteos e identificar la naturaleza de la actividad antagonista.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. CEPAS DE BAL UTILIZADAS

A partir de los resultados obtenidos en el Capítulo III, se habían seleccionado 2 cepas de BAL por presentar mayor actividad antifúngica; concretamente las cepas Lp-25/1 de la especie *Lactobacillus paracasei* y Lc-51/3 de *Lactobacillus casei*.

3.2. CEPAS DE ESPECIES PATÓGENAS UTILIZADAS

Las cepas de especies patógenas utilizadas fueron: *Escherichia coli* CECT 4972, *Salmonella enterica* CECT 4156, *Staphylococcus aureus* CECT 5190 y una cepa de *Listeria monocytogenes* de la colección del Departamento de Higiene y Tecnología de los Alimentos de la U. de León. Para la preparación de los cultivos a partir de caldos mantenidos a congelación, se incubaron en caldo BHI (Caldo Infusión Cerebro Corazón, OXOID) a 37 °C durante 24 horas.

3.3. DETECCIÓN DE ACTIVIDAD ANTAGONISTA

Se probó la actividad antagonista de las dos cepas de BAL (Lp-25/1 de la especie *Lactobacillus paracasei* y Lc-51/3 de *Lactobacillus casei*) frente a las cepas de las 4 especies de bacterias patógenas (*Escherichia coli* CECT 4972, *Salmonella enterica* CECT 4156, *Staphylococcus aureus* CECT 5190 y una cepa de *Listeria monocytogenes*), mediante la metodología “spot-on-the-lawn” con algunas modificaciones como se describe a continuación (Perin y Nero, 2014).

Utilizando cultivos puros de las dos cepas de BAL se llevó a cabo una inoculación en tres puntos a partir de una colonia de la bacteria ácido-láctica correspondiente en una placa de agar MRS, por duplicado, y se incubó a 25 °C durante 24 a 48 horas. Después de la incubación se añadió una sobrecapa de agar BHI semisólido con 0,1 mL del cultivo de la cepa de la especie patógena a ser probada, en una concentración aproximada de 3×10^8 ufc/mL (1 en la escala de Mc Farland). Tras la solidificación de la sobrecapa, las placas fueron incubadas a 37 °C por 24 horas. Después de ese periodo se observó la formación de halos, donde halos bien definidos eran clasificados como inhibición total y halos difusos como inhibición parcial (Nero *et al.*, 2009) (Fig. 1).

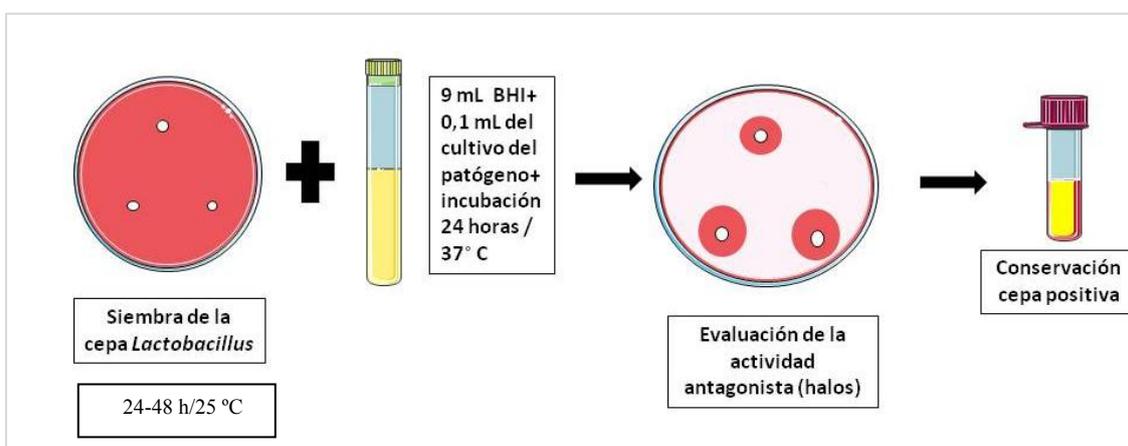


Figura 1. Prueba de actividad antagonista de las cepas de *Lactobacillus* frente a especies patógenas.

3.4. ACTIVIDAD INHIBIDORA DEL CRECIMIENTO

En las cepas con actividad antagonista comprobada en el apartado 3.3, se determinó la naturaleza de dicha actividad siguiendo una adaptación de las técnicas descritas por Gourama y Bullerman (1997) y Gerez *et al.* (2013). Se utilizaron las cepas

de BAL descritas en el apartado 3.1, los cultivos se realizaron utilizando caldo BHI (48 h a 30 °C). Los sobrenadantes sin células fueron obtenidos por centrifugación a 9000 g durante 10 min a 4 °C y filtrado (filtros de nylon, tamaño de poro de 0,2 µm, Pall Life Sciences Corporation,) y almacenados a -20 °C hasta su utilización en los ensayos (Gerez *et al.*, 2013).

3.4.1. Cepas de especies patógenas utilizadas

Fueron utilizadas las cepas descritas en el apartado 3.2. (*Escherichia coli* CECT 4972, *Salmonella enterica* CECT 4156, *Staphylococcus aureus* CECT 5190 y una cepa de *Listeria monocytogenes*) para la preparación de los cultivos a partir de caldos mantenidos a congelación, se incubaron en caldo (BHI) a 37 °C durante 24 horas. Una suspensión de los cultivos se hizo en agua peptonada (0,1%) y se utilizó en una concentración aproximada de 3×10^8 ufc/mL (1 en la escala de Mc Farland).

3.4.2. Tratamiento de las muestras

Los sobrenadantes sin células filtrados se repartieron en tres fracciones y fueron sometidos a los siguientes tratamientos: una parte se mantuvo inalterada, otra parte fue neutralizada con un hidróxido sódico hasta pH 7, con el fin de evaluar si el responsable de la capacidad era de naturaleza ácida, y la última fracción del filtrado fue tratada térmicamente en viales de vidrio en una estufa a 100 °C durante 10 minutos para analizar si el compuesto era de naturaleza proteica y/o termolábil (Gerez *et al.*, 2013).

3.4.3. Técnica de turbidimetría cinética (Bioscreen)

Los experimentos se realizaron por cuadruplicado (Foto 2). Posteriormente, se evaluó la actividad antagonista de los sobrenadantes tratados utilizando un equipo de turbidimetría automatizado (Bioscreen, Labsystems, Finlandia) (Foto 1 y 2) (por comparación de la densidad óptica al cabo de 18 horas tomando medidas automáticas cada 30 minutos) (Gerez *et al.*, 2013). Después de esto, se observaron las gráficas proporcionadas por el equipo. En los pocillos de la placa del Bioscreen se introduce por cuadruplicado y las cantidades utilizadas están detalladas en la Tabla 1:

- Un control negativo (por duplicado), que contiene únicamente el medio de cultivo BHI para confirmar que el medio de cultivo no está contaminado.
- Controles positivos, suspensión de bacterias con el medio de cultivo BHI (por cuadruplicado).

- Las pruebas de inhibición, el cultivo centrifugado y filtrado con o sin los tratamientos y la suspensión de bacterias patógenas.

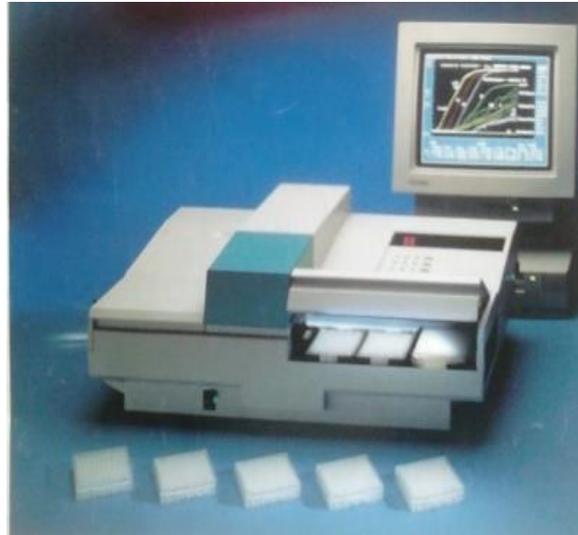


Foto 1. Equipo Bioscreen (Labsystems).



Foto 2. Placa utilizada para colocar las muestras (Labsystems).

Tabla 1. Volúmenes utilizados (en los pocillos de la placa) para la técnica de turbidimetría cinética (Bioscreen).

Muestras	Cantidad
Control negativo	200 µl de BHI
Control positivo	190 µl de BHI + 10 µl de suspensión de la bacterias patógenas
Prueba de inhibición	190 µl del cultivo centrifugado Lp-25/1 (pH 3,81) + 10 µl de suspensión de la bacterias patógenas
Prueba de inhibición	190 µl del cultivo centrifugado Lc-51/3 (pH 3,78) + 10 µl de suspensión de la bacterias patógenas
Identificación de la naturaleza de la actividad (ácida)	190 µl del cultivo centrifugado de Lp-25/1 y Lc-51/3 neutralizado (pH 7) + 10 µl de la suspensión de bacterias patógenas
Identificación de la naturaleza de la actividad (proteica/ termolábil)	190 µl del cultivo centrifugado de Lp-25/1 y Lc-51/3 con tratamiento térmico (100 grados/10 minutos) + 10 µl de la suspensión de bacterias patógenas

Lp-25/1 (*Lactobacillus paracasei*); Lc-51/3 (*Lactobacillus casei*).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las dos cepas de BAL seleccionadas por su actividad antifúngica (Lp-25/1 de la especie *Lactobacillus paracasei* y Lc-51/3 de *Lactobacillus casei*) presentaron inhibición total (halos bien definidos) frente a las cuatro cepas de especies patógenas, como se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2. BAL con actividad antifúngica frente a cepas de *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes*.

Cepa BAL	Actividad antifúngica	Actividad frente a bacterias
Lp-25/1	<i>Penicillium nordicum</i> <i>Penicillium commune</i> <i>Penicillium verrucosum</i>	<i>Escherichia coli</i> <i>Salmonella enterica</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Listeria monocytogenes</i>
Lc-51/3	<i>Penicillium nordicum</i> <i>Penicillium commune</i>	<i>Escherichia coli</i> <i>Salmonella enterica</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Listeria monocytogenes</i>

En la Foto 3 se muestra un ejemplo de los resultados obtenidos, concretamente la actividad de la cepa Lc-51/3 *Lactobacillus casei* frente a la cepa de *Salmonella enterica* utilizada en los experimentos de inhibición.

En la bibliografía se pueden encontrar numerosos estudios en los que se observa la actividad de diversas especies de BAL frente a bacterias patógenas (Alexandre *et al.*, (2002); Caridi *et al.*, (2003); Neto *et al.*, (2005); Chioda *et al.*, (2006); Chioda *et al.*, (2007); Nero *et al.*, (2008); Nero *et al.*, (2009); Tamanini *et al.*, (2012)). Sin embargo, como ya se reflejó en capítulos anteriores, son pocos los estudios publicados hasta el momento que investiguen la actividad de las BAL frente a los mohos utilizados en este trabajo (Cabo *et al.*, 2002; Schillinger y Villarreal, 2010; Cheong *et al.*, 2014; Salas *et al.*, 2018) y son más escasos los trabajos que evalúan la doble actividad de las BAL (frente a bacterias patógenas y frente a mohos), como se muestra en la Tabla 3.



Foto 3. Halo de inhibición del crecimiento de Lc-51/3 *Lactobacillus casei* frente a *Salmonella enterica*.

Como se puede observar, no se han encontrado trabajos en los que se muestre la doble actividad utilizando las mismas especies de BAL de nuestro estudio. Con otras especies de BAL, se detectaron antagonismos frente a la mayoría de las especies de bacterias patógenas, o por lo menos del mismo género, que las probadas en esta investigación (*E. coli*, *S. enterica*, *S. aureus*) (Aslam y Qazi, 2010; Cizeikiene *et al.*, 2013; Kabir Rayhanul *et al.*, 2014). Con respecto a la actividad antifúngica, los estudios registrados se concentran principalmente frente a los géneros *Aspergillus* y *Fusarium* y en el único trabajo encontrado que ha utilizado cepas del género *Penicillium*, ha utilizado especies distintas (*P. chrysogenum* y *P. expansum*) a las empleadas en nuestro trabajo (Cizeikiene *et al.*, 2013).

Tabla 3. Revisión de estudios acerca de BAL con actividad frente a bacterias y hongos.

Especie BAL	Bacteria	Mohos	Referencia
<i>Lactobacillus paracasei</i>	<i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella enterica</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Penicillium nordicum</i> <i>Penicillium commune</i> <i>Penicillium verrucosum</i>	Este trabajo
<i>Lactobacillus casei</i>	<i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella enterica</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Penicillium nordicum</i> <i>Penicillium commune</i>	
<i>Lactobacillus sakei</i>	<i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella</i> Typhimurium	<i>Penicillium expansum</i> <i>Aspergillus niger</i> <i>Aspergillus vesicolor</i> <i>Fusarium culmorum</i> <i>Debaryomyces hansenii</i> <i>Candida parapsilosis</i>	(Cizeikiene <i>et al.</i> , 2013)
<i>Pediococcus acidilactici</i>	<i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella</i> Typhimurium	<i>Penicillium expansum</i> <i>Aspergillus niger</i> <i>Penicillium chrysogenum</i> <i>Fusarium culmorum</i>	
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	<i>Salmonella</i> Typhimurium	<i>Penicillium expansum</i> <i>Aspergillus niger</i> <i>Aspergillus vesicolor</i> <i>Aspergillus fumigatus</i> <i>Penicillium chrysogenum</i> <i>Fusarium culmorum</i> <i>Debaryomyces hansenii</i> <i>Candida parapsilosis</i>	
BAL no descrita	<i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Bacillus subtilis</i>	<i>Aspergillus niger</i>	(Kabir Rayhanul <i>et al.</i> , 2014)
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Escherichia coli</i> y <i>Staphylococcus aureus</i>	Levadura no descrita	(Aslam y Qazi, 2010)
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	<i>Salmonella</i> sp. y <i>Staphylococcus aureus</i>	Levadura no descrita	
<i>Lactobacillus salivarius</i>	<i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella</i> sp. y <i>Staphylococcus aureus</i>	Levadura no descrita	

Los resultados con respecto a la evaluación del crecimiento y identificación de la naturaleza de la actividad se muestran en las Figuras (2, 3, 4 y 5). Las cepas de *Lactobacillus casei* y *paracasei* han demostrado una alta capacidad de inhibición del crecimiento en comparación a los controles de todos los patógenos (*Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes*). Solamente el sobrenadante de la cepa Lp-25/1 frente a *Listeria monocytogenes* no presentó la actividad antagonista disminuida cuando fue sometido a neutralización, lo que indica que el compuesto responsable por la actividad en este caso distinto a todos los demás no es de naturaleza ácida. Los sobrenadantes sometidos a tratamiento térmico tuvieron en todos los casos el mismo comportamiento que aquellos que no eran neutralizados, por lo que no se muestran en las gráficas con el objeto de simplificar la interpretación de las mismas.

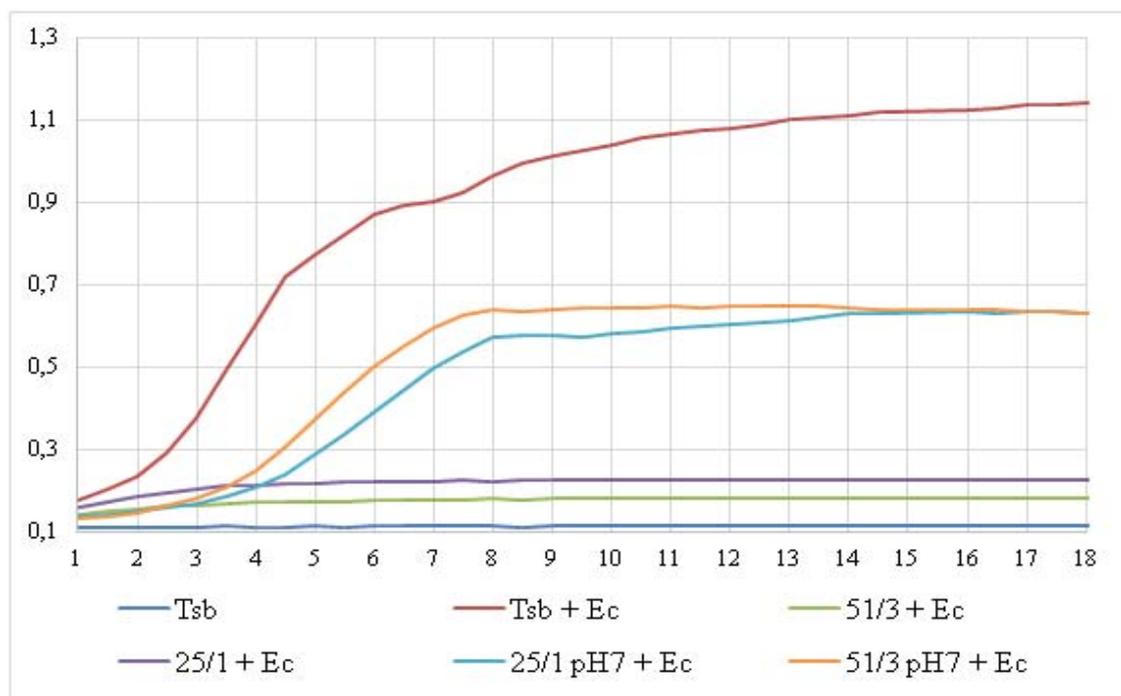


Figura 2. Evaluación del crecimiento de *Escherichia coli* e identificación de la naturaleza de la actividad de las cepas Lp-25/1 (*Lactobacillus paracasei*) y Lc-51/3 (*Lactobacillus casei*). Eje Y, turbidez; eje X, tiempo en horas.

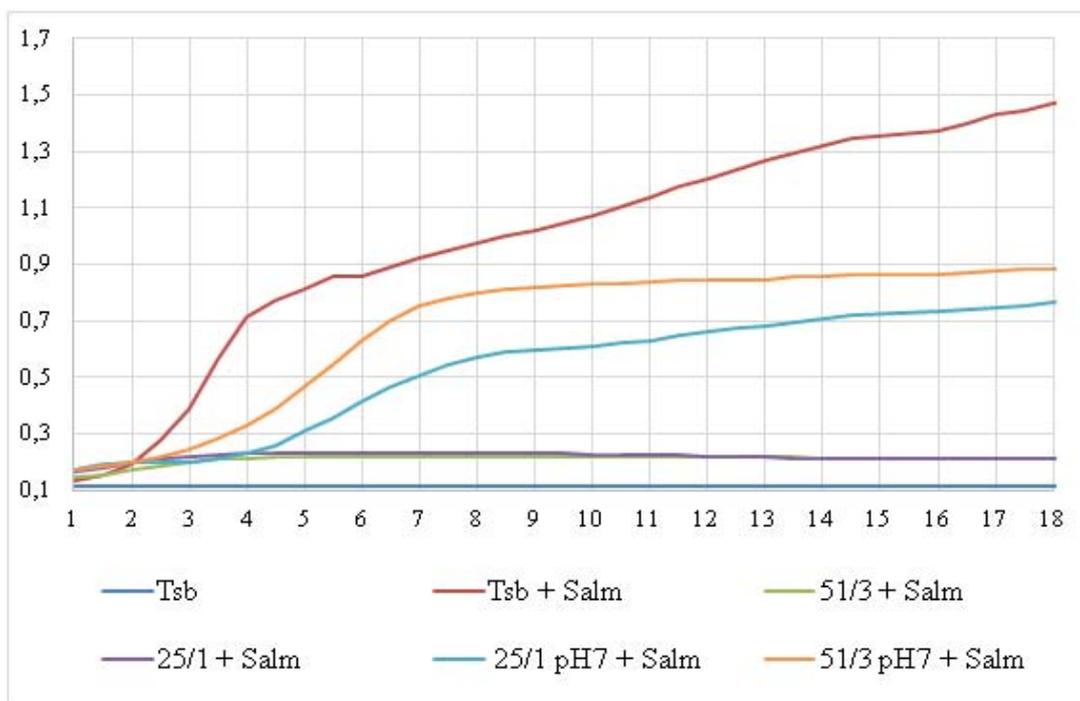


Figura 3. Evaluación del crecimiento de *Salmonella enterica* e identificación de la naturaleza de la actividad de las cepas Lp-25/1 (*Lactobacillus paracasei*) y Lc-51/3 (*Lactobacillus casei*). Eje Y, turbidez; eje X, tiempo en horas.

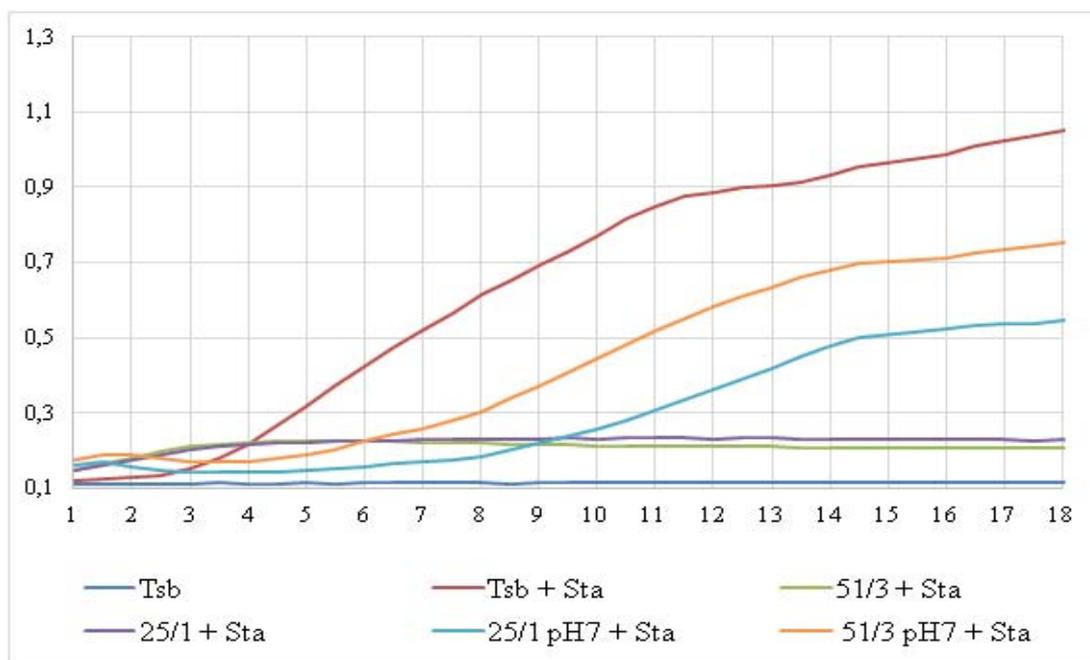


Figura 4. Evaluación del crecimiento de *Staphylococcus aureus* e identificación de la naturaleza de la actividad de las cepas Lp-25/1 (*Lactobacillus paracasei*) y Lc-51/3 (*Lactobacillus casei*). Eje Y, turbidez; eje X, tiempo en horas.

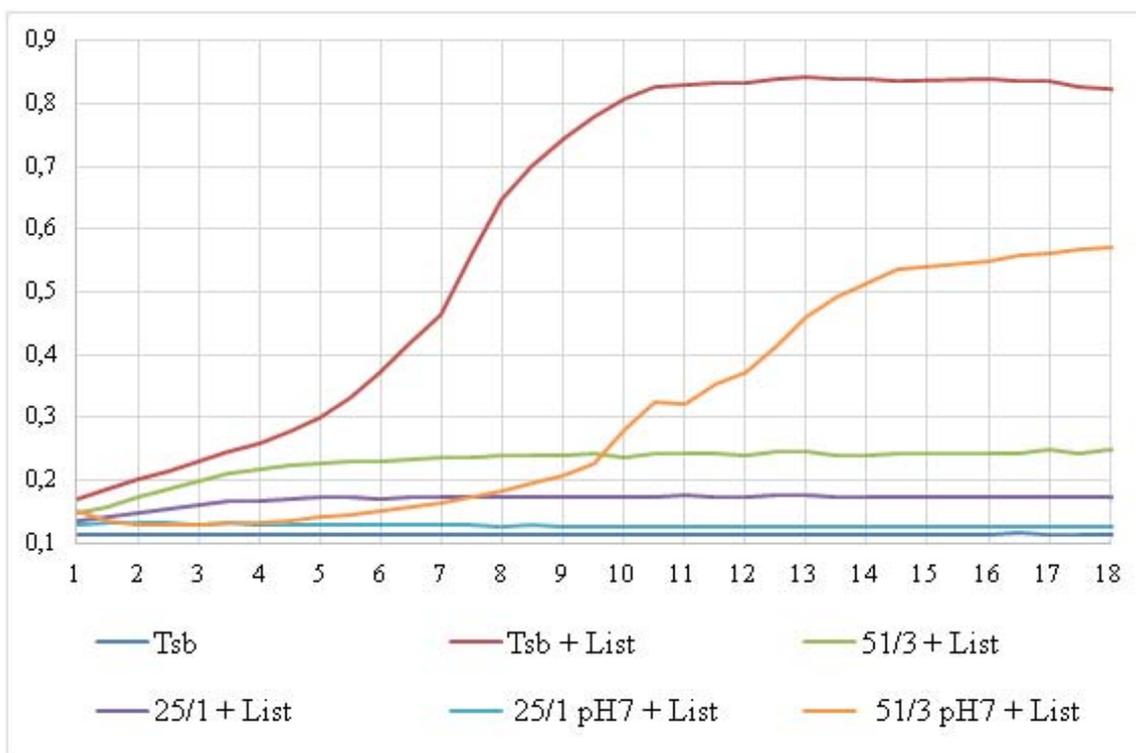


Figura 5. Evaluación del crecimiento de *Listeria monocytogenes* e identificación de la naturaleza de la actividad de las cepas Lp-25/1 (*Lactobacillus paracasei*) y Lc-51/3 (*Lactobacillus casei*). Eje Y, turbidez; eje X, tiempo en horas.

Se ha informado previamente que la actividad inhibitoria de BAL frente a los microorganismos puede resultar de la producción de metabolitos tales como ácidos orgánicos (en particular, láctico, propiónico y acético), dióxido de carbono, etanol, peróxido de hidrógeno, diacetilo, producción de compuestos proteicos, crecimiento competitivo y disminución del pH causado por la producción de ácido o una combinación de estos factores (Bianchini y Bullerman, 2010) pero según Wang *et al.* (2015) el principal efecto inhibitorio se debe a una característica metabólica central presente en todas las BAL que es la vía fermentativa que se utiliza para generar energía celular y tiene como consecuencia la producción de ácidos orgánicos, principalmente láctico, con la consiguiente disminución del pH de la medio circundante. El crecimiento bacteriano generalmente ocurre óptimamente a pH valores en el rango 6-7, a medida que el pH disminuye de esta región por lo que la tasa de crecimiento cae, eventualmente llegando a cero y además de eso los ácidos podrían tener un efecto específico como la desestabilización de la membrana (Sjögren *et al.*, 2003) y sobre la

fuerza motriz protónica (Gänzle y Vogel, 2003; Vandenberg, 1993) de la membrana inhibiendo directamente el crecimiento de microorganismos.

Domitille *et al.* (2005) en un experimento con *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus casei* cepa Shirota y de *L. casei* como en nuestro estudio frente *Salmonella enterica* serovar Typhimurium atribuyo la inhibición a la alta concentración de ácido láctico en el sobrenadante probado. El mismo ácido fue indicado como el responsable por la inhibición de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumonia*, *Enterococcus faecalis*, *Shigella flexneri*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter* y *Clostridium difficile* por *Lactobacillus casei rhamnosus* (Forestier *et al.*, 2001). Los hallazgos de Ogawa *et al.* (2001) muestran que *Lactobacillus casei* cepa Shirota y *L. acidophilus* han reducido el crecimiento de *Escherichia coli* O157: H7 productora de toxina Shiga como resultado de la producción de ácido láctico y un efecto reductor del pH. El efecto antimicrobiano presentado por Millette *et al.* (2007) probando *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus casei* frente a *Salmonella* Typhimurium, *Staphylococcus aureus*, *Listeria innocua*, *Enterococcus faecium* y *Enterococcus faecalis* fue una mezcla de ácidos orgánicos y sustancias inhibidoras del tipo bacteriocina según Adams y Nicolaidis (2002) la acción de los ácidos en la membrana de las células facilitaría la actividad de otros compuestos producidos por BAL. Wang *et al.* (2015) hicieron un experimento directamente con ácido láctico frente a *Salmonella* Enteritidis, *Escherichia coli* y *Listeria monocytogenes*, probando concentraciones de (0,25%, 0,5%, 1% y 2%) 0,5% fue la concentración de mínima capaz de inhibir a todos los patógenos.

La naturaleza del compuesto antagonista de la cepa Lp-25/1 *Lactobacillus paracasei* frente a *Listeria monocytogenes* no fue identificada, podría ser la producción de uno de los metabolitos producidos por BAL además de los ácidos, incluso un compuesto de naturaleza proteica como por ejemplo una bacteriocina, aunque la bacteriocina mas conocida sea la nisina (producida por *Lactococcus lactis*) (Nero, 2009) otras especies como de BAL (*L. casei*, *L. sakei*, *P. acidilactici*, *L. acidophilus*, *L. paracasei* y *L. salivarius* entre otras) también son conocidas productoras de bacteriocinas que podrían ejercer su acción frente a diversos microorganismos (Cintas *et al.*, 2001). Además, el tratamiento térmico no inhibe esta actividad observada, lo que indica que podría ser de naturaleza termoestable.

5. CONCLUSIONES

Los hallazgos de este estudio son de gran importancia, pues además de capacidad antifúngica, las cepas de BAL evaluadas demostraron capacidad antagonista frente a cuatro especies de bacterias patógenas de interés en leche y productos lácteos (*Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes*), lo que hace posible su utilización como cultivo bioprotector, tanto frente a mohos como frente a bacterias. Los estudios semejantes al desarrollado en este trabajo son escasos, lo que dificulta la comparación entre resultados. La naturaleza del principal compuesto de BAL responsable de la actividad antagonista frente a las especies de bacterias patógenas investigadas es ácida. En el caso de la actividad inhibitoria de la cepa Lp-25/1 *Lactobacillus paracasei* frente a *Listeria monocytogenes*, se ha comprobado otro tipo de actividad, lo cual es un hecho de interés y da lugar a la realización de futuros estudios como también aclarar los mecanismos de acción de este compuesto y de los ácidos en este caso.

6. REFERENCIAS

- Adams, M.R. & Nicolaidis, L., 2002. Review of the sensitivity of different foodborne pathogens to fermentation. *Food Control*, 8 (5–6), pp.227–239.
- Alexandre, D.P. *et al.*, 2002. Atividade antimicrobiana de bactérias lácticas isoladas de queijo-de-minas artesanal do Serro (MG) frente a microrganismos indicadores. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 54, pp. 424-428.
- Aslam, S. & Qazi, J.I., 2010. Isolation of acidophilic lactic acid bacteria antagonistic to microbial contaminants. *Pakistan Journal of Zoology*, 42(5), pp.567–573.
- Asteri, I., Kittaki, N. & Tsakalidou, E., 2010. The effect of wild lactic acid bacteria on the production of goat's milk soft cheese. *International Journal of Dairy Technology*, 63(August), pp. 234–242.
- Bibek, R.; 2005. *Fundamental Food Microbiology*. 3.ed. Editorial CRC Press, Boca Raton-Florida, pp. 33-41.
- Bianchini, A., Bullerman, L.B., 2010. Biological Control of Molds and Mycotoxins in Foods. In: *Mycotoxin Prevention and Control in Agriculture*, vol. 1031, ACS Symposium Series, pp. 1–16.
- Borges, M.F.; Andrade, A.N.C.; Arcuri, E.F.; Kabuki, D.Y.; Kuaye, A.Y, 2009. *Listeria monocytogenes* em leite e produtos lácteos, Embrapa Agroindústria Tropical, pp.31.
- Cabo, M.L., Braber, A.F. & Koenraad, P.M.F.J., 2002. Apparent Antifungal Activity of Several Lactic Acid Bacteria against *Penicillium discolor* Is Due to Acetic Acid in the Medium. *Journal of Food Protection*, 65 (8), pp. 1309-1316.
- Caridi, A. *et al.*, 2003. Ripening and seasonal changes in microbial groups and in physico-chemical properties of the ewes' cheese Pecorino del Poro. *International Dairy Journal*, 13 (2-3), pp. 191-200.
- Cheong, E.Y.L. *et al.*, 2014. Isolation of lactic acid bacteria with antifungal activity against the common cheese spoilage mould *Penicillium commune* and their potential as biopreservatives in cheese. *Food Control*, 46, pp.91–97.
- Chioda, T.P. *et al.*, 2007. Inibição do crescimento de *Escherichia coli* isolada de Queijo “Minas Frescal” por *Lactobacillus acidophilus*. *Ciência Rural*, 37 (2), 583-585.
- Chioda, T.P. *et al.*, 2006. Inibição do crescimento de *Listeria monocytogenes* em queijo Minas Frescal elaborado com cultura de *Lactobacillus acidophilus*. *Revista portuguesa de ciencias veterinárias*, 101 (557-558), pp. 121-124.
- Cintas, L.M. *et al.*, 2001. Review: Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria. *Food Science and Technology International*, 7(4), pp.281–305.
- Cizeikiene, D. *et al.*, 2013. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria against pathogenic and spoilage microorganism isolated from food and their control in wheat bread. *Food Control*, 31(2), pp.539–545.

- Cocolin, L. *et al.*, 2007. Description of the bacteriocins produced by two strains of *Enterococcus faecium* isolated from Italian goat milk. *Food Microbiology*, 24 (7–8), pp.752–758.
- De Buyser, M.-L. *et al.*, 2001. Implication of milk and milk products in food-borne diseases in France and in different industrialised countries. *International Journal of Food Microbiology*, 67(1–2), pp.1–17.
- Domitille, F., Lie, V. & Servin, A.L., 2005. pH-, Lactic Acid-, and Non-Lactic Acid-Dependent Activities of Probiotic Lactobacilli against. *Applied and environmental microbiology*, 71(10), pp.6008–6013.
- ECDC, EFSA, E.F.S.A. and E.C. for D.P. and C., 2018. The European Union Summary report on trends and sources of zoonoses and zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2012. *EFSA Journal*, 12(2), pp.1–312.
- EFSA, 2015. Scientific Opinion on the public health risks related to the consumption of raw drinking milk. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) & European Food Safety Authority (EFSA), 13(1), p.3940.
- Espinosa, L. *et al.*, 2014. Brotes De Enfermedades Transmitidas Por Alimentos. España, 2008-2011 (Excluye Brotes Hídricos). *BOLETÍN epidemiológico SEMANAL*, 22, pp.130–136.
- Forestier, C. *et al.*, 2001. Probiotic activities of *Lactobacillus casei rhamnosus*: In vitro adherence to intestinal cells and antimicrobial properties. *Research in Microbiology*, 152(2), pp.167–173.
- Gänzle, M.G. & Vogel, R.F., 2003. Studies on the mode of action of reutericyclin. *Applied and Environmental Microbiology*, 69 (2) pp. 1305-1307.
- Gerez, C.L. *et al.*, 2013. Control of spoilage fungi by lactic acid bacteria. *Biological Control*, 64(3), pp.231–237.
- Gourama, H. & Bullerman, L.B., 1997. Anti-aflatoxigenic activity of *Lactobacillus casei pseudoplantarum*. *International Journal of Food Microbiology*, 34(2), pp.131–143.
- Herreros, M.A. *et al.*, 2005. Antimicrobial activity and antibiotic resistance of lactic acid bacteria isolated from Armada cheese (a Spanish goats' milk cheese). *Food Microbiology*, 22(5), pp.455–459.
- Jack, R.W., Tagg, J.R. & Ray, B., 1995. Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Microbiological reviews*, 59(2), pp.171–200.
- Jakabi, M. *et al.*, 1999. Observações laboratoriais sobre surtos alimentares de *Salmonella* spp., ocorridos na grande São Paulo, no período de 1994 a 1997. *REvista Instituto Adolfo Lutz*, 58, pp.47–51.
- Jay, J.M., 2005. *Microbiologia de Alimentos* 6º Ed. Editorial Acribia, Zaragoza.
- Kabir Rayhanul, K. *et al.*, 2014. Antagonism of Lactic Acid Bacteria Against Selected Pathogenic Bacteria and Spoilage Fungi. *American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences*, 14(3), pp.193–198.

- Klaenhammer, T.R., 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 12 (1-3), pp.39–85.
- Libby, S. *et al.*, 1994. A cytolysin encoded by *Salmonella* is required for survival within macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91 (2), pp. 489-493.
- Martín-Platero, A.M. *et al.*, 2009. Characterization and safety evaluation of enterococci isolated from Spanish goats' milk cheeses. *International Journal of Food Microbiology*, 132(1), pp.24–32.
- Mhone, T.A., Matope, G. & Saidi, P.T., 2011. Aerobic bacterial, coliform, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* counts of raw and processed milk from selected smallholder dairy farms of Zimbabwe. *International Journal of Food Microbiology*, 151(2), pp. 223-228.
- Millette, M., Luquet, F.M. & Lacroix, M., 2007. In vitro growth control of selected pathogens by *Lactobacillus acidophilus*- and *Lactobacillus casei*-fermented milk. *Letters in Applied Microbiology*, 44(3), pp.314–319.
- Nero, L.A. *et al.*, 2009. Interference of raw milk autochthonous microbiota on the performance of conventional methodologies for *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. detection. *Microbiological Research*, 164(5), pp.529–535.
- Nero, L.A. *et al.*, 2008. *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. in raw milk produced in Brazil: Occurrence and interference of indigenous microbiota in their isolation and development. *Zoonoses and Public Health*, 55, pp. 299-305.
- Neto, L.G.G. *et al.*, 2005. Atividade antimicrobiana de bactérias ácido-lácticas isoladas de queijos de coalho artesanal e industrial frente a microrganismos indicadores. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 57(2), pp.245–250.
- Oliveira C.A.F. 2008. Qualidade do leite no processamento de derivados. In: 2 Germano P.M.L. & Germano M.I.S. Higiene e vigilância sanitária de alimentos. 3 ed. Editora Varela, São Paulo, pp.115- 129.
- Ogawa, M. *et al.*, 2001. Protective effect of *Lactobacillus casei* strain Shirota on Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 infection in infant rabbits. *Infection and Immunity*, 69(2), pp.1101-1108.
- Perin, L.M. & Nero, L.A., 2014. Antagonistic lactic acid bacteria isolated from goat milk and identification of a novel nisin variant *Lactococcus lactis*. *BMC microbiology*, 14(1), p.36.
- Ray, B., 2014. *Fundamental Food Microbiology*, 5° Editorial CRC Press, Boca Raton-Florida, pp. 99-115.
- Ross, P. R., Morgan, S. & Hill, C., 2002. Preservation and fermentation: Past, present and future. *International Journal of Food Microbiology*, 79(1–2), pp.3–16.
- Salas, M.L. *et al.*, 2018. Antifungal activity of lactic acid bacteria combinations in dairy mimicking models and their potential as bioprotective cultures in pilot scale applications. *Frontiers in Microbiology*, 9, pp.1787.

- Schillinger, U. & Villarreal, J.V., 2010. Inhibition of *Penicillium nordicum* in MRS medium by lactic acid bacteria isolated from foods. *Food Control*, 21(2), pp.107–111.
- Sjögren, J. *et al.*, 2003. Antifungal 3-Hydroxy Fatty Acids from *Lactobacillus plantarum* MiLAB 14. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(12), pp. 7554-7557.
- Smaoui, S. *et al.*, 2010. Inhibition of fungi and Gram-negative bacteria by bacteriocin BacTN635 produced by *Lactobacillus plantarum* sp. TN635. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 162(4), pp. 1132–1146.
- Swaminatha, B. & Gerner-Smidt, P., 2007. The epidemiology of human listeriosis. *Microbes and Infection*, 9(10), pp.1236–1243.
- Tagg, J.R., Dajani, A.S. & Wannamaker, L.W., 1976. Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Bacteriological reviews*, 40(3), pp.722.
- Tamanini, R. *et al.*, 2012. Antagonistic activity against *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* from lactic acid bacteria isolated from raw milk. *Semina: Ciências Agrárias*, 33(5), pp.1877–1886.
- Vandenbergh, P.A., 1993. Lactic acid bacteria, their metabolic products and interference with microbial growth. *FEMS Microbiology Reviews*, 12 (1-3), pp. 221–237.
- Yu, J. *et al.*, 2015. Molecular identification and quantification of lactic acid bacteria in traditional fermented dairy foods of Russia. *Journal of Dairy Science*, 98(8), pp.5143–5154.
- Wang, H.K. *et al.*, 2012. Production and characterization of antifungal compounds produced by *Lactobacillus plantarum* IMAU10014. *PLoS ONE*, 7, pp. e29452.
- Wang, C. *et al.*, 2015. Antibacterial mechanism of lactic acid on physiological and morphological properties of *Salmonella Enteritidis*, *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes*. *Food Control*, 47, pp.231–236.
- Zeinhom, M.M.A. & Abdel-latef, G.K., 2014. ScienceDirect Public health risk of some milk borne pathogens. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*, 3(3), pp.209–215.



CAPÍTULO V.
IDENTIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS DE BAL
RESPONSABLES DE LA ACTIVIDAD
ANTIFÚNGICA

1. INTRODUCCIÓN

Para evitar el crecimiento fúngico en los quesos y las consecuencias negativas derivadas de ello, principalmente alteración del producto, en la industria láctea se utilizan diversas estrategias. Algunos ácidos orgánicos y sus ésteres, como el ácido benzoico, ácido sórbico y el benzoato de sodio se usan como agentes antifúngicos, así como también el antibiótico natamicina producida por *Streptomyces natalensis* (Davidson, 2001). Sin embargo, se ha observado la aparición de resistencias, tanto a los antibióticos, como también a los ácidos sórbico y benzoico por parte de los mohos y levaduras (Brul y Coote, 1999; Viljoen, 2001).

Dentro de las estrategias modernas para reducir la contaminación de los alimentos por mohos y la producción de micotoxinas se encuentra la aplicación de técnicas de biopreservación, empleando microorganismos antagonistas. En particular, las bacterias ácido-lácticas (BAL) se consideran microorganismos apropiados para suprimir el crecimiento de otros microorganismos incluyendo levaduras y mohos (Schillinger y Villarreal, 2010).

Un cultivo bioprotector se refiere a uno o varios microorganismos con capacidad de producir moléculas inhibitorias y/o competir con otros microorganismos no deseados en una matriz alimentaria (Alexandraki *et al.*, 2013). Las bacterias del ácido láctico y las bacterias del ácido propiónico son los grupos microbianos más comúnmente utilizados como cultivos protectores, ya que están presentes de forma natural en alimentos fermentados y tienen una larga historia de uso seguro. Su efecto conservante se relaciona principalmente con la producción de compuestos como ácidos orgánicos y peróxido de hidrógeno, la producción de sustancias antimicrobianas y la competencia por los nutrientes (Stiles, 1996). Especies pertenecientes al género *Lactobacillus*, especialmente *Lb. plantarum*, *Lb. casei*, *Lb. reuteri*, *Lb. coryniformis* y *Lb. buchneri*, son uno de los grupos más importante de bacterias bioprotectoras en alimentos (Dalié *et al.*, 2010; Delavenne *et al.*, 2012; Schwenninger y Meile, 2004).

Las actividades antifúngicas de BAL se deben supuestamente al efecto sinérgico o aditivo de estos compuestos (Dalié *et al.*, 2010). De hecho, a veces sólo ciertas combinaciones de compuestos actuando sinérgicamente muestran un efecto inhibitorio (Corsetti *et al.*, 1998). Sin embargo, la mayoría de estos compuestos activos se producen generalmente en cantidades muy bajas y la contribución individual es difícil de identificar y cuantificar (Siedler *et al.*, 2019) pero algunos estudios han logrado identificar estos compuestos o por lo menos la naturaleza de la actividad que ha

contribuido mayoritariamente a la inhibición de los mohos (Tabla 1), pese a que los mecanismos por los cuales estas moléculas inhiben el crecimiento de hongos aún no se comprenden completamente (Siedler *et al.*, 2019).

Tabla 1. Revisión de estudios sobre compuestos identificados producidos por BAL con actividad frente a mohos contaminantes de alimentos.

BAL	Compuesto antifúngico	Moho	Referencia (orden cronológico)
<i>Lactobacillus coryniformis</i>	Péptido	<i>Aspergillus fumigatus</i> , <i>Aspergillus nidulans</i> , <i>Penicillium roqueforti</i> , <i>Mucos hiemalis</i> , <i>Talaromyces flavus</i> , <i>Fusarium graminearum</i> , <i>Fusarium poea</i> , <i>Fusarium culmorum</i> y <i>Fusarium sporotrichoides</i>	(Magnusson y Schnürer, 2001)
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> <i>Enterococcus faecium</i> , <i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>casei</i> , <i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>pseudopantarum</i> , <i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>tolerans</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Pediococcus pentosaceus</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>rhamnosus</i>	Ácido acético y ácido láctico	<i>Penicillium discolor</i>	(Cabo <i>et al.</i> , 2002)
<i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Lactobacillus rhamnosus</i> , <i>Lactobacillus casei</i> y <i>Lactobacillus collinoides</i>	Ácido y peróxido de hidrógeno	<i>Penicillium spp.</i>	(Voulgari <i>et al.</i> , 2010)
<i>Lactobacillus plantarum</i> y <i>Lactobacillus</i>	Péptido	<i>Penicillium spp.</i>	(Voulgari <i>et al.</i> , 2010)

BAL	Compuesto antifúngico	Moho	Referencia (orden cronológico)
<i>rhamnosus</i>			
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Ácido bencenoacético, ácido feniláctico y éster propenílico	<i>Botrytis cinerea</i> , <i>Glomerella cingulate</i> , <i>Phytophthora drechsleri tucker</i> , <i>Penicillium citrinum</i> , <i>Penicillium digitatum</i> y <i>Fusarium oxysporum</i>	(Wang <i>et al.</i> , 2012)
<i>Lactobacillus harbinesis</i>	Ácido láctico, ácido acético y ácido hexanoico	<i>Debaryomyces hansenii</i> , <i>Penicillium expansum</i> , <i>Penicillium roqueforti</i>	(Belguesmia <i>et al.</i> , 2013)
<i>Lactobacillus harbinesis</i>	Ácido láctico, ácido acético y ácido feniláctico	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Penicillium sp.</i> , <i>Fusarium graminearum</i> , <i>Geotrichum candidum</i> var. <i>citriaurantii</i> , <i>Penicillium digitatum</i>	(Gerez <i>et al.</i> , 2013)
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Péptido	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Rhizopus stolonifer</i> , <i>Mucor racemosus</i> , <i>Penicillium chrysogenum</i>	(Gupta y Srivastava, 2014)
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Ácido 3-hidroxi-5-dodecanoico, ácido 3-hidroxi-5-dodecanoico y ácido 5-oxododecanoico	<i>Pichia kudriavzevii</i> , <i>Saccharomyces servazzii</i> , <i>Saccharomyces bulderi</i> , <i>Kazachstania exigua</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>Aspergillus flavus</i> , <i>Aspergillus fumigatus</i> , <i>Aspergillus petrakii</i> , <i>Aspergillus ochraceus</i> , <i>Aspergillus nidulans</i> , <i>Cladosporium</i>	(Ryu <i>et al.</i> , 2014)

BAL	Compuesto antifúngico	Moho	Referencia (orden cronológico)
		<i>gossypiicola</i> y <i>Penicillium roqueforti</i>	
<i>Lactobacillus paracasei</i>	Diacetil	<i>Penicillium sp.</i> y <i>Penicillium solitum</i>	(Aunbjerg <i>et al.</i> , 2015)
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Ácido láctico	<i>Fusarium culmorum</i> , <i>Penicillium chrysogenum</i> , <i>Penicillium Expansum</i> , <i>Penicillium Roqueforti</i> y <i>Aspergillus flavus</i>	(Russo <i>et al.</i> , 2017)

En la mayoría de las investigaciones realizadas hasta ahora, la actividad antifúngica de BAL ha sido demostrada en experimentos con mohos cultivados en medios líquidos o en agar (Aunbjerg *et al.*, 2015; Belguesmia *et al.*, 2013; Cabo *et al.*, 2002; Magnusson y Schnürer, 2001; Russo *et al.*, 2017; Voulgari *et al.*, 2010) (Tabla 1). El uso de otros métodos, sobre todo métodos automatizados, se detalla en escasos estudios, en los que se ha empleado turbidimetría (Gerez *et al.*, 2013) e impedancia directa y indirecta (Laitila *et al.*, 2002).

Para el uso de las técnicas de impedancia hay que tener en consideración que hay dos tipos de medida de impedancia, la directa y la indirecta. El fundamento de la técnica es que los mohos, durante su crecimiento, transforman los nutrientes del medio y liberan pequeñas partículas cargadas eléctricamente (cationes y aniones). En la medida directa, la variación de carga es percibida por los electrodos del equipo, por lo que se obtiene una gráfica que relaciona la impedancia y tiempo. En la técnica indirecta el equipo mide los cambios en la impedancia debido a la producción de CO₂ que es directamente proporcional al crecimiento de los hongos (al ser aerobios, producen CO₂ como producto final del metabolismo celular). El CO₂ formado es absorbido por el hidróxido de potasio (reactivo utilizado para esta técnica), produciendo carbonato

potásico, que origina los cambios en la impedancia y gracias a los electrodos se puede registrar la señal. Por tanto es una medida indirecta de crecimiento de microorganismos (Gomensoro, 2017). La Figura 1 representa los dos tipos de medida.

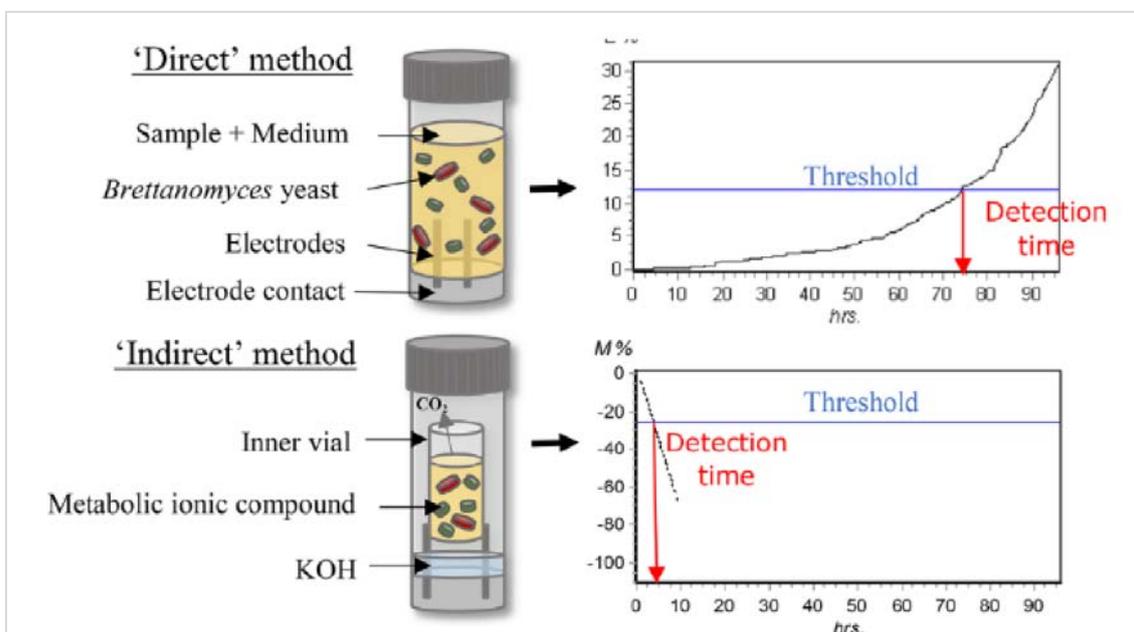


Figura 1. Fundamento de la técnica de impedancia (Gomensoro, 2017).

2. OBJETIVOS

En capítulos anteriores se han identificado cepas de *Penicillium* alterantes y toxigénicas a partir de muestras de quesos y también se han aislado e identificado cepas de BAL con actividad antifúngica. El objetivo de este estudio fue evaluar la actividad inhibidora de crecimiento y la identificación de los posibles compuestos responsables de la misma de 2 cepas de las especies *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus paracasei* utilizando para ello un equipo de impedancia.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. CEPAS DE BAL UTILIZADAS

Se utilizaron las cepas Lp-25/1 (*Lactobacillus paracasei*) y Lc-51/3 (*Lactobacillus casei*) que fueron seleccionadas en base a la actividad mostrada previamente (Capítulo III). Los cultivos se realizaron utilizando caldo TSB (Caldo Tripticasa Soya, OXOID) (48 h a 30 °C). Los sobrenadantes sin células fueron obtenidos por centrifugación a 9000 g durante 10 min a 4 °C y filtrado (filtros de nylon,

tamaño de poro de 0,2 μm , Pall Life Sciences Corporation,) y almacenados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su utilización en los ensayos (Gerez *et al.*, 2013).

3.2. CEPA DE *PENICILLIUM* UTILIZADA

Se utilizó una cepa de *Penicillium* alterante y toxigénica identificada en el capítulo II que está depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo (*P. commune* M35-CECT 20940). La cepa se cultivó en frascos de agar inclinado (MEA) durante 7 días a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se preparó una suspensión de esporas, añadiendo a los frascos 5 mL de una solución de Tween 80 al 0,05% estéril hasta conseguir una concentración de 10^4 esporas/mL (recuento en cámara de Neubauer).

3.3. TRATAMIENTOS DE LAS MUESTRAS

Los sobrenadantes sin células filtrados se repartieron en tres fracciones y fueron sometidos a los siguientes tratamientos: una parte se mantuvo inalterada, otra parte fue neutralizada con un hidróxido sódico hasta pH 7, con el fin de evaluar si el responsable de la capacidad era de naturaleza ácida, y la última fracción del filtrado fue tratada térmicamente en viales de vidrio en una estufa a $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 10 minutos para analizar si el compuesto era de naturaleza proteica y/o termolábil (Gerez *et al.*, 2013) (Tabla 2). Los experimentos se realizaron por duplicado.

3.4. TÉCNICA DE IMPEDANCIA

Se utilizó el equipo BacTrac (mini Trac 4000 Sy-Lab) (Foto 1) para evaluar la actividad inhibidora del crecimiento y determinar la naturaleza de la actividad. La metodología utilizada fue una adaptación de Laitila *et al.* (2002) y Gerez *et al.* (2013). En primer lugar, se llenaron los viales (Foto 2) con las muestras (por duplicado) que contenían los volúmenes señalados en la Tabla 2. Una vez hecho esto, los viales abiertos se introdujeron en tubos de medida con 2 mL de hidróxido potásico (KOH) al 0,2%. La solución de hidróxido potásico, donde se producirá la reacción, estaba en contacto con los electrodos. A continuación, los tubos se cerraron, se colocaron en el equipo Bactrac y se mantuvieron a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 72 horas, tomando medidas automáticas cada 15 minutos. Después de esto, se observaron las gráficas proporcionadas por el equipo, siguiendo las recomendaciones del fabricante. Como se trata de una medida indirecta, al crecer, los mohos se produce una curva descendente y a mayor crecimiento, menor tiempo de detección (Gomensoro, 2017).



Foto 1. Equipo BacTrac (mini Trac 4000 Sy-Lab).

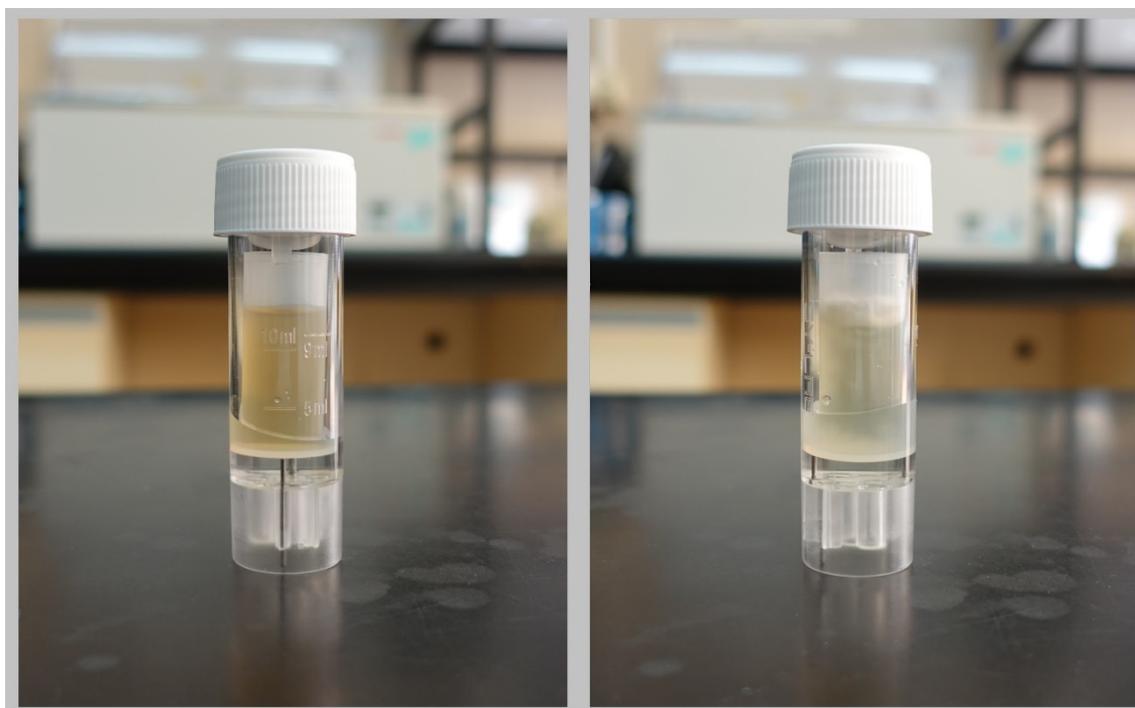


Foto 2. Viales utilizados en el Equipo BacTrac (mini Trac 4000 Sy-Lab) en la técnica de impedancia indirecta.

Tabla 2. Volúmenes utilizados (en los viales) para la técnica de la impedancia (método indirecto).

Muestras	Cantidad
M35	5 mL de medio de cultivo TSB + 1 mL (suspensión de <i>P. commune</i>)
Lc-51/3+M35	5 mL de sobrenadante de Lc-51/3 (pH 3,78) + 1 mL (suspensión de <i>P. commune</i>)
Lp-25/1+M35	5 mL de sobrenadante de Lp-25/1 (pH 3,81) + 1 mL (suspensión de <i>P. commune</i>)
Lp-25/1 TT+M35	5 mL de sobrenadante de Lp-25/1 (pH 3,81) con tratamiento térmico + 1 mL (suspensión de <i>P. commune</i>)
Lc-51/3 TT+M35	5 mL de sobrenadante de Lc-51/3 (pH 3,78) con tratamiento térmico + 1 mL (suspensión de <i>P. commune</i>)
Lp-25/1 pH 7+M35	5 mL de sobrenadante de Lp-25/1 neutralizado + 1 mL (suspensión de <i>P. commune</i>)
Lc-51/3 pH 7+M35	5 mL de sobrenadante de Lc-51/3 neutralizado + 1 mL (suspensión de <i>P. commune</i>)
TSB	6 mL de medio de cultivo TSB

M35, *P. commune* M35; Lp-25/1 (*Lactobacillus paracasei*); Lc-51/3 (*Lactobacillus casei*).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La figura 2 muestra las curvas de *Penicillium commune* (M35) en el medio TSB y en los filtrados de cultivo de BAL con o sin tratamientos y la tabla 3 muestra los tiempos de detección de las distintas muestras.

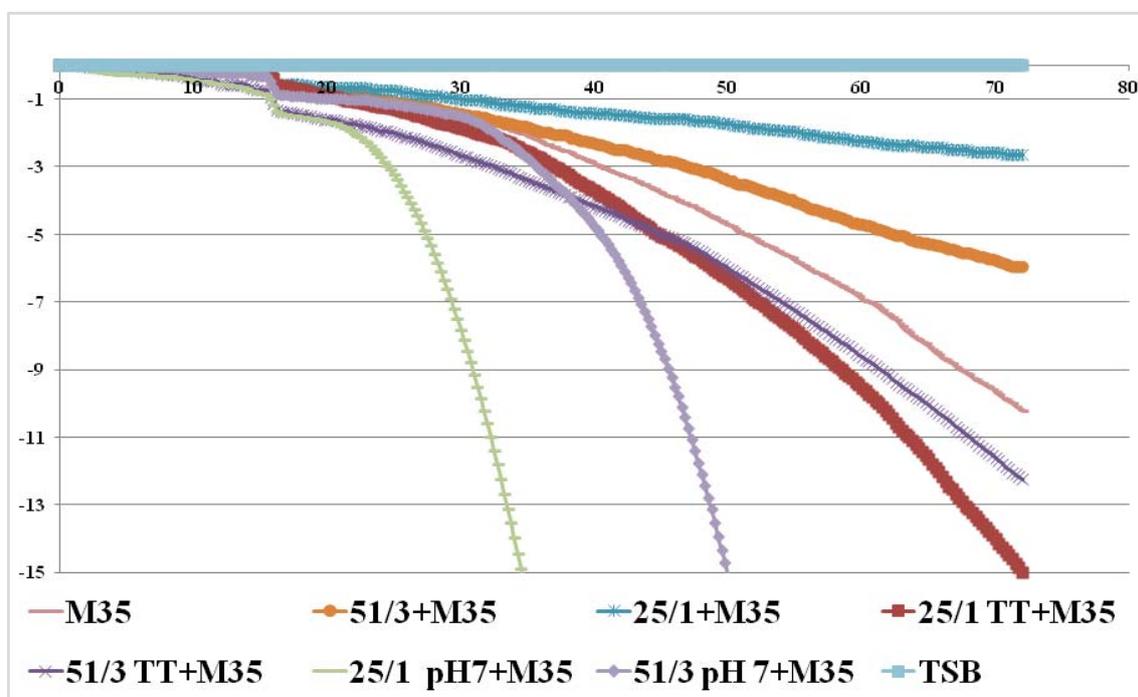


Figura 2. Gráfica obtenida por la medida indirecta de la impedancia de *P. commune* (M35) en presencia de sobrenadantes sin células filtrados de las cepas de BAL, Lp-25/1 (*Lactobacillus paracasei*) y Lc-51/3 (*Lactobacillus casei*) sometidos a dos tratamientos distintos (TT, tratamiento térmico; pH 7, neutralizados). Eje Y, medida eléctrica; eje X, tiempo en horas.

Tabla 3. Tiempo de detección de crecimiento de las muestras.

Muestras	Contenido	Tempo de detección
M35	Medio de cultivo TSB y suspensión de <i>P. commune</i>	2 horas
51/3+M35	Sobrenadante de Lc-51/3 y suspensión de <i>P. commune</i>	15 horas
25/1+M35	Sobrenadante de Lp-25/1 y suspensión de <i>P. commune</i>	15 horas
25/1 TT+M35	Sobrenadante de Lp-25/1 con tratamiento térmico y suspensión de <i>P. commune</i>	15 horas
51/3 TT+M35	Sobrenadante de Lc-51/3 con tratamiento térmico y suspensión de <i>P. commune</i>	15 horas
25/1 pH7+M35	Sobrenadante de Lp-25/1 neutralizado y suspensión de <i>P. commune</i>	2 horas
51/3 pH7+M35	Sobrenadante de Lc-51/3 neutralizado y suspensión de <i>P. commune</i>	2 horas
TSB	Medio de cultivo TSB	No hubo crecimiento

M35, *P. commune* M35; Lp-25/1 (*Lactobacillus paracasei*); Lc-51/3 (*Lactobacillus casei*).

Como se ve los filtrados de BAL causaron un retraso significativo en el tiempo de detección de *Penicillium commune*: en la muestra control que contenía solamente la cepa de *P. commune* en caldo el crecimiento ha sido detectado 2 horas después del inicio del experimento, mientras que en los filtrados de Lp-25/1 (*Lactobacillus paracasei*) y Lc-51/3 (*Lactobacillus casei*) los crecimientos fueron detectados con 15 horas, siendo la cepa Lc-25/1 la que más inhibió al hongo. En los filtrados con tratamiento térmico, el tiempo de detección fue igual a los filtrados sin tratamiento (15 horas), lo que indica que este tratamiento no ha alterado el compuesto responsable por la capacidad antifúngica. Sin embargo, el crecimiento en los filtrados que fueron sometidos a neutralización ha empezado al mismo tiempo que en la muestra control que contenía solamente *Penicillium commune*, lo que muestra que la neutralización ha inactivado el compuesto antifúngico y que este posiblemente sea de naturaleza ácida.

Los mecanismos por lo que se produce la inhibición del crecimiento fúngico aún no están totalmente comprendidos. Ya se han identificado un gran número de compuestos de baja peso molecular con propiedades antifúngicas producidos por los *Lactobacillus* durante su crecimiento (Bizani y Brandelli, 2004). Cepas de *Lactobacillus casei* con capacidad antifúngica ya fueron reportadas anteriormente como productoras de un compuesto antifúngico de naturaleza ácida (Tabla 1) por Aunbjerg *et al.* (2015) frente a *Penicillium* spp. y *Penicillium solitum*, frente a *Aspergillus niger*, *Penicillium* sp., *Fusarium graminearum*, *Geotrichum candidum* y *Penicillium digitatum* por Gerez *et al.* (2013) y frente a *Penicillium discolor* (Cabo *et al.*, 2002). Otros autores atribuyeron la actividad antifúngica de esta especie a un efecto sinérgico entre un compuesto de naturaleza ácida y peróxido de hidrógeno (Voulgari *et al.*, 2010) y en otro estudio a un péptido (Gourama y Bullerman, 1997).

Otros estudios utilizando *Lactobacillus paracasei* (Tabla 1) también atribuyeron a los ácidos la capacidad antifúngica frente a *A.niger*, *Penicillium* sp., *Fusarium graminearum*, *Geotrichum candidum* var. *citri-aurantii*, *Penicillium digitatum* (Gerez *et al.*, 2013) y Aunbjerg *et al.* (2015) frente a *Penicillium solitum* y *Penicillium* sp.

En otros experimentos utilizando especies distintas de *Lactobacillus* a las empleadas en este estudio y frente a *Penicillium*, otras especies de hongos y también levaduras, hay hallazgos de naturaleza ácida (Russo *et al.*, 2017; Ryu *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2012) y también de naturaleza proteica (péptido) (Gupta y Srivastava, 2014; Magnusson y Schnürer, 2001). No obstante, aunque hayan sido hallados péptidos con capacidad antifúngica, la mayoría de los compuestos antifúngicos frente al género

Penicillium y otros géneros de hongos identificados hasta el momento son los ácidos. El ácido láctico, ácido acético, ácido propiónico, la reuteriicina (ácido tetrâmico), ácidos grasos y los péptidos podrían tener un efecto específico como la desestabilización de la membrana (A) (Sjögren *et al.*, 2003) y sobre la fuerza motriz protónica (B) (Gänzle y Vogel, 2003; Vandenberg, 1993) de la membrana inhibiendo directamente el crecimiento de mohos y otros microorganismos (Fig. 3).

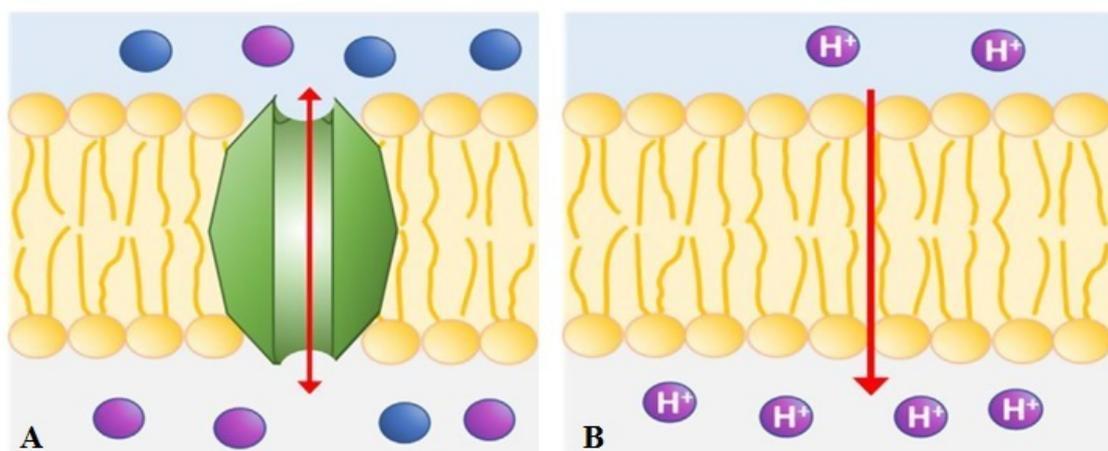


Figura 3. Los diferentes mecanismos inhibidores de los compuestos descritos contra los microorganismos (Sjögren *et al.*, 2003).

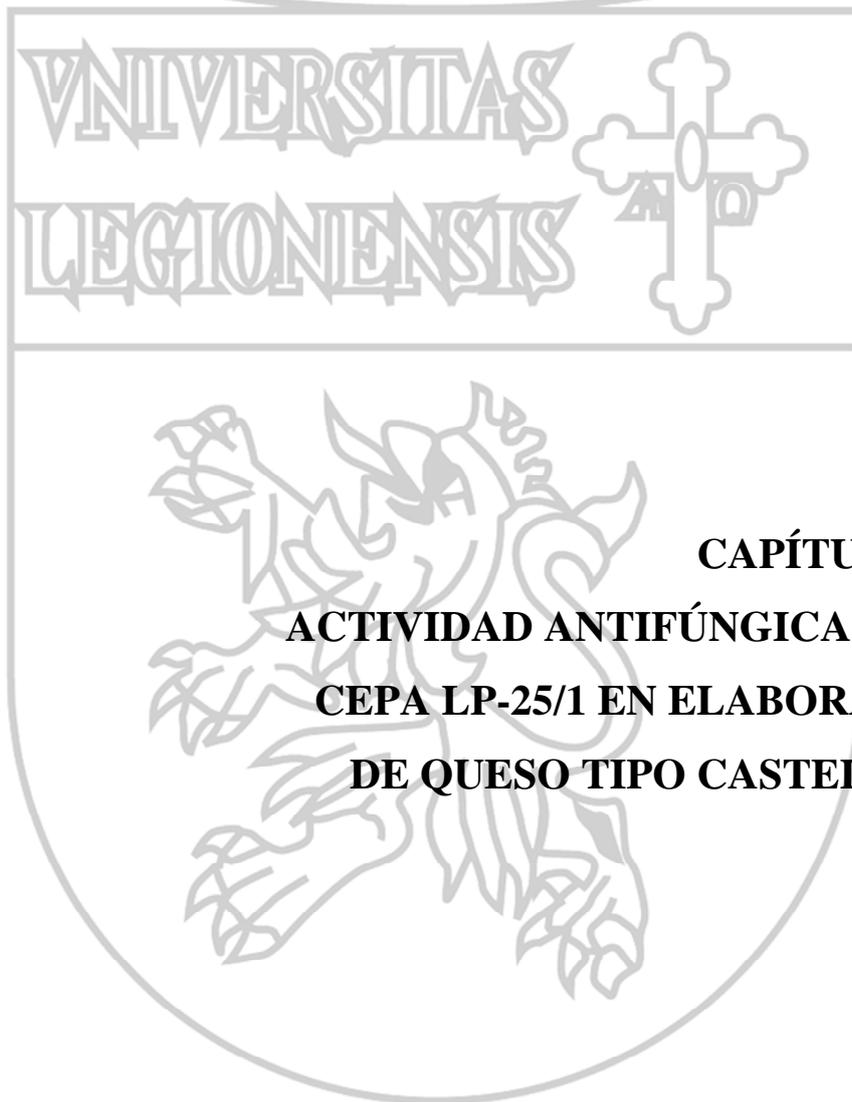
5. CONCLUSIONES

Con el presente estudio se pudo concluir que las cepas Lp-25/1 (*Lactobacillus paracasei*) y Lc-51/3 (*Lactobacillus casei*) fueron capaces de retrasar el crecimiento de *Penicillium commune* y que el principal responsable de esta actividad es de naturaleza ácida. Sin embargo, son necesarios más estudios para identificación de estos ácidos y su acción directamente en hongos.

6. REFERENCIAS

- Alexandraki, V. *et al.*, 2013. Status and trends of the conservation and sustainable use of micro-organisms in food processes. Background Study Paper (FAO).
- Aunbjerg, S.D. *et al.*, 2015. Contribution of volatiles to the antifungal effect of *Lactobacillus paracasei* in defined medium and yogurt. *International Journal of Food Microbiology*, 194(1), pp.46–53.
- Belguesmia, Y. *et al.*, 2013. Characterization of antifungal organic acids produced by *Lactobacillus harbinensis* K.V9.3.1Np immobilized in gellan-xanthan beads during batch fermentation. *Food Control*, 36(1), pp.205-211.
- Bizani, D. & Brandelli, A., 2004. Influence of media and temperature on bacteriocin production by *Bacillus cereus* 8A during batch cultivation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 65(2), pp.158-162.
- Brul, S. & Coote, P., 1999. Preservative agents in foods: Mode of action and microbial resistance mechanisms. *International Journal of Food Microbiology*, 50(1-2), pp.1-17.
- Cabo, M.L., Braber, A.F. & Koenraad, P.M.F.J., 2002. Apparent Antifungal Activity of Several Lactic Acid Bacteria against *Penicillium discolor* Is Due to Acetic Acid in the Medium. *Journal of Food Protection*, 65(8), pp.1309-1316.
- Corsetti, A. *et al.*, 1998. Antimould activity of sourdough lactic acid bacteria: Identification of a mixture of organic acids produced by *Lactobacillus sanfrancisco* CB1. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 50(2), pp.253–256.
- Dalié, D.K.D., Deschamps, A.M. & Richard-Forget, F., 2010. Lactic acid bacteria - Potential for control of mould growth and mycotoxins: A review. *Food Control*, 21(4), pp.370–380.
- Davidson, P.M. & Taylor, T.M., Schmidt, S. E. 2007. Chemical Preservatives and Natural Antimicrobial Compounds. In *Food Microbiology*.
- Delavenne, E. *et al.*, 2012. Biodiversity of antifungal lactic acid bacteria isolated from raw milk samples from cow, ewe and goat over one-year period. *International Journal of Food Microbiology*, 155(3), pp.185–190.
- Gänzle, M.G. & Vogel, R.F., 2003. Studies on the mode of action of reutericyclin. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(2), pp.1305-1307.
- Gerez, C.L. *et al.*, 2013. Control of spoilage fungi by lactic acid bacteria. *Biological Control*, 64(3), pp.231–237.
- Gomensoro, 2017. Equipos y soluciones para laboratorio y proceso - Gomensoro. Available at: <https://www.gomensoro.net/es/> [Accessed April 1, 2019].
- Gourama, H. & Bullerman, L.B., 1997. Anti-aflatoxigenic activity of *Lactobacillus casei pseudoplantarum*. *International Journal of Food Microbiology*, 34(2), pp.131–143.

- Gupta, R. & Srivastava, S., 2014. Antifungal activity of lactic and propionic acid bacteria and their potential as protective culture in cottage cheese. *Food Microbiology*, 78(4), pp.350–356.
- Laitila, A. *et al.*, 2002. Antifungal activities of two *Lactobacillus plantarum* strains against *Fusarium* moulds in vitro and in malting of barley. *Journal of Applied Microbiology*, 93(4), pp.566–576.
- Magnusson, J. & Schnürer, J., 2001. *Lactobacillus coryniformis* subsp. *coryniformis* strain Si3 produces a broad-spectrum proteinaceous antifungal compound. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(1), pp.1–5.
- Russo, P. *et al.*, 2017. *Lactobacillus plantarum* with broad antifungal activity: A promising approach to increase safety and shelf-life of cereal-based products. *International Journal of Food Microbiology*, 247, pp. 48-54.
- Ryu, E.H. *et al.*, 2014. Purification and characterization of antifungal compounds from *Lactobacillus plantarum* HD1 isolated from kimchi. *Food Microbiology*, 41, pp.19-26
- Schillinger, U. & Villarreal, J.V., 2010. Inhibition of *Penicillium nordicum* in MRS medium by lactic acid bacteria isolated from foods. *Food Control*, 21(2), pp.107–111.
- Schwenninger, S.M. & Meile, L., 2004. A mixed culture of *Propionibacterium jensenii* and *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* inhibits food spoilage yeasts. *Systematic and Applied Microbiology*, 27(0723), pp.229–237.
- Siedler, S., Balti, R. & Neves, A.R., 2019. Bioprotective mechanisms of lactic acid bacteria against fungal spoilage of food. *Current Opinion in Biotechnology*, 56, pp.138–146.
- Sjögren, J. *et al.*, 2003. Antifungal 3-Hydroxy Fatty Acids from *Lactobacillus plantarum* MiLAB 14. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(12), pp.7554-7557.
- Stiles, M.E., 1996. Biopreservation by lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 70(2–4), pp.331–345.
- Vandenbergh, P.A., 1993. Lactic acid bacteria, their metabolic products and interference with microbial growth. *FEMS Microbiology Reviews*, 12(1-3), pp.221-237.
- Viljoen, B.C., 2001. The interaction between yeasts and bacteria in dairy environments. In *International Journal of Food Microbiology*, 69(1-2), pp.37-44
- Voulgari, K. *et al.*, 2010. Antifungal activity of non-starter lactic acid bacteria isolates from dairy products. *Food Control*, 21(2), pp.136–142.
- Wang, H.K. *et al.*, 2012. Production and characterization of antifungal compounds produced by *Lactobacillus plantarum* IMAU10014. *PLoS ONE*, 7(1), e29452.



**CAPÍTULO VI.
ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE LA
CEPA LP-25/1 EN ELABORACIÓN
DE QUESO TIPO CASTELLANO**

1. INTRODUCCIÓN

España posee 6918 explotaciones de producción de leche de oveja, 539 miles de toneladas fueron entregadas en la industria en 2016 en su mayoría para producción de quesos, en el mismo año España fue responsable por un 30% de la producción de queso puro de oveja y por un 39% del queso de mezcla producidos en toda Unión Europea (MAPAMA, 2018).

Según el Real Decreto 1113/2006 (Real Decreto 1113, 2006) se entiende por queso al 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. El Reglamento (UE) nº 1151/2012 (Reglamento 1151/2012) define el Queso Castellano como un queso graso o extra-graso de coagulación enzimática y de prensado intenso con una larga vida útil, elaborado con leche cruda o pasteurizada de oveja procedente de explotaciones ubicadas en Castilla y León y con una maduración mínima de 30 días para quesos.

Como ocurre con muchos otros productos lácteos y se ha mencionado con anterioridad, el queso es susceptible al deterioro por contaminantes microbianos, especialmente hongos y en particular especies de los géneros *Penicillium*, *Cladosporium*, *Mucor*, *Aspergillus* y *Geotrichum* (Ledenbach y Marshall, 2009; Pitt y Hocking, 2009). Los defectos resultantes en el producto incluyen el crecimiento visible del moho en la superficie, que puede producir cambio de coloración, sabores desagradables (Rowe y Donaghy, 2011) y en algunos casos micotoxinas (Gourama y Bullerman, 1997).

En nuestro estudio hemos comprobado el predominio de *Penicillium commune* en la alteración de quesos tipo Castellano. Esta especie es capaz de crecer a baja temperatura, actividad de agua reducida y bajas concentraciones de oxígeno (Stark, 2007).

En la mayoría de los países, la natamicina y / o los sorbatos son los únicos agentes antimicóticos aprobados para el tratamiento de la superficie de quesos y embutidos secos (Stark, 2007). Sin embargo, estos tratamientos se aplican principalmente en la superficie y con frecuencia surgen cepas resistentes, *P. commune*

es la especie más problemáticas del género *Penicillium* en este tipo de alimento y es especialmente resistente a los sorbatos (Brul y Coote, 1999; Viljoen, 2001).

Las bacterias del ácido láctico y las bacterias del ácido propiónico son los grupos microbianos más comúnmente utilizados como cultivos protectores, ya que están presentes en los alimentos fermentados y tienen un largo historial de uso seguro. Varios bio-ingredientes están comercialmente disponibles y siendo utilizados como inhibidores de microorganismos del deterioro y/o para extender la vida útil de los productos lácteos. (Fernandez *et al.*, 2017). Su capacidad de producir moléculas inhibitorias *in situ* y / o para competir con patógenos y los microorganismos que son la causa del deterioro les permiten extender la vida útil y mejorar la seguridad microbiana de los alimentos, contribuyendo así a la salud y reducción de pérdidas económicas (Alexandraki *et al.*, 2013).

Así y todo, la evaluación del potencial de las bacterias ácido-lácticas como cultivo protector antifúngico en productos lácteos sigue siendo escasa (Schwenninger y Meile, 2004; Garcha y Natt, 2012; Lynch *et al.*, 2014; Cheong *et al.*, 2014; Aunsbjerg *et al.*, 2015; Sedaghat *et al.*, 2016; Fernandez *et al.*, 2017).

2. OBJETIVOS

Comprobar la utilidad de una cepa de BAL seleccionada investigada directamente en el queso, mediante fabricaciones de queso tipo Castellano realizadas a pequeña escala, para el desarrollo de un cultivo protector antifúngico útil para la industria quesera.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. EFECTO DE BAL EN EL CRECIMIENTO DE *P. COMMUNE* Y *P. NORDICUM* EN CUÑAS Y TROZOS DE QUESO

Antes de la realización de las fabricaciones, se realizaron dos sencillos experimentos basados en Cheong *et al.* 2014 (modificado) con el fin de seleccionar la cepa de BAL más adecuada.

3.1.1. Cepa BAL y cultivos

Se utilizaron las 2 cepas de BAL que presentaron mayor capacidad antifúngica (Lp-25/1 de la especie *Lactobacillus paracasei* y Lc-51/3 de *Lactobacillus casei*; ver Cap. IV y V). Éstas fueron probadas frente a las 2 cepas de *Penicillium* empleadas en

experimentos anteriores (*P. nordicum* M32-CECT 20939 y *P. commune* M35-CECT 20940). Los aislados de BAL fueron cultivados en el caldo MRS por 48 h a 30 ° C. Después de la incubación, 2 mL fueron centrifugados durante 1 min para obtener sedimento de células bacterianas. El sobrenadante fue descartado y las células bacterianas se suspendieron con agua de peptona (0,1%), para obtener un número estándar de células utilizando la escala de Mc Farland como referencia. Se estima que cada suspensión de BAL contenía $1,5 \times 10^9$ ufc/mL (5 en la escala de Mc Farland).

3.1.2. Inóculos fúngicos

Los inóculos fúngicos se prepararon por suspensión de las esporas de los hongos cultivados en frascos de agar de extracto de malta (MEA, Oxoid) inclinado a 25 ° C durante 7 días. La concentración de esporas se determinó en cámara de Neubauer y se ajustó a 4 log/mL (ver Anexo I).

3.1.3. Inoculación de las cuña/trozos de queso

Se inocularon cuñas de doce gramos de queso tipo Castellano (peso aproximado) adquiridas en el comercio (de 20 días de maduración, producidos a base de leche pasteurizada) depositadas en placas de Petri con 0,1 mL de suspensión de la cepa de BAL a ser probada. Igualmente, se realizó un experimento con queso fresco troceado (aprox. 12 g). A continuación, las placas se incubaron a una temperatura de 25 ° C durante 48 horas. Una vez transcurrido ese tiempo, las cuñas se inocularon con 0,1 mL de la suspensión de los hongos, al mismo tiempo que se inocularon 0,1 mL a los controles positivos (muestras de quesos sin cultivo de BAL).

La incubación se realizó durante 27 días a 25 ° C, realizándose fotografías, y al final del período el resultado se determinó en función de los siguientes criterios:

- (1) No crecimiento de hongo.
- (2) Pequeñas manchas de hongo.
- (3) Manchas de tamaño moderado.
- (4) Completamente cubierto de hongo.

Una vez seleccionada la cepa 25/1, se llevó a cabo una fabricación de quesos tipo Castellano (1 Kg) en pequeña escala en la Universidad de León y una prueba en la empresa colaboradora (Industrias Lácteas Manzano, Valderas, León). En ambos casos se utilizó la cepa *P. commune* M35, ya que esta especie fue la mayoritaria en nuestro

estudio (Cap. II) y es la más problemática en este tipo de quesos como ya se ha indicado.

3.2. FABRICACIÓN DE QUESO EN LA UNIVERSIDAD DE LEÓN (FABRICACIÓN A)

3.2.1. Cepa BAL y cultivos

La cepa Lp-25/1 (*Lactobacillus paracasei*) fue la utilizada procedente de una muestra de leche de cabra (tal y como se señala en los Capítulos IV y V) seleccionada a partir de un conjunto de cepas teniendo en cuenta su mejor comportamiento frente actividad antifúngica y antimicrobiana y en base al experimento 3.1. La cepa de *Lactobacillus paracasei* fue recuperada a partir de un cultivo almacenado a -30 °C en caldo *Man, Rogosa and Sharpe* - Oxoid (MRS) /20% de glicerol e incubada a 37 °C en caldo MRS durante 24 horas. Para la preparación del inóculo, la cepa Lp-25/1 fue sembrada en placas de agar MRS durante 48 horas; después de la incubación, se obtuvo una suspensión de los cultivos en agua peptonada (0,1%) y se utilizó en una concentración aproximada de 3×10^9 ufc/mL (10 en la escala de Mc Farland). Para la preparación del cultivo, se añadió 1 mL de la suspensión descrita en 100 mL de leche de oveja esterilizada para obtener una concentración final de aproximadamente 3×10^7 ufc/mL, seguido de una incubación de 24 horas a 37 °C.

El cultivo iniciador comercial utilizado en la fabricación del queso en la empresa colaboradora estaba compuesto por cepas liofilizadas de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* y *Streptococcus thermophilus* (CHOOZITTM MA 4001 LYO 5 DCU, Danisco, Sassenage, Francia). Su preparación inicial se llevó a cabo en el día anterior a la elaboración de los quesos, disolviendo un sobre del fermento en 1 litro de leche desnatada estéril, seguido de una incubación de 24 horas a 37 °C.

3.2.2. Proceso de elaboración del queso

La producción del queso fue dividida en dos lotes: (I) queso elaborado a partir de leche de oveja pasteurizada e inoculada solamente con el cultivo comercial y (II) queso con el cultivo comercial y el cultivo de Lp-25/1.

Para la fabricación de cada lote, se utilizaron 10 litros de leche pasteurizada de oveja, ordeñada y pasteurizada en el día, que fueron obtenidos de una granja perteneciente al Consorcio de Promoción del Ovino (León, España). La elaboración de los quesos se describe a continuación:

- Primeramente, la leche fue pasteurizada a temperatura de 72-73 °C en un tiempo de 15 a 20 segundos en el pasteurizador (Alfa- Laval/ España) que está en la planta primera de la Facultad de Veterinaria (Universidad de León, Área de Tecnología de los Alimentos).
- Posteriormente, la leche fue vertida en una olla, donde fue calentada hasta 30 °C con agitación continua.
- Se añadió 1,25 mL de cloruro de calcio (Laboratorios Arroyo, Santander, España) por 10 litros de leche.
- Enseguida, se subió la temperatura a 37 °C y se añadió el cultivo iniciador en una concentración de 1%. Para los quesos inoculados con la cepa de Lp-25/1, se añadieron además del cultivo iniciador comercial, 100 mL del cultivo de Lp-25/1, alcanzando una concentración final de 3×10^3 ufc/mL. Posteriormente, la leche fue mantenida en una estufa a 37 °C hasta que su pH descendió 0,1 unidades (unos 40 minutos).
- El cuajo (Laboratorios Arroyo, Santander, España; 1:10.000) fue añadido en una proporción de 3 mL de cuajo por 10 litros de leche, diluido en 50 mL de agua estéril para facilitar su distribución. La leche fue agitada durante un minuto, luego se volvió poner en una estufa a 37 °C durante 40 minutos, hasta la formación óptima de la cuajada.
- Para el desuerado de la cuajada, ésta fue cortada y homogeneizada hasta que trozos del tamaño de un grano de arroz, simultáneamente se aumentó la temperatura a 38 °C para facilitar el desuerado.
- Finalizado el proceso de desuerado, la cuajada fue colocada en moldes cilíndricos para quesos de 1 kg, donde se realizaron dos prensados. El primero con 0,01 kg/cm² durante una hora. Posteriormente se realizó el volteado del queso y un segundo prensado de 0,03 kg/cm² durante 5 horas.
- Transcurridas las 6 horas de prensado, los quesos se introdujeron en una salmuera a 20% de NaCl y con el pH ajustado con ácido láctico a un valor similar al de los quesos. Fueron mantenidos en salmuera durante 6 horas temperatura de refrigeración (7±1 °C). Terminado el salado, los quesos se dejaron a temperatura ambiente (20-24 °C) para escurrir durante 24 horas.
- La maduración fue realizada en una cámara a 10-12 °C, con una humedad de 85-90% durante 1 mes. Durante la maduración se voltearon los quesos regularmente para conseguir una distribución homogénea de la sal.

Los valores de pH, temperatura y sal seleccionados lo son en función de las condiciones de maduración del queso Castellano (información facilitada por la empresa colaboradora). La identificación de los quesos se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. Identificación de los quesos producidos en la Universidad de León (fabricación A).

Identificación Fabricación A	Cultivo	Inóculo de <i>P. commune</i> M35
Queso 1A	Comercial	Con inóculo
Queso 2A	Comercial	
Queso 3A	Comercial + Lp-25/1	
Queso 4A	Comercial + Lp-25/1	
Queso 5A	Comercial	Sin inóculo
Queso 6A	Comercial	
Queso 7A	Comercial + Lp-25/1	
Queso 8A	Comercial + Lp-25/1	

3.2.3. Inóculo fúngico

En los quesos que recibieron un inóculo fúngico (Tabla 1), se utilizó la cepa *P. commune* M35. La cepa se cultivó en frascos de agar inclinado (MEA) durante 7 días a 25 °C. A partir de los cultivos, se preparó una suspensión de esporas, añadiendo a los frascos 5 mL de una solución de Tween 80 al 0,05% estéril hasta conseguir una concentración de 10³ esporas/mL (recuento en cámara de Neubauer; Anexo I). A continuación, se inoculó la superficie de los queso con 7,5 mL de esta suspensión con la ayuda de una asa de vidrio acodado desechable. La concentración final fue de 500 esporas/g de queso (Cheong *et al.*, 2014) modificado (ajustada en cámara de Neubauer, ver Anexo I).

3.2.4. Monitorización del crecimiento fúngico

Se sacaron fotografías en los días de las tomas de muestras (0, 7, 15, y 30 días) para evaluar el crecimiento fúngico y evaluar un posible efecto antifúngico de la cepa Lp-25/1.

3.3. FABRICACIÓN DE QUESOS EN LA EMPRESA COLABORADORA (FABRICACIÓN B)

Se fabricaron 2 lotes de quesos según el protocolo de la empresa, el primero llevaba solo el cultivo inicial de la industria (*Lactococcus lactis* subespecie. *cremoris*, *Lactococcus lactis* subespecie *Lactis*, *lactococcus lactis* subespecie. *lactis* biovar *diacetyllactis*, *Leuconostoc* y *Streptococcus thermophilus*) y el segundo, además del cultivo inicial, el cultivo de Lp-25/1 (*Lactobacillus paracasei*) que fue preparado como se ha descrito en el paso 3.1.1 y utilizado en la misma concentración (1%) del paso 2.1.2. Los quesos se enviaron a la Universidad de León y llegaron en las 72 horas después de su fabricación, identificándose como se indica en la Tabla 2, separándolos en 3 lotes (Figuras 1, 2 y 3). Los quesos de números 8 y 10 que no están en las figuras de los lotes fueron utilizados como controles negativos.

Tabla 2. Identificación de los quesos producidos en la empresa colaboradora (fabricación B).

Identificación Fabricación B	Cultivo	Inóculo <i>P. commune</i> M35
Queso 1B	Comercial	Con inóculo
Queso 2B	Comercial	
Queso 3B	Comercial	
Queso 4B	Comercial + Lp-25/1	
Queso 5B	Comercial + Lp-25/1	
Queso 6B	Comercial + Lp-25/1	
Queso 7B	Comercial	Sin inóculo
Queso 8B	Comercial	
Queso 9B	Comercial+ Lp-25/1	
Queso 10B	Comercial + Lp-25/1	

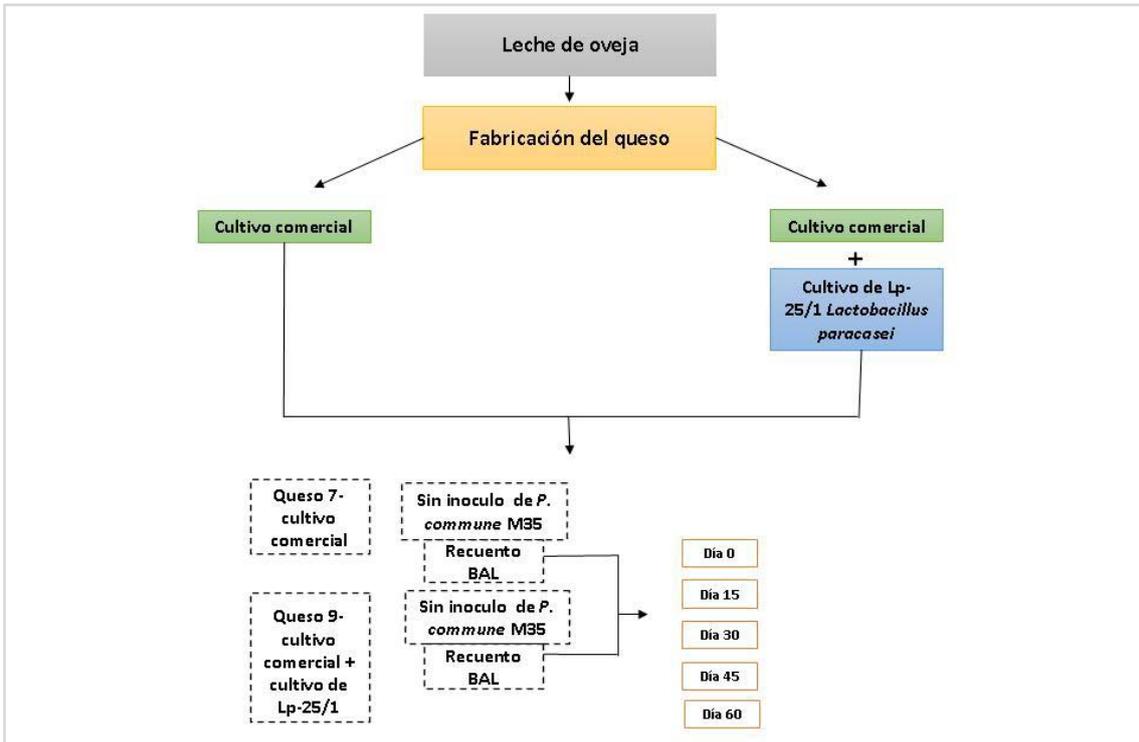


Figura 1. Lote 1- Quesos con y sin Lp-25/1 sin inóculo de *Penicillium commune* y fechas de los recuentos de BAL.

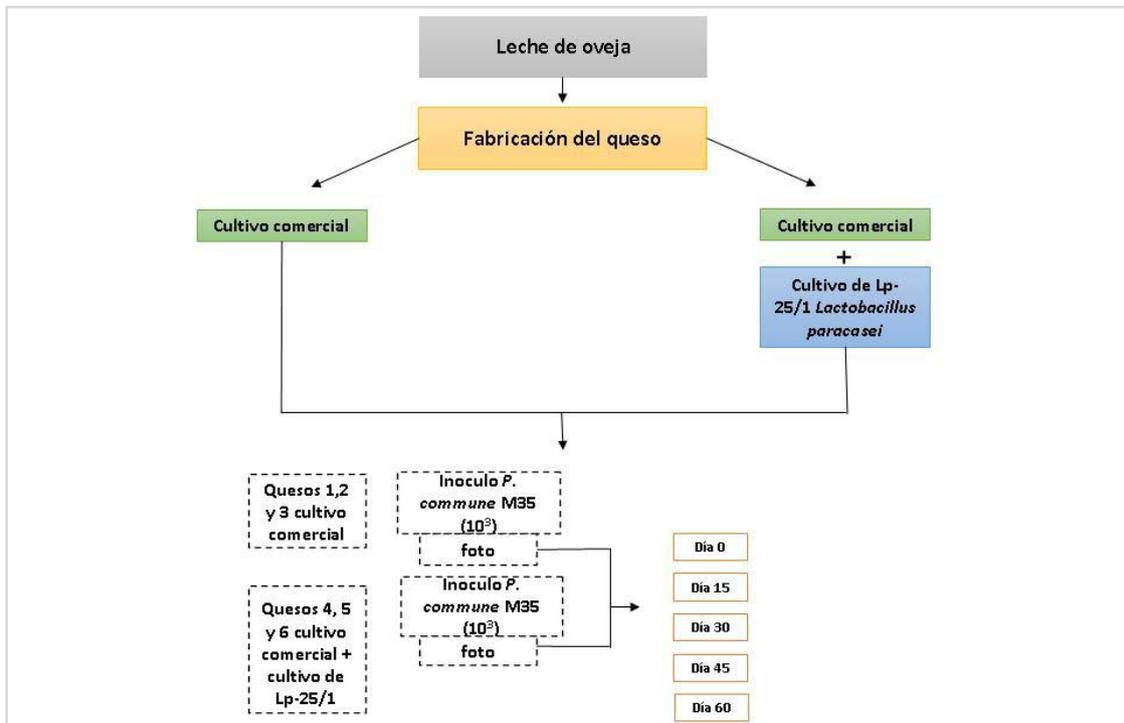


Figura 2. Lote 2- Quesos con y sin Lp-25/1 con inóculo de *Penicillium commune* y fechas de las fotos.

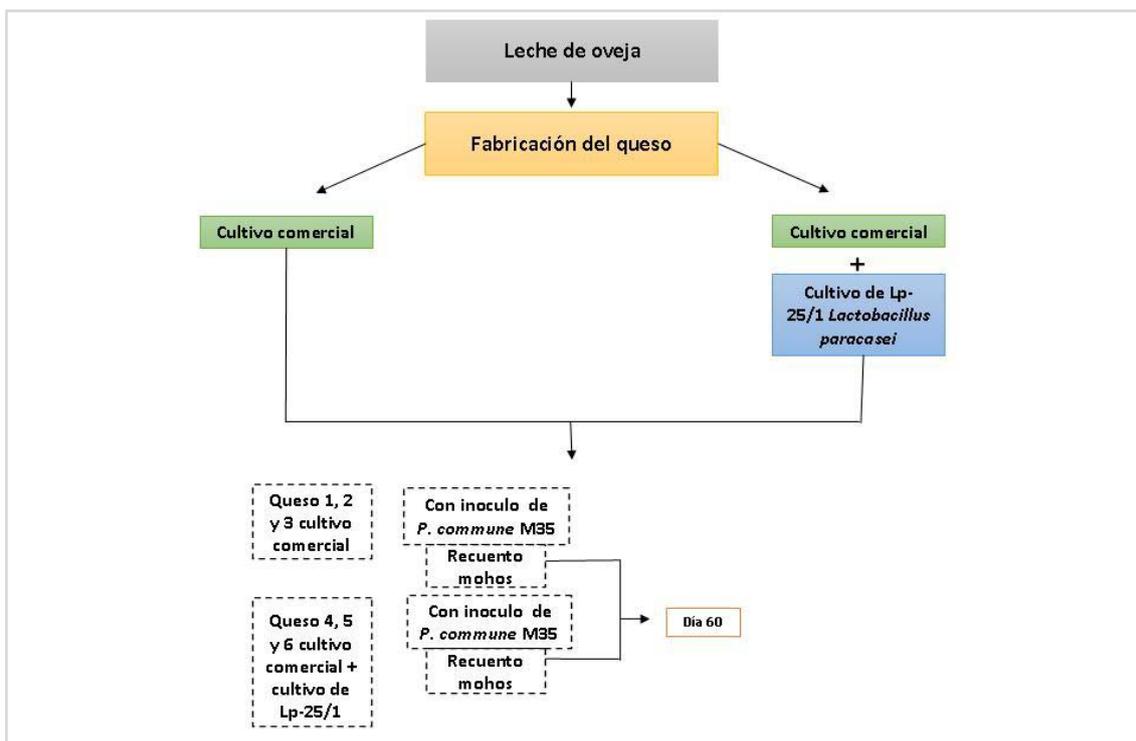


Figura 3. Lote 3- Quesos con y sin Lp-25/1 con inóculo de *Penicillium commune* y fechas de los recuentos de mohos.

3.3.1. Inóculo fúngico

En los quesos que recibían en inóculo fúngico se utilizó la misma cepa y técnica que la indicada en el apartado 3.1.3, solo que la concentración final fue de 5 esporas/g de queso (Cheong *et al.*, 2014) modificado (ajustada en cámara de Neubauer, ver Anexo I).

3.3.2. Toma de muestras

Se tomaron muestras en los siguientes momentos del proceso de maduración del queso:

- La toma de muestras fue en los días 0, 15, 30, 45 y 60. Cada condición del estudio estaba compuesta por dos quesos y de cada queso se tomaron 1 muestra en cada momento, es decir, en total se realizaron 3 análisis para cada momento en las distintas condiciones.

Las tomas de muestras fueron realizadas con un sacabocados y el hueco fue rellenado con parafina estéril fundida (Acofarma, Barcelona, España) para mantener las condiciones del interior de los quesos.

3.3.3. Análisis físico-químicos

La medición de pH se realizó con un pHmetro de punción Testo 205 (Instrumentos Testo, Lenzkirch, Alemania). El pH fue medido en todas las tomas de muestras por triplicado

3.3.4. Análisis microbiológicos

3.3.4.1. Recuento de BAL

Se llevó a cabo un recuento de BAL en los 4 momentos de la toma de muestra. Una fracción de 10 g se colocó en una bolsa de homogeneización estéril a la que se añadieron 90 mL de solución salina al 0,85% con peptona al 0,1%, obteniendo una dilución de 1:10. Esta mezcla fue homogeneizada en un homogeneizador BagMixer-400 (Interscience, Saint-Nom-la-Bretèche, Francia) durante 180 segundos y a partir del homogeneizado se realizaron las oportunas diluciones decimales con solución salina peptonada. Para el recuento de las bacterias ácido-lácticas se sembraron 0,1 mL de las diluciones del homogenizado en superficie de placas de agar MRS (*Man, Rogosa and Sharpe* - OXOID), posteriormente se incubaron en anaerobiosis (con jarra y sobres de anaerobiosis OXOID) a 30 °C durante 48 horas (Nero *et al.*, 2008).

3.3.4.2. Recuento de mohos

Se realizó un recuento de mohos al final del período de maduración para evaluar si hubo una diferencia en los recuentos de los quesos con o sin la presencia de Lp-25/1. Una fracción de 10 g de la corteza del queso se colocó en una bolsa de homogeneización estéril a la que se añadieron 90 mL de solución citrato sódico al 2%, obteniendo una dilución de 1:10. Esta mezcla fue homogeneizada en un homogeneizador BagMixer-400 (Interscience, Saint-Nom-la-Bretèche, Francia) durante 180 segundos y a partir del homogeneizado se realizaron las oportunas diluciones decimales con solución salina peptonada. Para el recuento de hongos y levaduras se sembraron 0,1 mL de las diluciones del homogenizado en superficie de placas de agar Cloranfenicol Glucosa (GCA, Scharlab, España), incubándose las placas a 25 °C durante 5 días.

3.3.5. Análisis estadístico

Los datos de los recuentos de BAL y de mohos y levaduras fueron transformados en log₁₀. Las diferencias entre los efectos se evaluaron mediante la

prueba de Tukey ($p < 0,05$). Para los análisis estadísticos se utilizó el programa IBM SPSS Statistics for Windows, Version 24.0 (IBM Corp., Armonk, NY, EE.UU.).

3.3.6. Monitorización del crecimiento fúngico

Se sacaron fotografías en los días de las tomas de muestras (0, 7, 15, 30, 45 y 60 días) para evaluar el crecimiento fúngico y evaluar un posible efecto antifúngico de la cepa Lp-25/1.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En las Fotos 12-15 del Anexo II se muestran los resultados del experimento realizado en cuñas y trozos de queso. Se puede comprobar el crecimiento de los hongos en las cuñas sin BAL (crecimiento nivel 4) y claramente el efecto inhibitor de ambas cepas de BAL en ambas especies de *Penicillium* (Fotos 12 y 13). Frente a *P. nordicum* el crecimiento con las dos cepas de BAL sería de nivel 2. En el caso de la cepa 25/1 frente a *P. commune* el crecimiento sería nivel 2, mientras que para 51/3 sería nivel 3 (Foto 13). En la Foto 14 se observa el evidente efecto inhibitor de la cepa 25/1 sobre ambas cepas de *Penicillium*.

En función de estos resultados, para las fabricaciones, se decidió seleccionar la cepa de *L. paracasei* 25/1 y la cepa de *P. commune* M35 (que es la más problemática en este tipo de quesos), para las fabricaciones.

En la Foto 1 se muestra el queso 1A de la fabricación realizada en la Universidad de León inmediatamente después de recibir el inóculo con M35. El crecimiento del hongo en el queso 1A (sin Lp-25/1) empezó al día 4 y al día 18 ya estaba totalmente cubierto (Foto 2). En el queso 3A (Con Lp-25/1) se observó un crecimiento fúngico visible al día 14, pero hasta el día 30 (fin del período de maduración) el queso no se presentó cubierto por el crecimiento del hongo, lo que muestra que la cepa de BAL utilizada fue capaz de inhibir el crecimiento de forma significativa (Foto 3).



Foto 1. Queso 1A fabricado en la Universidad de León solamente con el cultivo industrial, justo después de serle aplicado el inóculo de *Penicillium commune* (día 0).



Foto 2. Queso 1A fabricado en la Universidad de León solamente con cultivo de BAL industrial e inoculado con *Penicillium commune* con 30 días de maduración.



Foto 3. Queso 3A fabricado en la Universidad de León con cultivo industrial y de la cepa Lp-25/1 e inoculado con *Penicillium commune* con 30 días de maduración.

En la medición del pH en los quesos fabricados en la empresa, el pH del queso 7 (sin Lp-25/1) ha permanecido más bajo en todas las evaluaciones en comparación con el queso 9 (con Lp-25-1), lo que se justifica por la producción de ácido por *Lactobacillus paracasei* (Tabla 3).

Tabla 3. Evolución del pH de los quesos 7B y 9B fabricados en la empresa colaboradora en 5 momentos distintos.

	pH				
	0 día	15 días	30 días	45 días	60 días
Queso 7B (sin cultivo antifúngico)	5,08	4,98	4,77	4,90	4,95
Queso 9B (con Lp-25/1)	5,02	4,82	4,60	4,80	4,85

Queso 7B (cultivo comercial), queso 9B (cultivo comercial+Lp-25/1).

Los recuentos de BAL tanto en el queso 7B como en el queso 9B han seguido una tendencia muy parecida hasta el tercer momento de análisis (30 días), cambiando a partir del cuarto (45 días) y permaneciendo en el quinto muestreo (60 días), donde los recuentos en el queso 9 (con Lp-25/1) fueron más altos (Tabla 4).

Tabla 4. Recuentos de BAL (log ufc/mL) de los quesos 7B y 9B fabricados en la empresa colaboradora en 4 momentos de la maduración.

	Recuento de BAL (log ufc/mL)				
	0 día	15 días	30 días	45 días	60 días
Queso 7B (Sin cultivo antifúngico)	8,36	8,73	8,28	8,74	8,79
Queso 9B (con Lp-25/1)	8,81	8,32	8,8	9,26	9,35

Queso 7B (cultivo comercial), queso 9B (cultivo comercial+Lp-25/1).

En la Tabla 5 se observa que hubo diferencia significativa en los recuentos de mohos y levaduras: en los quesos sin el cultivo de Lp-25/1 la media fue 10 veces superior (7,22 log/ufc/g) que en los quesos con Lp-25/1 (6,53 log/ufc/g).

Tabla 5. Recuentos de mohos y levaduras (log ufc/mL) de los quesos fabricados en la empresa colaboradora con o sin la cepa Lp-25/1 inoculados con *Penicillium commune* M35 a los 60 días de maduración.

Con cultivo antifúngico +Lp-25/1			Sin cultivo antifúngico		
Queso 1B	Queso 2B	Queso 3B	Queso 4B	Queso 5B	Queso 6B
6,70	6,30	6,60	7,52	6,90	7,23
Media- 6,53 ^a			Media 7,22 ^b		

Quesos 1B, 2B y 3B (cultivo comercial+Lp-25/1), quesos 4B, 5B y 6B (cultivo comercial). Los valores en la misma fila con letras diferentes son significativamente diferentes (P <0.05).

En la Foto 4 se muestran los quesos 1B, 2B y 3B justo después de la fabricación y en la Foto 5 el queso 3B después de recibir el inóculo de *P. commune*. El proceso de maduración de los quesos sin Lp-25/1 en las distintas fechas (7, 15 y 60 días) se enseña en las Fotos 6, 8 y 10 y en las Fotos 7, 9 y 11 se muestra la maduración de los quesos con Lp-25/1.

El crecimiento del hongo en los quesos 1B, 2B y 3B (sin Lp-25/1) empezó al día 3 mientras que en los quesos 4B, 5B y 6B (con Lp-25/1) no se observó crecimiento de mohos hasta el día 10 (Fotos 6 y 7), lo que indica un efecto parcialmente protector.

En las Fotos 8 y 9 se puede observar el desarrollo del hongo en los 2 lotes (con y sin Lp-25/1) a los 15 días de maduración, comprobándose que en los quesos donde hay la cepa de BAL el crecimiento se ve disminuido.

En la Foto 11 (quesos 4B, 5B y 6B con Lp-25/1), se muestra que Lp-25/1 ha logrado mantener un crecimiento menor de *P. commune* hasta los 60 días de maduración en comparación con los quesos 1B, 2B y 3B (sin Lp-25/1) (Foto 10), lo que evidencia que la presencia de dicha cepa fue capaz de inhibir el crecimiento de forma significativa hasta el final de este experimento.



Foto 4. Quesos fabricados en la empresa colaboradora (fabricación B).



Foto 5. Queso 3B justo después de recibir el inóculo de *P. commune* (día 0).

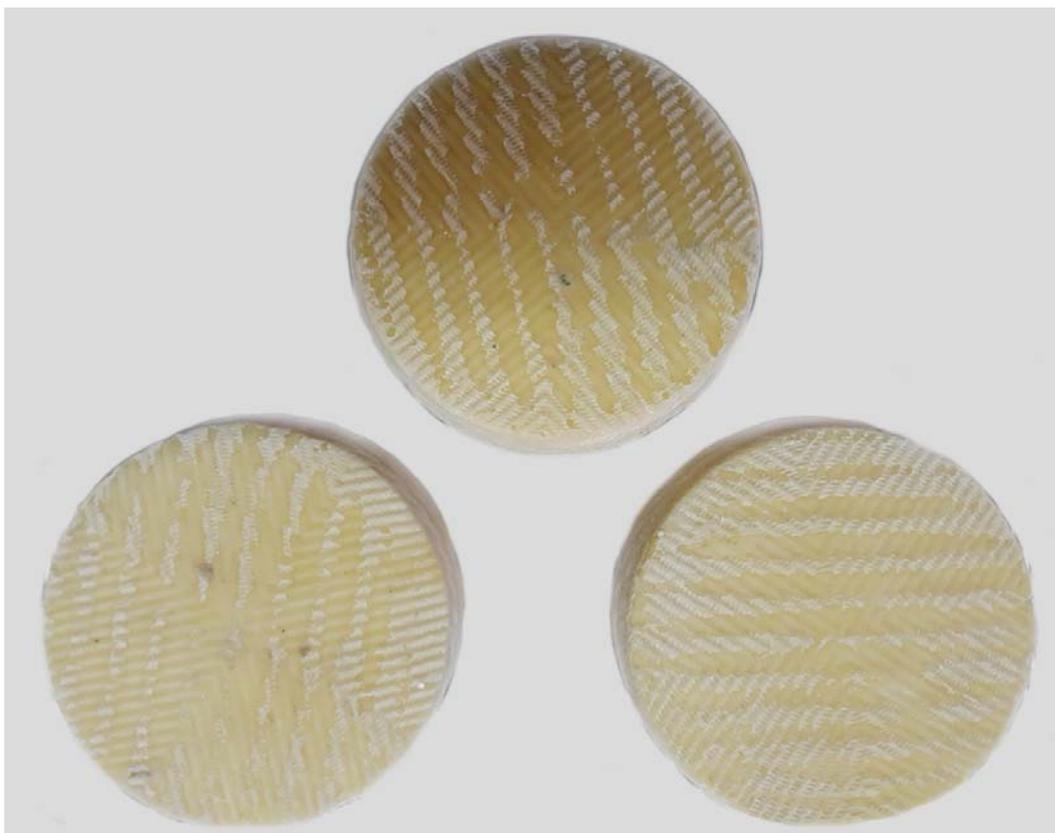


Foto 6. Quesos 1B, 2B y 3B (sin Lp-25/1) inoculados con *P. commune* (7 días).



Foto 7. Quesos 4B, 5B y 6B (con Lp-25/1) inoculados con *P. commune* (7 días).

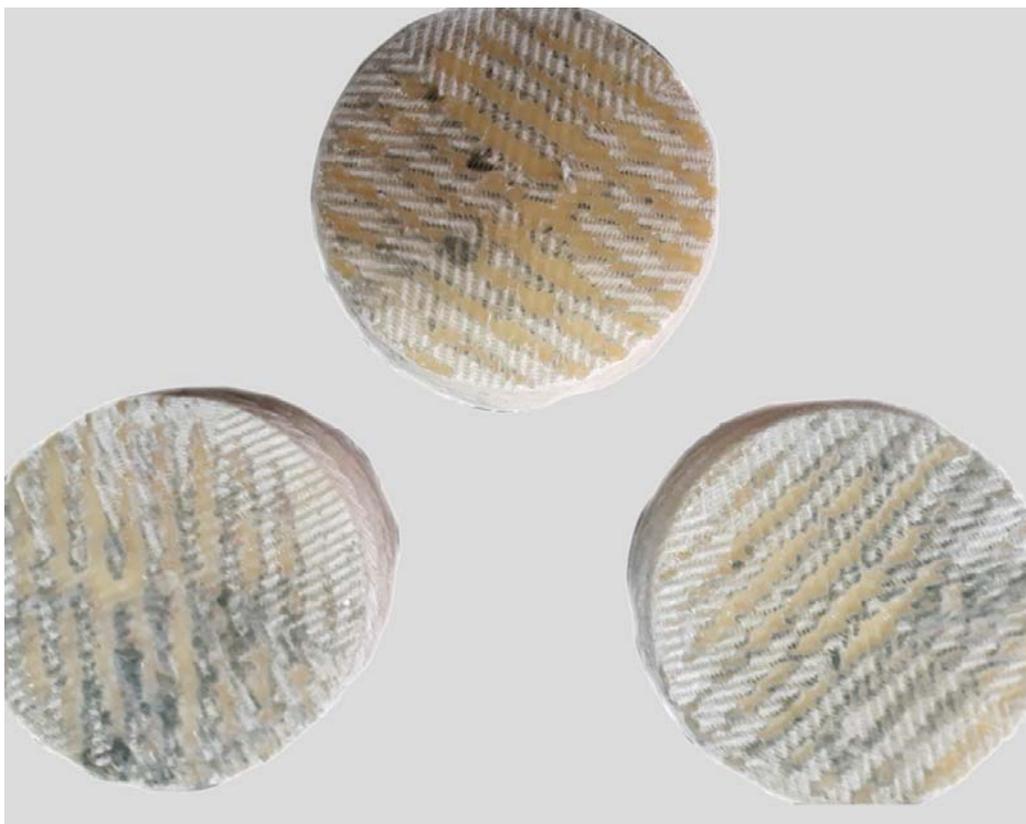


Foto 8. Quesos 1B, 2B y 3B (sin Lp-25/1) inoculados con *P. commune* (15 días).



Foto 9. Quesos 4B, 5B y 6B (con Lp-25/1) inoculados con *P. commune* (15 días).

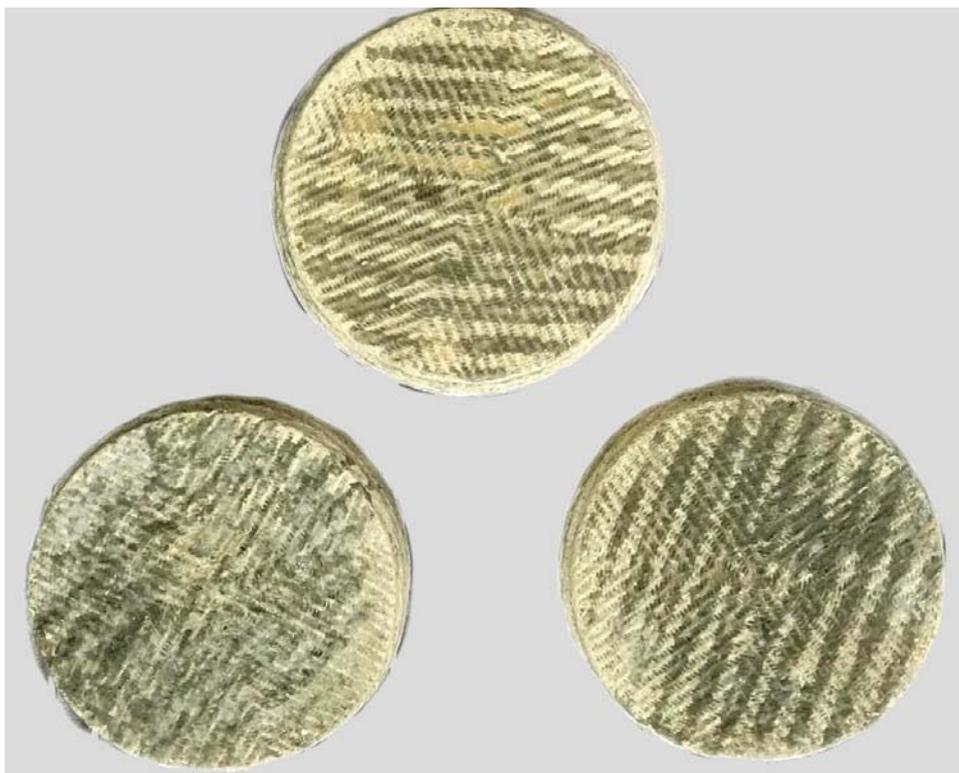


Foto 10. Quesos 1B, 2B y 3B (sin Lp-25/1) inoculados con *P. commune* (60 días).



Foto 11. Quesos 4B, 5B y 6B (con Lp-25/1) inoculados con *P. commune* (60 días).



Foto 12. Fabricación de quesos (A), estufa de maduración.

Nuestros hallazgos frente a *Penicillium commune* fueron parecidos a Cheong *et al.* (2014) quienes probaron en queso fresco la inhibición utilizando cepas de *Lactobacillus plantarum*. Los quesos sin inóculo de BAL presentaron un crecimiento moderado desde el día 4. Se utilizaron distintas cepas de *L. plantarum* y la aparición de crecimiento del moho varió desde 18 días hasta 29 días. Garcha y Natt (2012) probando con *Lactobacillus acidophilus* en un queso fresco que tiene una vida útil de 2-3 días de media frente a *Alternaria alternata* no observaron recuento de hongos en las 48 horas iniciales y después de 6 días de incubación la disminución del recuento en comparación al control sin BAL fue de 45.4%. *Penicillium chrysogenum* fue inhibido en requesón por *Lactobacillus rhamnosus* solo o en combinación con *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* durante al menos 21 días (Fernandez *et al.*, 2017). *Lactobacillus plantarum*, *Lb. casei* y *Lb. pentosus* retrasaron el crecimiento de *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus* en la superficie del queso en 19 y 22 días, respectivamente (Sedaghat *et al.*, 2016). *Penicillium expansum* en queso Cheddar tuvo su aparición retrasada a los 4 días por *Lactobacillus amylovorus* y analizando el efecto antifúngico de este lactobacilo en los hongos naturalmente presentes en el aire el retraso fue de 6 días (Lynch *et al.*, 2014). Utilizando cepas de *Lactobacillus paracasei* la misma especie utilizada en este estudio en yogur, Aunsbjerg *et al.* (2015) han comprobado la inhibición del crecimiento de los hongos *Penicillium solitum* y *Penicillium* sp. por 4 días. Schwenninger y Meile (2004) utilizaron una mezcla de *Lactobacillus paracasei* con

Propionibacterium jensenii frente a las levaduras *Candida pulcherrima*, *Candida magnolia*, *Candida parapsilosis* y *Zygosaccharomyces bailii* en yogur y también en queso. La inhibición del crecimiento fue de 4 semanas y 21 días, respectivamente.

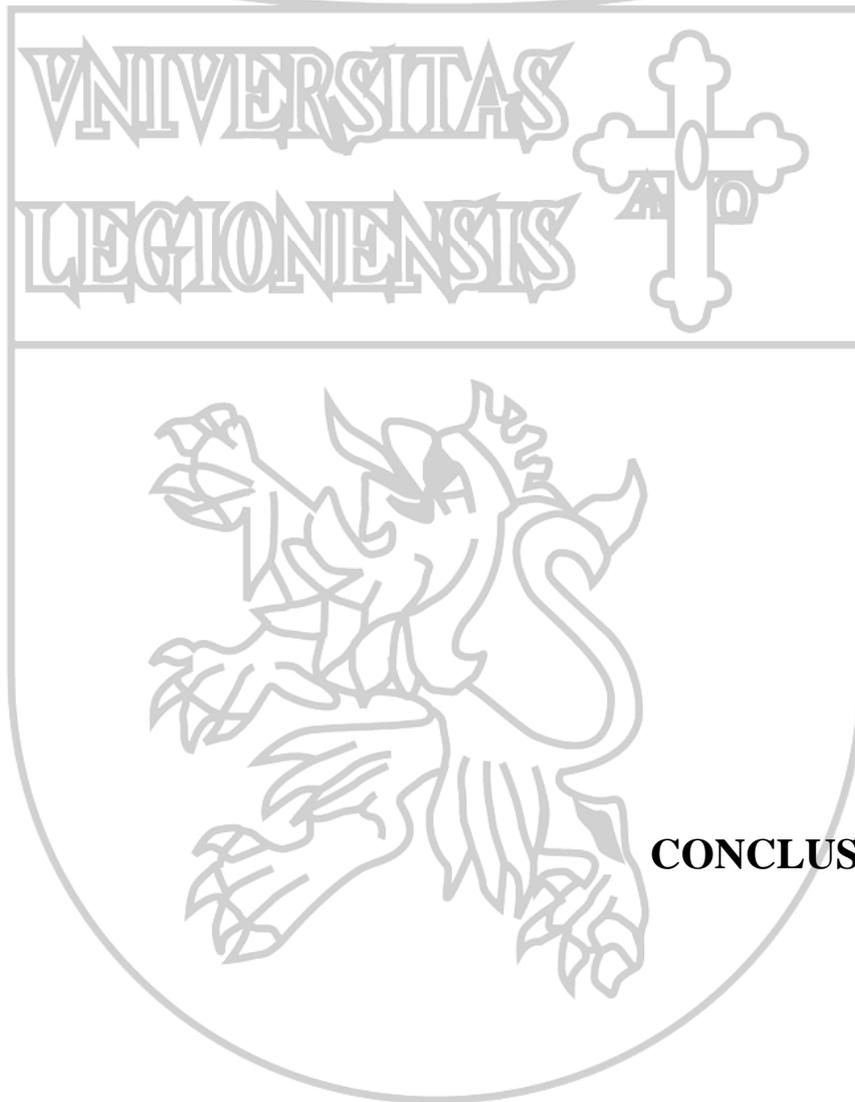
5. CONCLUSIONES

El presente estudio muestra que LP-25/1 (*Lactobacillus paracasei*) aislada de leche de cabra mostró actividad antifúngica en fabricaciones controladas de queso tipo Castellano incorporada como parte del cultivo iniciador, retrasando el crecimiento de *Penicillium commune*, lo que indica su potencial para el control del deterioro de mohos en queso. Son necesarias investigaciones futuras adicionales para identificar la concentración inhibitoria mínima, así como la caracterización de los compuestos antifúngicos de BAL, lo que puede ayudar a comprender la actividad antifúngica en este caso específico. Se deben realizar estudios para explorar otros métodos de aplicación (como la pulverización del cultivo en superficie), la evaluación de la parte sensorial para saber si Lp-25/1 o sus compuestos antifúngicos impartirían sabores indeseables en el queso.

6. REFERENCIAS

- Alexandraki, V. *et al.*, 2013. Status and trends of the conservation and sustainable use of micro-organisms in food processes. Background Study Paper (FAO).
- Aunbjerg, S.D. *et al.*, 2015. Contribution of volatiles to the antifungal effect of *Lactobacillus paracasei* in defined medium and yogurt. *International Journal of Food Microbiology*, 194, pp.46–53.
- Brul, S. & Coote, P., 1999. Preservative agents in foods: Mode of action and microbial resistance mechanisms. *International Journal of Food Microbiology*, 50(1-2), pp.1-17.
- Cheong, E.Y.L. *et al.*, 2014. Isolation of lactic acid bacteria with antifungal activity against the common cheese spoilage mould *Penicillium commune* and their potential as biopreservatives in cheese. *Food Control*, 46, pp.91–97.
- Fernandez, B. *et al.*, 2017. Antifungal activity of lactic and propionic acid bacteria and their potential as protective culture in cottage cheese. *Food Control*, 78, pp.350–356.
- Garcha, S. & Natt, N.K., 2012. In situ control of food spoilage fungus using *Lactobacillus acidophilus* NCDC 291. *Journal of Food Science and Technology*, 49(5), pp.643–648.
- Gourama, H. & Bullerman, L.B., 1997. Anti-aflatoxigenic activity of *Lactobacillus casei pseudoplantarum*. *International Journal of Food Microbiology*, 34(2), pp.131–143.
- Ledenbach, L.H. & Marshall, R.T., 2009. *Compendium of the Microbiological Spoilage of Foods and Beverages*. Food Microbiology and Food Safety. Springer, New York, NY.
- Lynch, K.M. *et al.*, 2014. Application of *Lactobacillus amylovorus* as an antifungal adjunct to extend the shelf-life of Cheddar cheese. *International Dairy Journal*, 34(1), pp.167–173.
- MAPAMA, 2018. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Available at: <https://www.mapa.gob.es/es/> [Accessed April 3, 2019].
- Nero, L.A. *et al.*, 2008. *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. in raw milk produced in Brazil: Occurrence and interference of indigenous microbiota in their isolation and development. *Zoonoses and Public Health*, 55(6), pp.299-305.
- Pitt, J.I. & Hocking, A.D., 2009. *Fungi and Food Spoilage*, (Vol. 519), New York: Springer US.
- Real Decreto 1113/2006, de 6 de octubre de 2006, por el que se aprueban las normas de calidad para quesos y quesos fundidos. *Boletín Oficial del Estado*. núm. 239, p.34717-34720.
- Reglamento (UE) nº 1151/2012 del Parlamento Europeo y del Consejo de 21 de noviembre de 2012 sobre los regímenes de calidad de los productos agrícolas y alimenticios.

- Rowe, M. & Donaghy, J., 2011. Microbiological Aspects of Dairy Ingredients. In Dairy Ingredients for Food Processing. Oxford, UK: Wiley-Blackwell, pp. 59–101.
- Schwenninger, S.M. & Meile, L., 2004. A mixed culture of *Propionibacterium jensenii* and *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* inhibits food spoilage yeasts. *Systematic and Applied Microbiology*, 27(0723), pp.229–237.
- Sedaghat, H. *et al.*, 2016. Application of non-starter lactic acid bacteria as biopreservative agents to control fungal spoilage of fresh cheese. *International Dairy Journal*, 56, pp.87–91.
- Stark, J., 2007. Cheese and fermented sausages. In C. Press, ed. *Food Microbiology: A Multifaceted Approach to Fungi and Food*. Boca Raton, FL.
- Viljoen, B.C., 2001. The interaction between yeasts and bacteria in dairy environments. *International Journal of Food Microbiology*, 69(1-2), pp.37-44.



CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

PRIMERA: La calidad microbiológica de las muestras de leche de cabra tomadas en las explotaciones muestreadas es parcialmente satisfactoria, tomando como referencia los límites establecidos en la Unión Europea, así como los resultados hallados en otros países europeos. Por ello, parece recomendable mejorar las condiciones higiénicas de algunas de las granjas investigadas. Además, las muestras examinadas presentan unas características físico-químicas deseables en este tipo de alimento, tanto para su consumo en forma de leche líquida como para la transformación en queso y otros productos lácteos con elevado extracto seco y contenido en grasa, lo que resulta de interés para la industria láctea.

SEGUNDA: La especie *P. commune* es mayoritaria en el análisis de los quesos investigados, tanto alterados como comerciales listos para el consumo. Sin embargo, el papel de *P. commune* en la maduración del queso aún está por determinarse, ya que algunos autores afirman que tiene una contribución positiva a las características sensoriales del queso y en este trabajo se ha comprobado la comercialización de quesos con esta especie en la superficie. En este sentido, la cepa M57 podría ser de interés en el diseño de un cultivo de superficie por su baja producción de CPA. La identificación polifásica es útil para identificar esta especie y otras del género muy cercanas taxonómicamente.

TERCERA: Las leches de cabra y vaca son una importante fuente de *Lactobacillus* con capacidad antifúngica, superior a la leche de oveja. Las especies de BAL más identificadas fueron: *L. casei*, *L. paracasei* y *L. rhamnosus*. La mayor parte de los aislados se detectaron en los meses de invierno y presentaron mayor actividad frente a la cepa de *Penicillium nordicum*.

CUARTA: En base a la actividad antifúngica hallada, se seleccionaron dos cepas (*L. paracasei* 25/1 y *L. casei* 51/3) que mostraron efecto antagonista en el crecimiento de *P. commune* M35 y, en mayor medida, frente a *P. nordicum* M32, destacando la cepa *L. paracasei*. Además, se ha observado un efecto negativo sobre la producción de CPA por *P. commune*. La cepa *L. paracasei* 25/1 sería pues de utilidad en la fabricación de productos lácteos, además de por sus capacidades fermentadoras y enzimáticas, por la

posibilidad de inhibir el crecimiento de algunas especies de *Penicillium* importantes en la alteración de los productos lácteos.

QUINTA: Además de capacidad antifúngica, las cepas de BAL evaluadas demostraron capacidad antagonista frente a cuatro especies de bacterias patógenas de interés en leche y productos lácteos (*Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes*), lo que resulta reseñable de cara a su utilización como cultivo bioprotector, tanto frente a mohos como frente a bacterias.

SEXTA: El principal compuesto responsable de la actividad antagonista producido por las BAL frente a las cepas de especies de bacterias patógenas investigadas es de naturaleza ácida. En el caso de la actividad inhibitoria de la cepa Lp-25/1 *Lactobacillus paracasei* frente a *Listeria monocytogenes*, se ha comprobado otro tipo de actividad, lo cual es un hecho de interés y abre el camino a la realización de futuros estudios encaminados a descubrir su identidad y aclarar sus mecanismos de acción.

SÉPTIMA: Las cepas Lp-25/1 (*Lactobacillus paracasei*) y Lc-51/3 (*Lactobacillus casei*) fueron capaces de retrasar el crecimiento de *Penicillium commune in vitro*, siendo el principal compuesto responsable de esta actividad de naturaleza ácida. Sin embargo, son necesarios más estudios para identificación de estos ácidos y su efecto sobre los hongos.

OCTAVA: La cepa LP-25/1 (*Lactobacillus paracasei*) aislada de leche de cabra mostró actividad antifúngica en fabricaciones controladas de queso tipo Castellano incorporándolo como parte del cultivo iniciador, retrasando el crecimiento, en particular, de *Penicillium commune*, lo que indica su potencial para el control del deterioro de mohos en queso.

ANEXO I. MEDIOS DE CULTIVO

Composición de los medios de cultivo empleados, excluyendo los adquiridos de casa comercial.

Agar Leche al 10% (Harrigan y McCance, 1979):

- Leche descremada reconstituida (skim milk, Oxoid) 10 mL
- Agar extracto de levadura o agar nutritivo 100 mL.

Añadir la leche al medio agar fundido, mezclar, repartir y esterilizar 115 °C/20 min.

Agar Tween (Harrigan y McCance, 1979):

Peptona	10 g
Cloruro cálcico	0,1 g
Cloruro sódico	5 g
Tween 80	10 mL
Agar	15 g
Agua destilada	1000 mL
pH: 7-7,4	

Esterilizar: 115 °C/20 minutos.

CYA: Agar Czapek extracto de levadura (Visagie *et al.*, 2014):

K ₂ HPO ₄	1 g
Concentrado de Czapek	10 mL
Solución de metales traza	1 mL
Extracto de levadura	5 g
Sacarosa	30 g
Agar	15 g
Agua destilada	1000 mL

Se esteriliza en autoclave a 121 °C durante 15 minutos. El pH final del medio es de 6,7.

Concentrado Czapek (Pitt y Hocking, 1997):

NaNO ₃	30 g
KCl	5 g
· MgSO ₄ •7H ₂ O	5 g
· FeSO ₄ •7H ₂ O	0.1 g

- Agua destilada 100 mL

El concentrado de Czapek puede guardarse indefinidamente sin esterilización previa. El precipitado de FeSO_4 , que se forma con el tiempo, puede ser resuspendido previa agitación de la disolución antes de usarla.

Solución de metales traza (Pitt y Hocking, 1997):

- $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g
- ZnSO_4 1 g
- Agua destilada 100 mL

Esta solución puede guardarse indefinidamente sin esterilización.

MEA: Agar extracto de Malta (Pitt y Hocking, 1997):

- Extracto de malta en polvo 20 g
- Peptona 1 g
- Glucosa 20 g
- Agar 20 g
- Agua destilada 1000 mL

El medio se esteriliza en un autoclave a 121 °C durante 15 minutos. No se debe esterilizar durante un tiempo superior, ya que este medio puede ablandarse o degradarse tras sucesivos calentamientos. El pH final alcanzado es de 5,6.

YES: Agar extracto de levadura sacarosa (Pitt y Frisvad, 2004):

- Extracto de levadura 20 g
- Sacarosa 150 g
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g
- $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.005 g
- $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01 g
- Agar 20 g
- Agua destilada 1000 mL

Se esteriliza en un autoclave a 121 °C durante 15 minutos. El pH final del medio es de 6,5. También se puede hacer sin sales minerales, cuando no se utiliza para estudios de taxonomía o producción de micotoxinas.

CREA: Agar Creatina Sacarosa (Frisvad, 1985):

- Creatina 1 g
- Sacarosa 30 g
- $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 1.3 g

·	Púrpura de bromocresol	0.05 g
·	Solución mineral	10 mL
·	Agar	15 g
·	Agua destilada	1000 mL

El pH final del medio se ajusta a $8,0 \pm 0,2$ y se esteriliza a $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ en un autoclave durante 15 minutos.

Solución mineral (Frisvad, 1981):

·	KCl	5 g
·	MgSO ₄ •7H ₂ O	5 g
·	FeSO ₄ •7H ₂ O	0.1 g
·	Agua destilada	100 mL

Reactivo de Ehrlich (Lund, 1995):

·	Dietilaminobenzaldehido	2g
·	Etanol 96%	85mL
·	HCl 37%	15mL

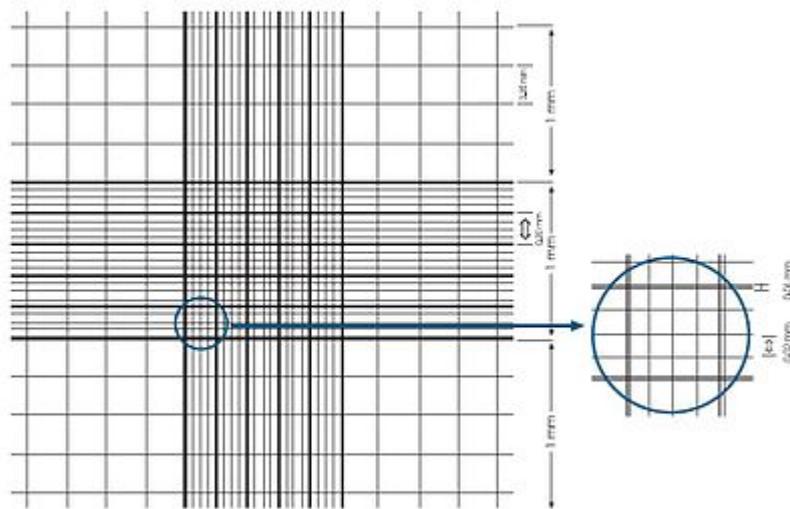
Se disuelve el aldehído en el alcohol y se añade posteriormente el ácido lentamente. Se conserva a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Pitt y Hocking, 1997).

RECuento EN CÁMARA DE NEUBAUER MODIFICADA

1. Preparar una suspensión de esporas a partir de un cultivo en slant de MEA de 7 días/25 °C, añadiendo 5 mL de agua con Tween 80 al 0,05% estéril.

2. Hacer el recuento en la cámara de Neubauer de la siguiente manera:

- En el centro de la cámara hay 25 recuadros (A) que incluyen, cada uno, 16 recuadros (B). Limpiar bien la cámara antes de usar, depositar una gota de la suspensión, poner cubreobjetos y observar con objetivo de x10.
- Realizar el recuento de esporas en varios recuadros (A ó B, según convenga), hacer la media y calcular el recuento:
 - Media de N° esporas en recuadro Ax25x10000 = recuento por mililitro.
 - Media de n° de esporas en recuadro Bx400x10000 = recuento por mililitro.



3. Diluir la suspensión inicial con agua con Tween 80 (0,05%) en tubos de 0,9 (tubos Eppendorf) ó 9 mL hasta alcanzar el recuento requerido. Normalmente, para alcanzar 4-5 unidades logarítmicas es necesario diluir 100 veces.

ANEXO II. FOTOGRAFÍAS
IDENTIFICACIÓN DE *PENICILLIUM*

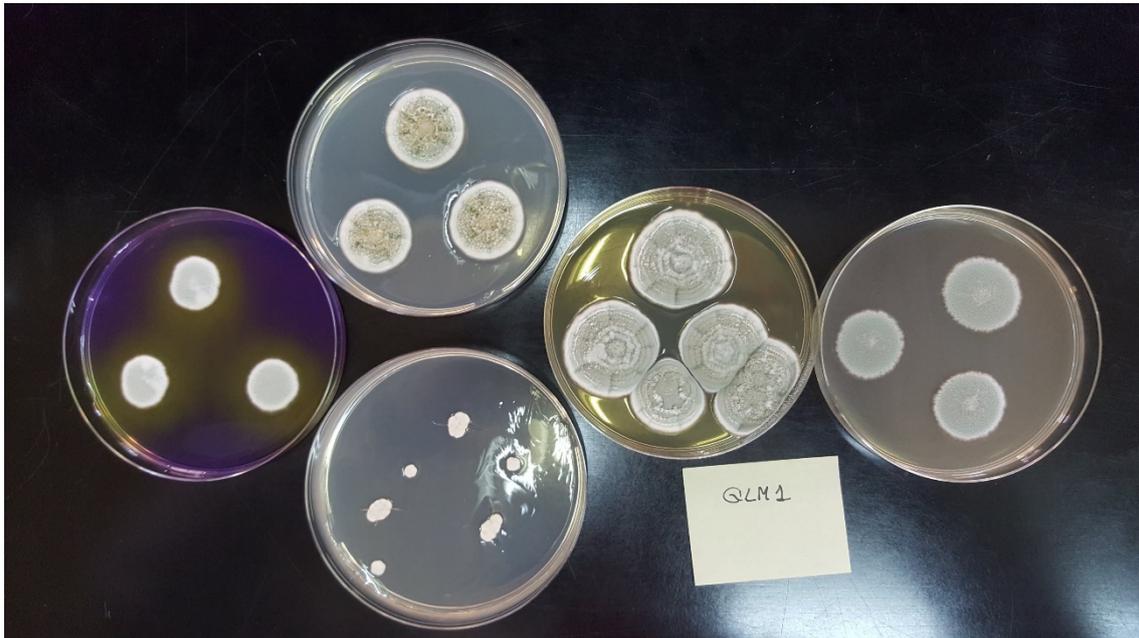


Foto 1. *P. commune* (cepa QLM1), de izquierda a derecha y de arriba abajo, CREA, CYA, CYA (30 °C), MEA y YES (7 d /25 °C, salvo otra indicación).



Foto 2. *P. commune* (cepa QP1), de izquierda a derecha y de arriba abajo, CREA, CYA, CYA (30 °C), MEA y YES (7 d /25 °C, salvo otra indicación).



Foto 3. *P. expansum* (cepa QZ1), de izquierda a derecha y de arriba abajo, CREA, CYA, CYA (30 °C), MEA y YES (7 d /25 °C, salvo otra indicación).

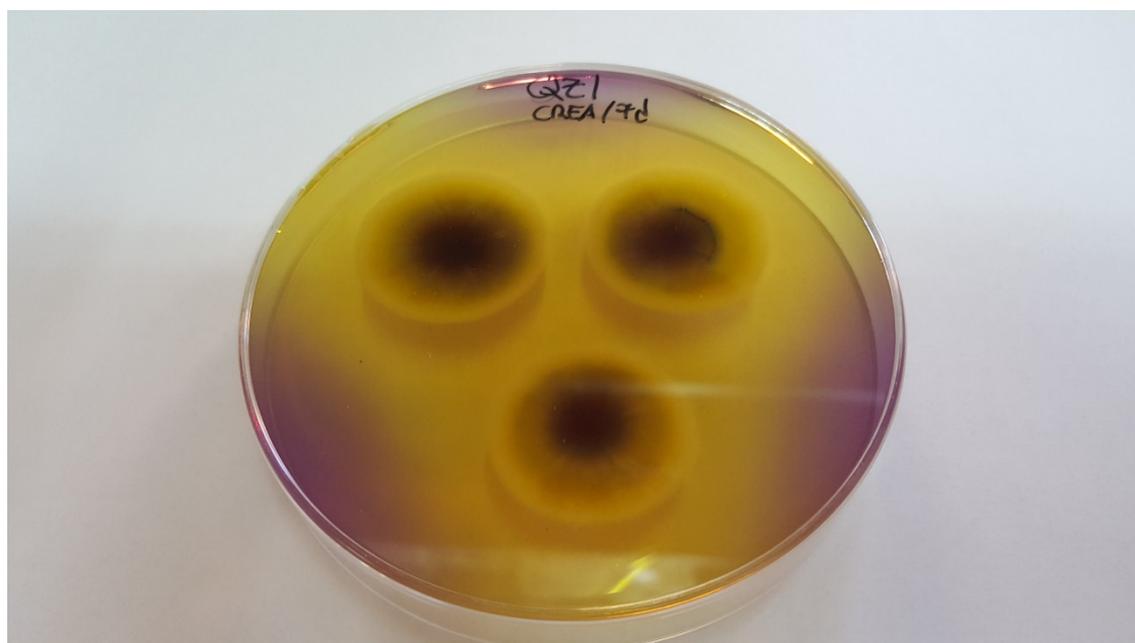


Foto 4. *P. expansum* (cepa QZ1), reverso en CREA (7 d /25 °C), producción de ácido (viraje a amarillo).

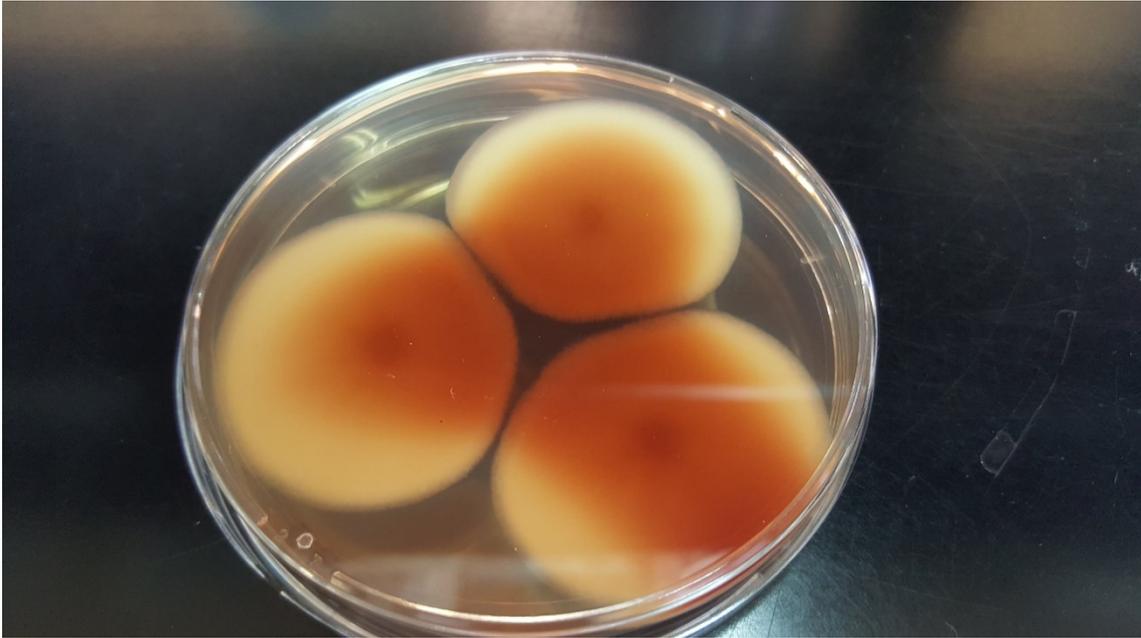


Foto 5. *P. expansum* (cepa QZ1), reverso en CYA (7 d /25 °C), naranja-marrón, típico de esta especie.

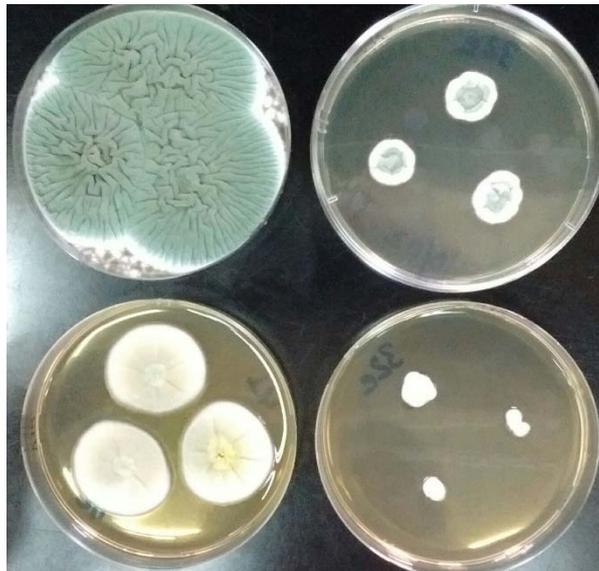


Foto 6. *P. chrysogenum* (M34, izquierda) y *P. nordicum* (M32, derecha), placas de MEA (abajo) y YES (arriba).



Foto 7. *P. chrysogenum* (M34, izquierda) y *P. solitum* (M123, derecha), placas de MEA (abajo) y YES (arriba).

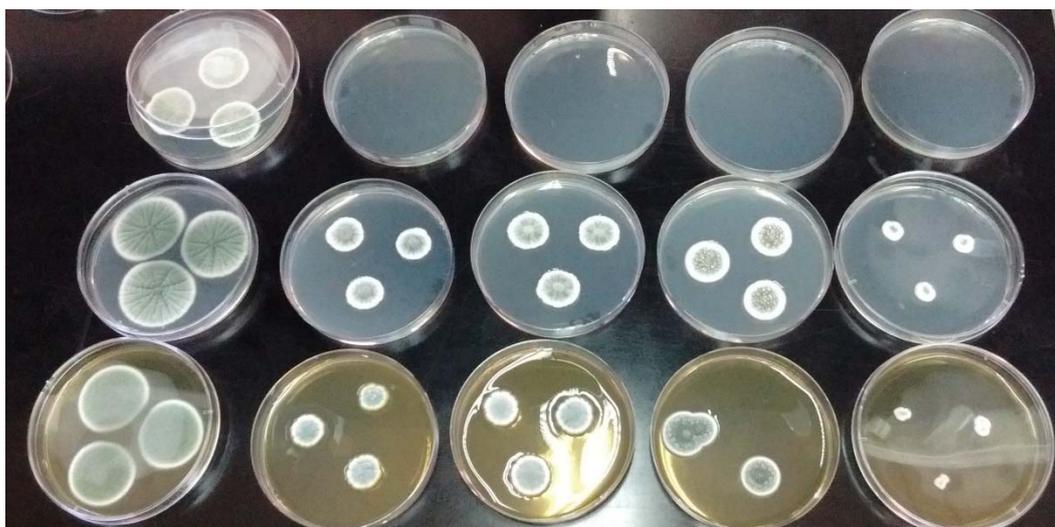


Foto 8. *P. chrysogenum* (M30), *P. solitum* (M76, M123), *P. commune* (M170) y *P. nordicum* (M32), de abajo a arriba, MEA (25 °C), CYA (25 y 30 °C)/7 d.



Foto 9. *P. verrucosum* (MP88, izquierda) y *P. nordicum* (M32, derecha), reverso en YES/7 d/25 °C (rojo característico en *P. verrucosum*), foto superior; anverso, foto inferior.



Foto 10. Prueba de Ehrlich, resultado positivo (aparición de color violeta) de una cepa de *P. commune*.

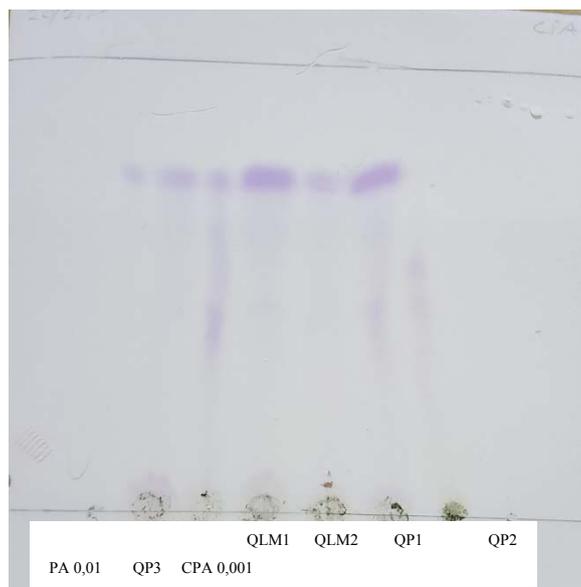


Foto 11. Placa de cromatografía de capa fina de varias cepas de *P. commune* (QLM1, QLM2, QP1, QP2, QP3; positivas) y *P. expansum* (QP3; negativas) (patrón de ácido ciclopiazónico, mancha violeta, 0,01 mg/mL y 0,001 mg/mL). Límite de detección, 0,1 μ g.

EFFECTO DE BACTERIAS ÁCIDO-LÁCTICAS EN EL CRECIMIENTO DE *PENICILLIUM* EN QUESO

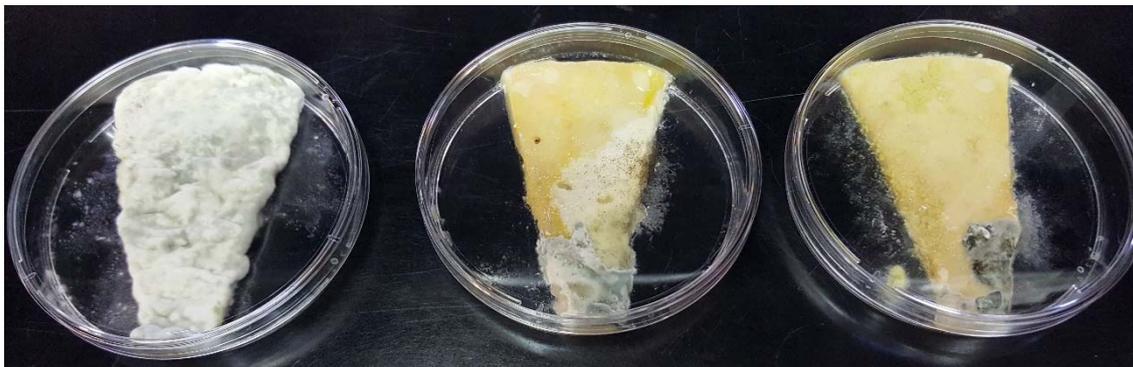


Foto 12. Efecto de BAL en el crecimiento de *P. nordicum* (M32) en queso tipo Castellano (de izquierda a derecha, control del hongo sin BAL, hongo + cepa 25/1 y + 51/3).



Foto 13. Efecto de BAL en el crecimiento de *P. commune* (M35) en queso tipo Castellano (de izquierda a derecha, control del hongo sin BAL, hongo + cepa 25/1 y + 51/3).



Foto 14. Efecto de BAL en el crecimiento de *P. commune* (M35) y *P. nordicum* (M32) en queso tipo Castellano (izquierda, control del hongo sin BAL; derecha, hongo + cepa 25/1).



Foto 15. Detalle de efecto de la cepa 25-1 en el crecimiento de *P. commune* en queso (izquierda, control del hongo; derecha, muestra a la que se añadió la BAL).



Foto 16. Actividad proteolítica (agar caseína, izquierda) y lipolítica (agar tributirina, placas centrales; agar Tween 80, placas de la derecha) de varias cepas de *P. commune* (QLM1, MP57, MP73, QP2, M170).



Foto 17. Actividad lipolítica en agar Tween 80 de *P. commune* (QP2).

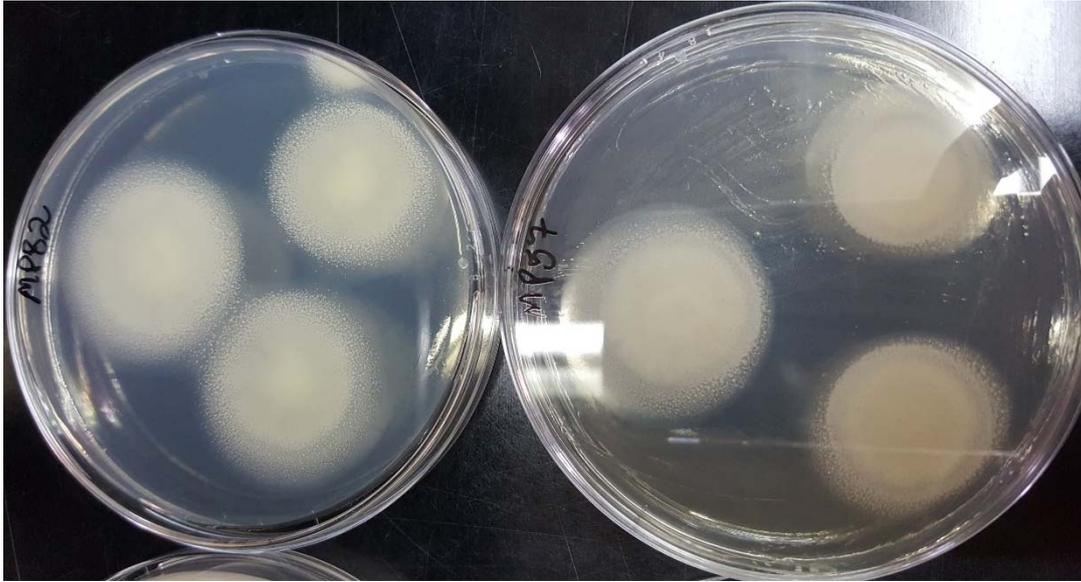


Foto 18. Actividad lipolítica en agar Tween 80 de *P. commune* (MP57) comparado con *P. camemberti* (MP82). En ambas fotos se observa una intensa actividad.

QUESOS CON *PENICILLIUM*



Foto 19. Muestra de queso elaborado en los Picos de Europa (Q2; cepas P4 a P6, *P. commune*).



Foto 20. Muestra de queso “no alterado” con crecimiento fúngico espontáneo (Q3; tipo “pata de mulo”, leche de oveja cruda, 2 meses de maduración).



Foto 21. Muestra de queso “no alterado” con crecimiento fúngico espontáneo (Q1; formato cilíndrico), leche de oveja cruda, 2 meses de maduración.

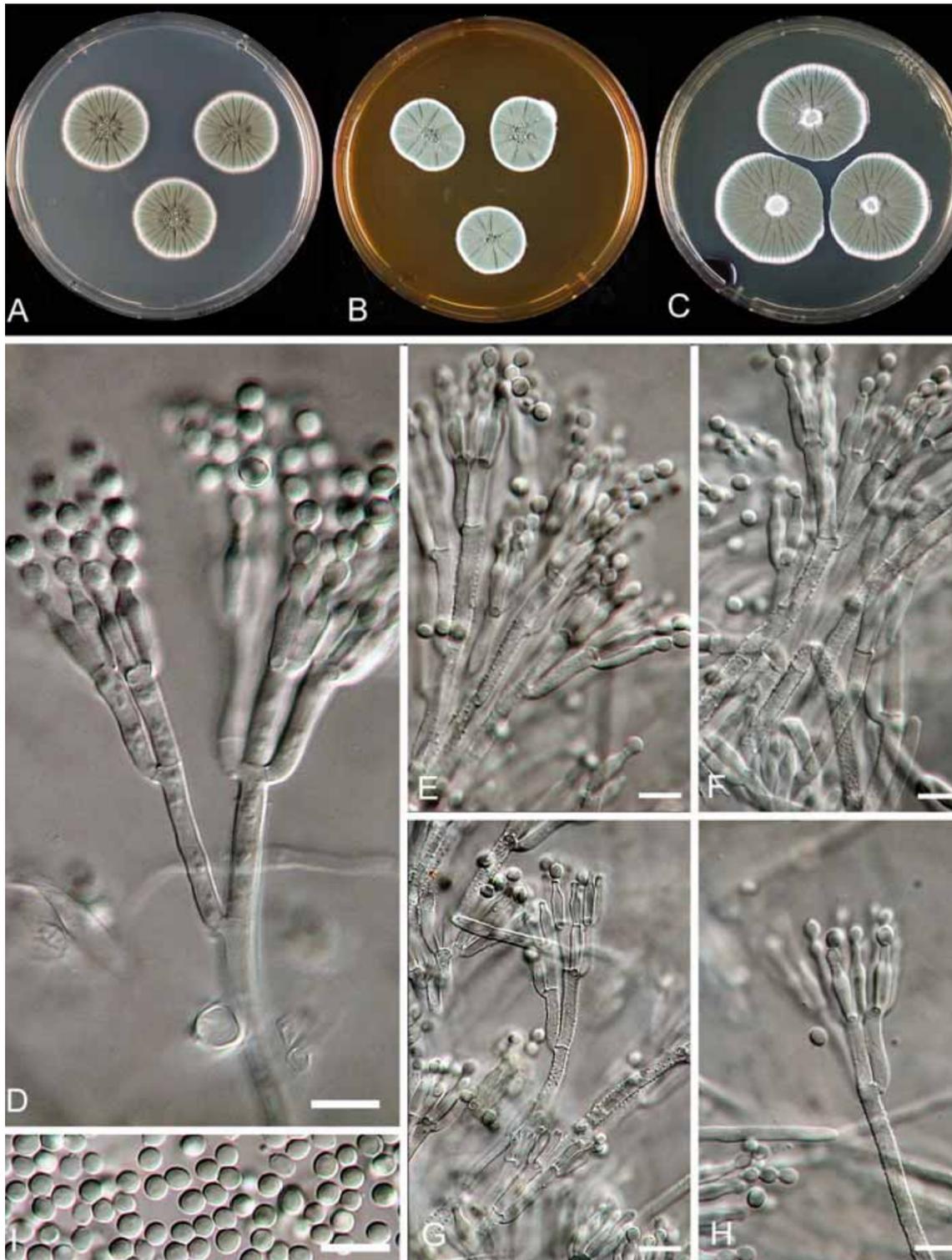


Foto 22. *P. commune*. A-C, colonias de 7 días en CYA, MEA y YES. D-H, conidióforos; I, conidios. Escala barra = 10 μ m. Fuente: Frisvad y Samson, 2004.

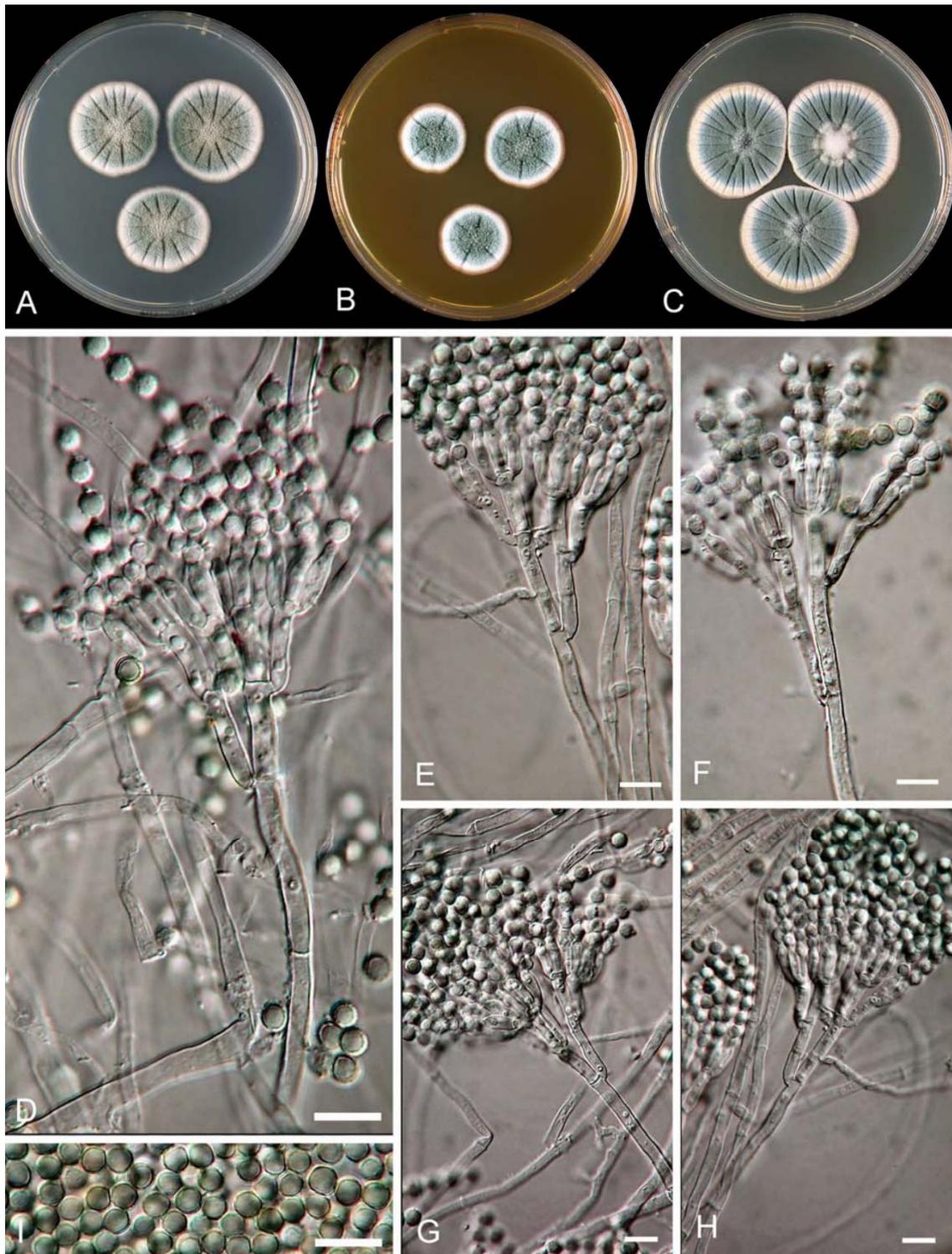


Foto 23. *P. solitum*. A-C, colonias de 7 días en CYA, MEA y YES. D-H, conidióforos; I, conidios. Escala barra = 10 μ m. Fuente: Frisvad y Samson, 2004.

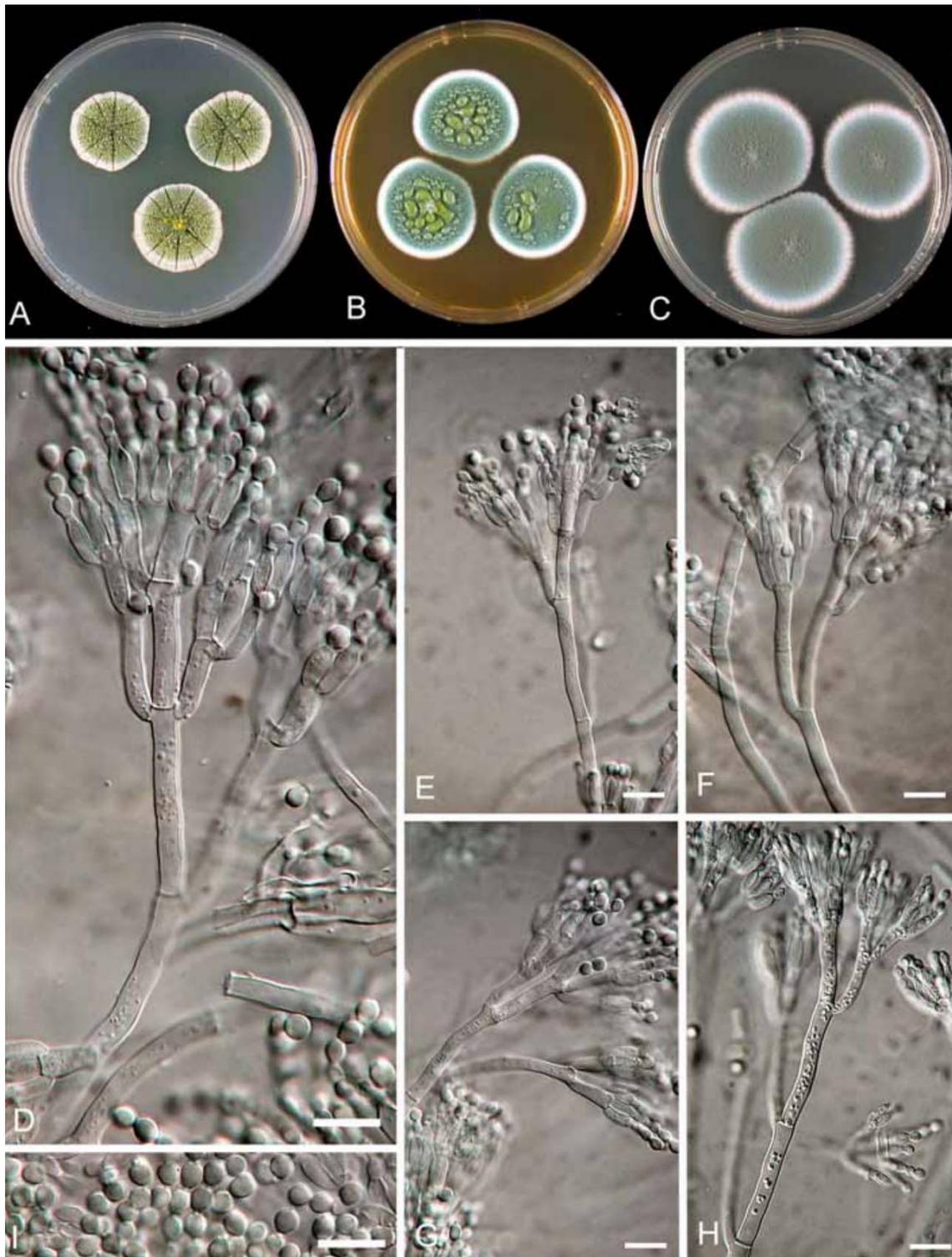


Foto 24. *P. chrysogenum*. A-C, colonias de 7 días en CYA, MEA y YES. D-H, conidióforos; I, conidios. Escala barra = 10 μ m. Fuente: Frisvad y Samson, 2004.

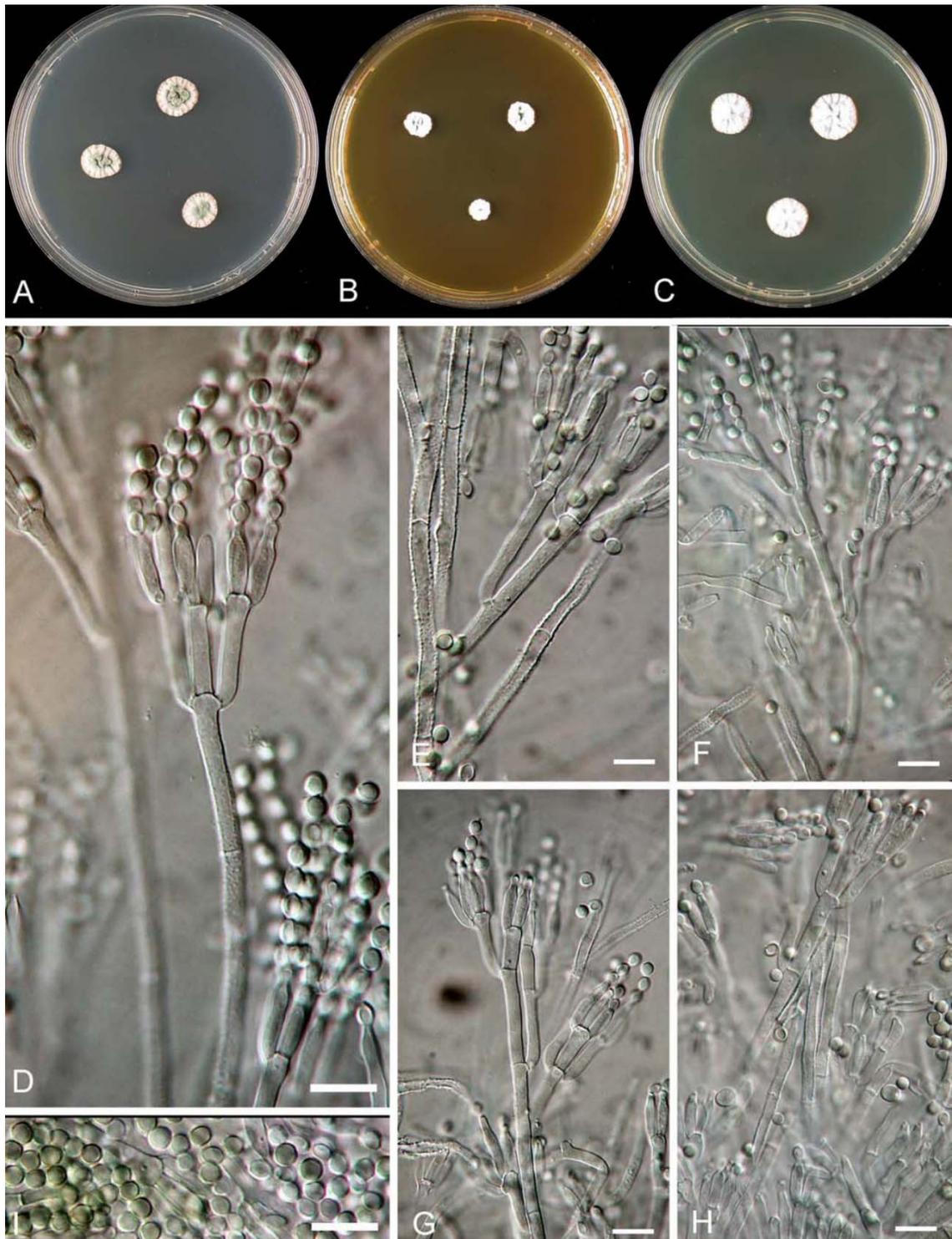


Foto 25. *P. nordicum*. A-C, colonias de 7 días en CYA, MEA y YES. D-H, conidióforos; I, conidios. Escala barra = 10 μ m. Fuente: Frisvad y Samson, 2004.

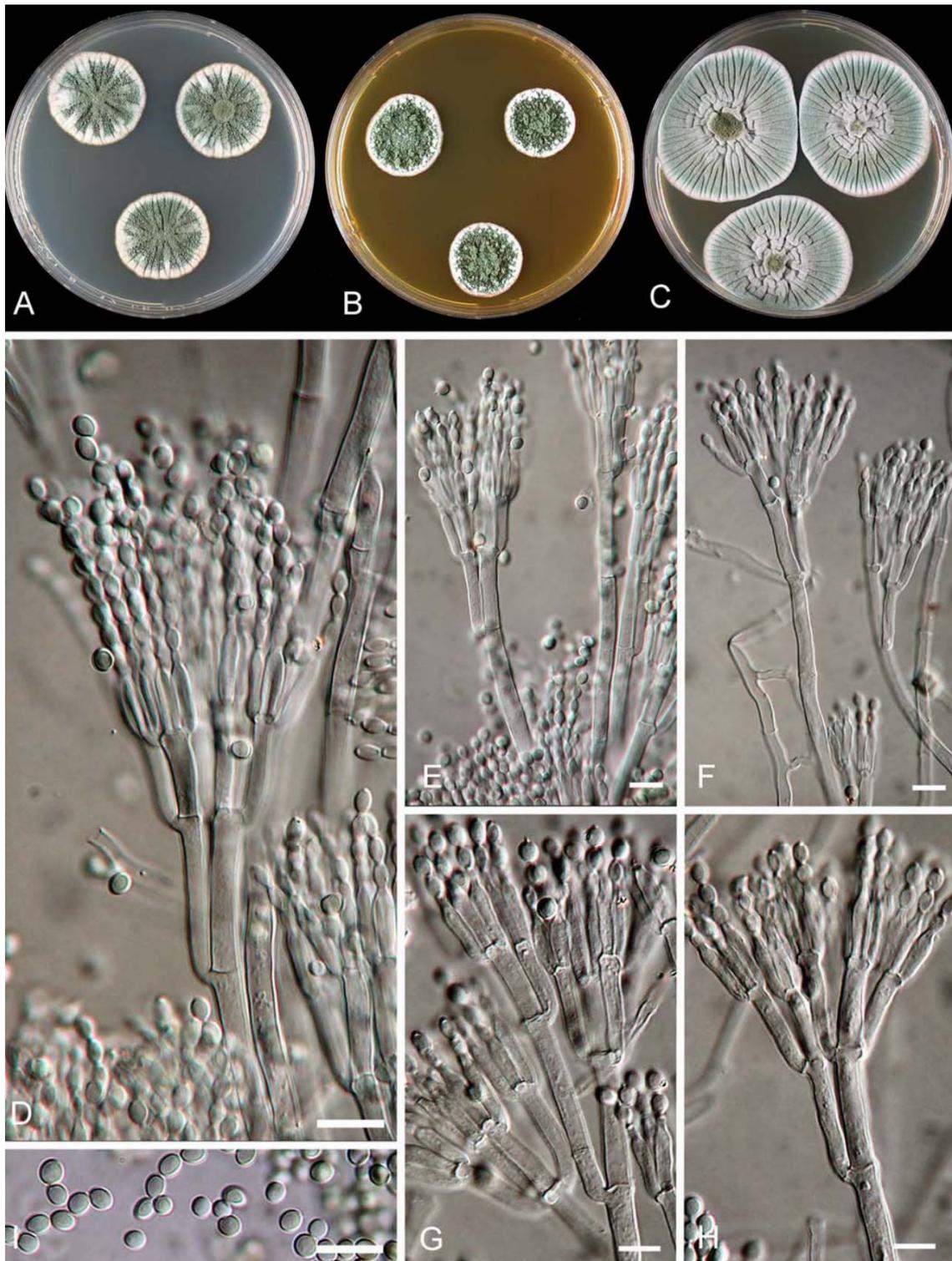


Foto 26. *P. expansum*. A-C, colonias de 7 días en CYA, MEA y YES. D-H, conidióforos; I, conidios. Escala barra = 10 μ m. Fuente: Frisvad y Samson, 2004.