



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

Trabajo de Tesis Doctoral:

“Estudio de la capacidad antifúngica de levaduras del kefir y su potencial como agente de biocontrol en maíz”

Tesista:

Lic. María Candela Moure

Directoras:

Dra. Teresa Alconada

Dra. Ángela León Peláez

Año: 2023

RESUMEN

El kefir es una bebida fermentada que contiene microorganismos probióticos, la cual se obtiene colocando gránulos de kefir en un sustrato adecuado. Los gránulos de kefir son un consorcio de bacterias y levaduras inmersas en una matriz de exopolisacáridos. El objetivo de esta investigación fue el aislamiento e identificación de levaduras a partir de kefir de diferente origen para la evaluación de la capacidad antifúngica frente a *Aspergillus* spp. y *Fusarium graminearum*, y la caracterización de rasgos relacionados con la virulencia, con el fin de una posible aplicación en maíz. Usando RFLP de la región ITS1/ITS2 y genes específicos, secuenciación de la región D1/D2 y técnicas RAPD, se identificaron 25 aislamientos del kefir como *Geotrichum candidum*, *Pichia kudriavzevii*, *P. membranifaciens*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida ethanolica* y *C. boidinii*. Se evaluó su capacidad antifúngica por la reducción de la germinación de conidios, lo que permitió seleccionar ocho aislados con alta a moderada reducción de la germinación de conidios frente a *A. flavus* y *A. parasiticus*. Además, estos aislados seleccionados mostraron inhibición del crecimiento por contacto en el ensayo de cultivo dual para ambas especies de *Aspergillus* y de *F. graminearum* y 3 de ellos –pertenecientes a las especies *S. cerevisiae* y *P. kudriavzevii*– generaron compuestos orgánicos volátiles que afectaron significativamente el crecimiento de los hongos. Adicionalmente se observó un efecto sobre la producción de deoxinivalenol por parte de *F. graminearum* al ser coincubados en medio PDA en placas de Petri y se determinó la capacidad de capturar aflatoxina B1 en buffer PBS. Para la evaluación de los rasgos relacionados con la virulencia, se analizó el crecimiento a altas temperaturas, las actividades enzimáticas, la resistencia al pasaje gastrointestinal simulado y la adhesión a células Caco-2. Los aislamientos no presentaron más de un rasgo positivo relacionado con la virulencia simultáneamente. En particular, es importante resaltar que la capacidad de adhesión al modelo de barrera intestinal fue extremadamente baja para todos ellos. De acuerdo con los resultados obtenidos, se procedió con el estudio de la actividad antifúngica contra *A. flavus* de los aislamientos aplicados a maíz molido en condiciones de minisilo. En donde se evidenció que los aislamientos pertenecientes a *G. candidum* y *S. cerevisiae* tuvieron un efecto sobre el crecimiento del hongo filamentoso, de acuerdo al recuento en placa y PCR cuantitativa, y sobre la producción de aflatoxinas. Por otro lado, cuando se empleó el kefir de agua entero se obtuvo un mayor efecto antifúngico. Cabe destacar la importancia del estudio del comportamiento de los aislamientos individuales que conforman el consorcio, dado que la variabilidad inherente al mismo complejiza su aplicación como agente de biocontrol.

ABSTRACT

Kefir is a fermented drink which contains probiotic microorganisms, it is obtained by placing kefir granules in a suitable substrate. The kefir granules are a consortium of bacteria and yeasts embedded in a exopolysaccharide matrix. The aim of this research was the isolation and identification of yeasts from kefir of different origin, the evaluation of their antifungal capacity against *Aspergillus* spp. and *Fusarium graminearum*, and the characterization of virulence related traits, with the final purpose of a possible application in corn. Using RFLP of ITS1/ITS4 region, D1/D2 region sequencing and RAPD techniques, 25 kefir isolates were identified as *Geotrichum candidum*, *Pichia kudriavzevii*, *P. membranifaciens*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida ethanolica* and *C. boidinii*. Their antifungal capacity was evaluated by their conidia germination reduction, which allowed the selection of eight isolates with high to moderate conidia germination reduction against *A. flavus* and *A. parasiticus*. Furthermore, these selected isolates showed growth inhibition on contact in the dual culture assay for both *Aspergillus* and *Fusarium* species and 3 of them –belonging to *S. cerevisiae* and *P. kudriavzevii* species– generated volatile organic compounds which significantly affected fungal growth. Additionally, an effect on deoxynivalenol production by *F. graminearum* was observed when coincubated in PDA medium in Petri dishes, and the aflatoxin B1 binding ability in PBS buffer was determined. For the evaluation of virulence related traits, growth at high temperatures, enzymatic activities, survival to simulated gastrointestinal tract conditions and the adhesion to Caco-2 cells were analyzed. The isolates did not present more than one positive virulence-related trait simultaneously. In particular, it is important to highlight that the adhesion capacity to the model of intestinal barrier was extremely low for all of them. According to the results obtained, the study of the antifungal activity against *A. flavus* of the isolates applied to corn under minisilo conditions was conducted. Where it was evidenced that the isolates belonging to *G. candidum* and *S. cerevisiae* had an effect on the growth of the filamentous fungus, detected by means of plate counting and quantitative PCR, and on the production of aflatoxins. On the other hand, when whole water kefir was used, a greater antifungal effect was obtained. It is worth noting the importance of studying the behavior of the individual isolates which conformed the consortium, as its inherent variability makes its application as a biocontrol agent more complex.

*A mi mamá, con su empuje, vitalidad y alegría,
siempre agradecida de tenerte en mi vida.*

ICI

Agradecimientos

A la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata y al CONICET, por permitir una educación Pública y de calidad.

A mis directoras, Dra. Teresa Alconada y Dra. Ángela León Peláez, por su tiempo, dedicación y conocimiento aportados, que han sido fundamentales para que esta tesis sea lo que es.

A Dra. Graciela De Antoni, persona increíble que puso a disposición su vasto conocimiento y a quien le agradezco especialmente su calidez humana.

A Dra. Silvana Vero que me recibió en más de una oportunidad en su laboratorio de Biotecnología, UdelaR y con quien aprendí muchísimo. A todas las personas que se encuentran en su laboratorio, en el cual me sentí como en casa desde el momento cero. En especial, quiero agradecer a Mariana con su presencia incondicional tanto en los ensayos de minisilo como en asegurar el mayor bienestar durante mi estadía.

A la Dra. Amparo Querol que generosamente me abrió las puertas de su laboratorio 307, IATA-CSIC y que conjuntamente al Dr. Roberto Pérez-Torrado me acompañaron y guiaron durante los experimentos. A la Dra. Laura Pérez-Traves por su acompañamiento y disposición en cada paso aún después de haber terminado la estadía. A todas las personas que conocí durante la misma, a Dolo, AnaCris, Lainy, Sebas, Thelma, Inés y Ceci, y a Sampa con quien partí desde Argentina, con los que compartí experiencias tanto en el laboratorio como fuera del él de las que nunca me voy a olvidar.

Una de las cosas más lindas que tuvo el doctorado, son los becarios que uno conoce en el camino, personas divinas con las que uno comparte experiencias, consejos, conocimiento y también distensión y ocio. Al trabajar en dos laboratorios distintos tuve la ventaja de conocer a dos grupos diferentes de becarios:

A los del CINDEFI (no puedo nombrarlos a todos ya que son muchos), siempre presentes en el salón de becarios y con los que me sentí bienvenida desde el primer momento. Memorables son los almuerzos compartidos, los debates filosóficos y las tardes de fútbol.

A los de Micro, Ani, Ceci, Mati y también a Mari, mi red primaria con los cuales también comparto una relación de amistad, quienes me brindaron su apoyo continuo e incondicional, aportando ideas, consejos o sólo escuchándome y dándome contención.

A mis hermanas y mi papá, que sin importar cuál sea el momento y lugar de la vida siempre me acompañan y ayudan. Los quiero.

A Emma, mejor compañero no puedo tener.

Y en especial a mi mamá, a la que le dedico la tesis, por su apoyo constante y sus aprendizajes de vida. Gracias también por ponerle color a esta tesis con tus obras de arte de la serie titulada "Historia de una Tesis en imágenes", pinturas una más linda que la otra de las cuales sólo pude seleccionar cuatro para las carátulas.

Sin todos y cada uno de ustedes no hubiera podido haber terminado esta tesis, así que de corazón, MUCHAS GRACIAS.

ABREVIATURAS

Especies de levaduras

Gc: *Geotrichum candidum*

Sc: *Saccharomyces cerevisiae*

Pm: *Pichia membranifaciens*

Pk: *Pichia kudriavzevii*

Cb: *Candida boidinii*

Ce: *Candida ethanolica*

Generales

ACBP: 2-amino-5-clorobenzofenona

ADNmt: ADN mitocondrial

AFB1: aflatoxina B1

AFs: aflatoxinas

AM: azúcar de mascabo

ANOVA: del inglés "analysis of variance", análisis de varianza

BAL: bacterias ácido lácticas

BPA: buenas prácticas agrícolas

BPM: buenas prácticas de manufactura

CC: chancaca

Ct: del inglés "threshold cycle", ciclo umbral

d: días

DON: deoxinivalenol

ECD: del inglés "electron capture detector", detector de captura de electrones

FDA: Food and Drug Administration

FLD: del inglés "fluorescence detector", detector de fluorescencia

FBS: fumonisinas

GC: del inglés "gas chromatography", cromatografía gaseosa

GRAS: del inglés "generally recognized as safe", generalmente reconocido como seguro

HACCP: del inglés "hazard analysis and critical control points", análisis de peligros y de puntos críticos de control

HPLC: del inglés “high performance liquid chromatography”, cromatografía líquida de alta eficacia

IARC: International Agency for Research on Cancer

KA: kefir de agua

KL: kefir de leche

LDH: del inglés “lactate dehydrogenase”, lactato deshidrogenasa.

LSD: del inglés “least significant difference”, mínima diferencia significativa

MC: miel de caña

NIV: nivalenol

OTA: ocratoxina A

pb: pares de bases

PBS: del inglés “phosphate buffer saline”, buffer fosfato salino

PLA: ácido 3-fenil-láctico

ppb: partes por billón

ppm: partes por millón

PS: permeado de suero

qPCR: del inglés “quantitative polymerase chain reaction”, reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa

RAPD: del inglés “random amplified polymorphic DNA”, amplificación aleatoria de ADN polimórfico

RFLP: del inglés “restriction fragment length polymorphism”

RG: reducción de la germinación de conidios

RM ANOVA: del inglés “repeated measurements analysis of variance”, análisis de varianza de medidas repetidas

rpm: revoluciones por minuto

SLC: sobrenadante libre de células

SPE: del inglés “solid phase extraction”, extracción en fase sólida

SP-SDS: del inglés “single plate-serial dilution spotting”, siembra de diluciones en serie en placa única

Tc: tasa de crecimiento

t_L : tiempo de latencia

Tm: temperatura de melting

VOC: del inglés “volatile organic compounds”, compuestos orgánicos volátiles

ZEA: zearalenona

% p/v: porcentaje peso en volumen

% v/v: porcentaje volumen en volumen

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE TABLAS

ÍNDICE DE FIGURAS

I. INTRODUCCIÓN GENERAL	1
I.1. Kefir	2
I.2. Técnicas moleculares de identificación y cuantificación de hongos	6
I.2.1. Técnicas de identificación	6
I.2.2. Técnica de cuantificación de biomasa	8
I.3. Hongos filamentosos toxicogénicos	12
I.3.1. Factores que controlan el crecimiento fúngico y la producción de micotoxinas	13
I.4. Micotoxinas	14
I.4.1. Aflatoxinas	15
I.4.2. Deoxinivalenol	18
I.5. Maíz y almacenamiento postcosecha	20
I.6. Contaminación fúngica del maíz y micotoxinas asociadas	22
I.7. Prevención de contaminación fúngica	24
I.7.1. Control biológico de hongos filamentosos	24
I.7.2. Agentes de biocontrol comerciales	26
I.7.3. Biocontrol y micotoxinas	29
I.8. Rasgos fenotípicos asociados a virulencia	31
I.9. Capacidad antifúngica del kefir	32
II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	35
II.1. Hipótesis	36
II.2. Objetivo General	36
II.3. Objetivos específicos	37
III. MATERIALES Y MÉTODOS	38
III.1. Material biológico	39
III.2. Aislamiento de las levaduras del kefir	39
III.3. Identificación de las levaduras	40
III.3.1. Extracción de ADN genómico	40
III.3.2. Amplificación de las regiones ITS1/ITS2 y D1/D2	41

III.3.3. Análisis de restricción de la región ITS1/ITS2	41
III.3.4. Secuenciación de la región D1/D2	42
III.3.5. Árboles filogenéticos	42
III.3.6. Amplificación aleatoria de ADN polimórfico	42
III.3.7. Análisis de restricción de genes específicos	43
III.3.8. Análisis de restricción del ADN mitocondrial	43
III.3.9. Asimilación de fuentes de carbono	43
III.4. Caracterización de la capacidad antifúngica	44
III.4.1. Inóculos microbianos	44
III.4.2. Preparación de los sobrenadantes libres de células	44
III.4.3. Reducción de la germinación de conidios	45
III.4.4. Cultivos duales	45
III.4.5. Compuestos orgánicos volátiles	46
III.4.6. Efecto sobre la producción de deoxinivalenol	47
III.4.6.1. Extracción de deoxinivalenol	47
III.4.6.2. Cuantificación de deoxinivalenol	48
III.4.7. Captura de aflatoxinas	48
III.4.7.1. Cuantificación de aflatoxinas por HPLC	49
III.4.8. Estimación de los mananos de pared	50
III.4.8.1. Hidrólisis ácida	50
III.4.8.2. Cuantificación de la glucosa y manosa por HPLC	50
III.5. Caracterización de rasgos fenotípicos de virulencia	51
III.5.1. Actividades enzimáticas	51
III.5.1.1. Actividad amilasa	52
III.5.1.2. Actividad proteasa	52
III.5.1.3. Actividad lipasa y fosfolipasa	52
III.5.2. Resistencia al pasaje gastrointestinal	53
III.5.3. Adhesión a células Caco-2	53
III.5.4. Crecimiento a altas temperaturas	54
III.6. Caracterización de la capacidad antifúngica en maíz molido de las levaduras del kefir	54
III.6.1. Ensayos en minisilo	54
III.6.1.1. Determinación del crecimiento microbiano por recuento en placa	55

III.6.1.2. Determinación de la biomasa fúngica por qPCR	56
III.6.1.3. Determinación de la humedad y pH	57
III.6.1.4. Efecto sobre la producción de micotoxinas	58
III.7. Análisis estadístico	58
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	59
IV.1. Aislamiento e identificación de las levaduras del kefir	60
IV.1.1. Aislamiento y caracterización morfológica	60
IV.1.2. Identificación molecular y bioquímica	63
IV.1.2.1. Aislamientos del <i>Grupo I</i>	63
IV.1.2.2. Aislamientos del <i>Grupo II</i>	68
IV.1.2.3. Aislamientos del <i>Grupo III</i>	73
IV.1.2.4. Aislamientos del <i>Grupo IV</i>	75
IV.1.2.5. Aislamientos del <i>Grupo V</i>	79
IV.1.2.6. Aislamientos del <i>Grupo VI</i>	80
IV.1.3. Conclusiones	84
IV.2. Caracterización de la capacidad antifúngica	85
IV.2.1. Reducción de la germinación de conidios	85
IV.2.2. Cultivos duales	89
IV.2.3. Compuestos orgánicos volátiles	93
IV.2.4. Efecto sobre la producción de deoxinivalenol	96
IV.2.5. Captura de aflatoxina B1	99
IV.2.6. Estimación de los mananos de pared	100
IV.2.7. Conclusiones	102
IV.3. Rasgos fenotípicos asociados a virulencia	104
IV.3.1. Actividades enzimáticas	104
IV.3.2. Crecimiento a diferentes temperaturas	106
IV.3.3. Resistencia al pasaje gastrointestinal	107
IV.3.4. Adhesión a células Caco-2	109
IV.3.5. Conclusiones	113
IV.4. Capacidad antifúngica en maíz molido en condiciones de minisilo	115
IV.4.1. Crecimiento de los aislamientos	115
IV.4.2. Enfrentamientos de los aislamientos contra <i>Aspergillus flavus</i>	117

IV.4.3. Efecto antifúngico del kefir de agua en relación a los aislamientos	122
IV.4.3.1. Determinación del crecimiento fúngico por recuento en placa	122
IV.4.3.2. Determinación de la biomasa fúngica por qPCR	125
IV.4.3.3. Efecto sobre la producción de aflatoxinas	130
IV.4.4. Conclusiones	133
V. CONCLUSIONES GENERALES	134
VI. BIBLOGRAFÍA	135
VII. PRODUCCIÓN CIENTÍFICA	171
VIII. ANEXOS	172

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Humedad del maíz y tiempo de almacenamiento seguro	21
Tabla 2: Principales especies fúngicas y micotoxinas asociadas al maíz en Argentina	23
Tabla 3: Agentes de biocontrol comerciales	28
Tabla 4: Características morfológicas observadas en los aislamientos	40
Tabla 5: Gradiente de la fase móvil	49
Tabla 6: Inóculos para minisilos	55
Tabla 7: Agrupamiento de los aislamientos por características morfológicas	61
Tabla 8: Asimilación de fuentes de carbono para los aislamientos del <i>Grupo II</i>	71
Tabla 9: Asimilación de fuentes de carbono para los aislamientos del <i>Grupo III</i>	74
Tabla 10: Identificación de las levaduras aisladas del kefir de diferente origen y condiciones de cultivo	82
Tabla 11: Efecto del tratamiento térmico sobre los sobrenadantes libres de células seleccionados	89
Tabla 12: Efecto de VOC generados por los aislamientos sobre el crecimiento de <i>Aspergillus spp.</i> y <i>Fusarium graminearum</i>	94
Tabla 13: Contenido de DON medido por CG-ECD de los enfrentamientos <i>in vitro</i> de <i>F. graminearum</i> frente a los aislamientos	98
Tabla 14: Capacidad de captura de AFB1 de los aislamientos	99
Tabla 15: Contenido de manano de pared de los aislamientos por HPLC-RI	101
Tabla 16: Resumen de la caracterización antifúngica de los aislamientos	102
Tabla 17: Modo de detección de actividades enzimáticas de los aislamientos	105
Tabla 18: Detección de las actividades enzimáticas de los aislamientos	106
Tabla 19: Crecimiento de los aislamientos a diferentes temperaturas	107
Tabla 20: Viabilidad de los aislamientos a las condiciones de pH del pasaje gastrointestinal en buffer PBS	108
Tabla 21: Viabilidad de los aislamientos a las condiciones del pasaje gastrointestinal simulado	109
Tabla 22: Capacidad de adhesión de los aislamientos a las células modelo intestinal, Caco-2	110
Tabla 23: Rasgos fenotípicos relacionados con la virulencia de los aislamientos	112
Tabla 24: Determinación del efecto matriz	126

Tabla 25: Contenido de aflatoxinas medido por HPLC-FLD en el enfrentamiento en maíz de *A. flavus* frente al KA y los aislamientos Gc 30 y Sc 9B 131

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Tipo de gránulos de kefir	3
Figura 2: Efectos sobre la salud aportados por kefir de leche y de agua	5
Figura 3: Diagrama del rADN con los sitios de unión de los primers universales	7
Figura 4: Modelo de curvas de respuesta en qPCR	9
Figura 5: Melting de amplicones	11
Figura 6: Estructura química de las aflatoxinas	16
Figura 7: Estructura química de los tricotecenos de los grupos A y B	19
Figura 8: Esquema del ensayo dual en placa de Petri y disposición de los inóculos	46
Figura 9: Columnas Strata [®] NH ₂ (Phenomenex, EEUU) asociadas a un equipo de vacío para la remoción de H ₂ SO ₄ de los hidrolizados de levaduras	51
Figura 10: RFLP de la región ITS1/ITS2 del aislamiento 9B	64
Figura 11: RFLP de los genes <i>MAG2</i> y <i>GSY1</i> del aislamiento 9B	65
Figura 12: Árboles filogenéticos de los aislamientos del <i>Grupo I</i>	66
Figura 13: RFLP del ADNmt de los aislamientos del <i>Grupo I</i>	67
Figura 14: Crecimiento del aislamiento 38 en medios de cultivo diferenciales	68
Figura 15: RFLP de la región ITS1/ITS2 de los aislamientos del <i>Grupo II</i>	69
Figura 16: RAPD de los aislamientos del <i>Grupo II</i>	70
Figura 17: Árbol filogenético de la región D1/D2 de los aislamientos del <i>Grupo II</i>	72
Figura 18: RFLP de la región ITS1/ITS2 del aislamiento 22	73
Figura 19: Árbol filogenético de la región D1/D2 de los aislamientos del <i>Grupo III</i>	75
Figura 20: RFLP de la región ITS1/ITS2 del aislamiento 29	76
Figura 21: Árbol filogenético de la región D1/D2 de los aislamientos del <i>Grupo IV</i>	77
Figura 22: Región ITS1/ITS2 del aislamiento 32	78
Figura 23: Región ITS1/ITS2 de los aislamientos 32 y 11 micromanipulados	78
Figura 24: RFLP de la región ITS1/ITS2 del aislamiento 26	79
Figura 25: RFLP de la región ITS1/ITS2 del aislamiento 37	80
Figura 26: Árbol filogenético de la región D1/D2 de los aislamientos del <i>Grupo V y VI</i>	81
Figura 27: Reducción de la germinación de conidios de <i>Aspergillus flavus</i> y <i>A. parasiticus</i> por sobrenadantes libres de células	86

Figura 28: Efecto del pH sobre la reducción de germinación de conidios de <i>A. flavus</i> frente a los sobrenadantes libres de células de los aislamientos	88
Figura 29: Ensayos duales. Debilitamiento miceliar observado en el reverso de las placas	90
Figura 30: Ensayos duales. Evaluación del crecimiento simultáneo de los aislamientos frente a los hongos filamentosos al día 7 de incubación	91
Figura 31: Ensayos duales. Evaluación del crecimiento simultáneo de los aislamientos frente a los hongos filamentosos al día 14 de incubación	92
Figura 32: Efecto de VOC generados por los aislamientos sobre el crecimiento de <i>Aspergillus flavus</i> en PDA al día 14 de incubación	95
Figura 33: Cromatograma control de la producción de DON por <i>Fusarium graminearum</i>	97
Figura 34: Cromatograma modelo obtenido en la determinación de mananos de pared	100
Figura 35: Curvas de crecimiento y pH de los aislamientos en condiciones de minisilo	116
Figura 36: Curva de crecimiento y pH de <i>Aspergillus flavus</i> en condiciones de minisilo	117
Figura 37: Curvas de crecimiento microbiano de enfrentamientos en minisilos <i>Aspergillus flavus</i> frente a los aislamientos	118
Figura 38: Curvas de crecimiento en minisilos del aislamiento Gc 30 con su sobrenadante frente a <i>Aspergillus flavus</i>	119
Figura 39: Crecimiento de <i>Aspergillus flavus</i> en minisilo frente al aislamiento Gc 30 a distintas concentraciones	120
Figura 40: Crecimiento de <i>Aspergillus flavus</i> en minisilo frente al aislamiento Sc 9B a distintas concentraciones	121
Figura 41: Crecimiento de <i>Aspergillus flavus</i> en enfrentamientos en minisilos	123
Figura 42: Crecimiento de levaduras y BAL en enfrentamientos en minisilos	124
Figura 43: Determinación del rango dinámico. Curva estándar entre Ct y concentración de ADN de <i>Aspergillus flavus</i>	125
Figura 44: Curvas de melting	127
Figura 45: Amplificados de qPCR en gel de agarosa al 1,5 % p/v	127
Figura 46: Curvas de melting para muestras de KA con cantidades conocidas de <i>Aspergillus flavus</i>	128
Figura 47: Concentración de ADN de <i>Aspergillus flavus</i> en los enfrentamientos en minisilo	129

The background of the page is a vibrant, abstract watercolor pattern. It features a dense collection of irregular, overlapping shapes in shades of pink, magenta, light blue, and pale yellow, all set against a light cream or off-white base. The colors are blended and splattered, creating a textured, artistic effect.

I. INTRODUCCIÓN GENERAL

I.1. Kefir

El kefir es una bebida fermentada que contiene microorganismos probióticos, la cual se obtiene colocando gránulos de kefir en un sustrato líquido adecuado para su fermentación. Existen dos tipos de kefir, el de leche y el de agua, si bien a veces no se realiza la distinción entre ellos se trata de consorcios microbianos con matrices de polisacárido diferentes (Gökırmaklı & Güzel-Seydim, 2022; Güzel-Seydim et al., 2021). Luego de la fermentación, se filtra el líquido, separando los gránulos que son insolubles en agua, los cuales pueden ser utilizados para una nueva fermentación. Esto representa una gran ventaja al comparar con otras fermentaciones en donde el inóculo inicial no puede ser separado, ya que los gránulos podrían ser reutilizados indefinidamente (Lynch et al., 2021; Nielsen et al., 2014).

El kefir de leche, también conocido como “Kefer”, “Kippi”, “Kanphon” y “Kiaphur”, tuvo su origen hace cientos de años en las montañas caucásicas (Garrote, 1999; Gökırmaklı & Güzel-Seydim, 2022). Mientras que el origen del kefir de agua, también conocido como “Tibi”, “Tíbicos”, “Kefir azucarado”, entre otros nombres; resulta más incierto, encontrándose diversas teorías (Moretti et al., 2022; Waldherr et al., 2010). Independientemente del origen y en combinación con el aumento del consumo de alimentos fermentados, ambos tipos de kefir se han popularizado y extendido globalmente (González-Orozco et al., 2022; Moretti et al., 2022). En muchos países la producción del kefir (de agua y de leche) se ha industrializado utilizando starters comerciales a modo de inóculo, lo que facilita la estandarización del proceso que sería muy difícil de lograr utilizando los gránulos (González-Orozco et al., 2022; Güzel-Seydim et al., 2021; Moretti et al., 2022).

El kefir de leche (KL) y de agua (KA) difieren en cuanto a su composición microbiana y componentes estructurales. Es así que el exopolisacárido que conforma los gránulos en el KL se trata de un heteropolisacárido glucogalactano llamado kefiran (sintetizado por *L. keranofaciens*), mientras que en el KA es un homopolisacárido α -1,6-glucano (sintetizado por *Lactobacillus hilgardii*) (Moretti et al., 2022). Esta diferencia hace que los gránulos de KA sean transparentes, mucilaginosos y de consistencia frágil, mientras que los de KL son blancos y más resistentes (Lynch et al., 2021). En ciertos estudios en donde se ensayaron los microorganismos aislados productores del exopolisacárido, los gránulos no pudieron ser producidos y se necesitaron gránulos preexistentes para generar nuevo gránulo (Bengoa et al., 2019; Chen, 2015; Stadie, 2013). En la figura 1 se presentan ambos tipos de gránulos.

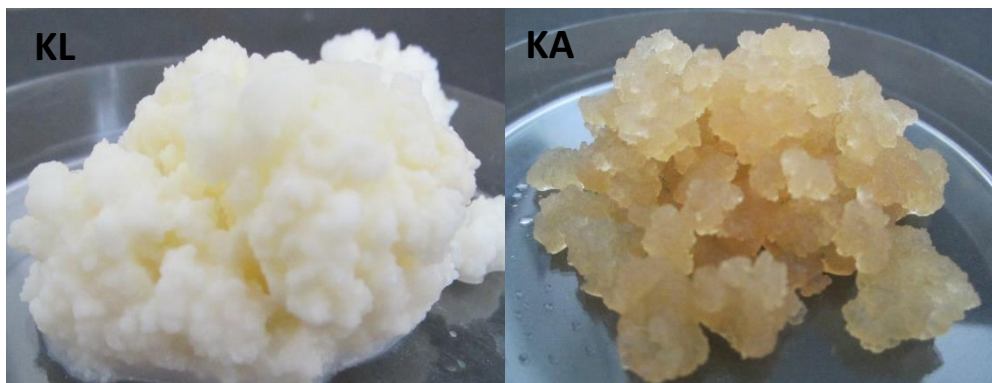


Figura 1: Tipo de gránulos de kefir. **KL:** Gránulos de kefir de leche, **KA:** Gránulos de kefir de agua.

En cuanto a su composición microbiana, los gránulos de kefir son consorcios microbianos compuestos por tres grandes grupos de microorganismos, las bacterias ácido lácticas (BAL), las bacterias ácido acéticas y las levaduras. Las BAL son generalmente el grupo de mayor presencia en ambos tipos de kefir. La diversidad de especies, en particular las levaduras, es una característica distintiva entre ambos tipos de kefir (Güzel-Seydim et al., 2021; Lynch et al., 2021). Entre los géneros de levaduras encontrados en ambos se hayan, *Candida*, *Hanseniaspora*, *Issatchenkia*, *Kazachstania*, *Kluyveromyces*, *Lanchancea*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Torulospora*, *Yarrowia*, *Zygosacharomyces* (Fiorda et al., 2017; González-Orozco et al., 2022; Güzel-Seydim et al., 2021; Lynch et al., 2021; Moretti et al., 2022). El kefir de agua contiene una mayor diversidad de géneros de levaduras que el de leche (Güzel-Seydim et al., 2021). Aunque aún está en discusión, se cree que los microorganismos tienen una distribución espacial diferencial dentro del gránulo, encontrándose las levaduras en el centro y las BAL en la periferia, con una zona intermedia donde variaría progresivamente de un grupo de microorganismos a otro (Bottazzi & Bianchi, 1980; Leite et al., 2013; Lin et al., 1999). Además, la predominancia de especies puede variar entre regiones geográficas e inclusive dentro de una misma región (Lynch et al., 2021). Por otro lado, el almacenamiento y las condiciones de cultivo afectan la diversidad de los consorcios (Garrote et al., 1998; Hsieh et al., 2012; Nielsen et al., 2014). El sustrato de fermentación empleado se relaciona con la diversidad de especies observada y con los productos generados por los mismos, los cuales afectan el crecimiento y formación de los gránulos

(Hsieh et al., 2012). Incluso, el cambio en la diversidad, aun dentro de un mismo gránulo, puede darse en fermentaciones sucesivas (Gamba et al., 2021).

En cuanto a sus propiedades funcionales, ambos tipos de kefir son una fuente de probióticos y prebióticos. Adicionalmente el KA tiene la ventaja de poder ser consumido por veganos o personas con alergia o intolerancia a los lácteos, al no requerir leche para su elaboración. Ambos tipos de kefir se destacan por sus potenciales efectos sobre la salud, detallados en la figura 2 (Güzel-Seydim et al., 2021). Estas propiedades se atribuyen a la amplia variedad de compuestos bioactivos generados durante la fermentación del sustrato (ácidos orgánicos, péptidos bioactivos, bacteriocinas, exopolisacáridos, entre otros), así como también a los microorganismos presentes, los cuales pueden actuar individual o sinérgicamente (Fiorda et al., 2017; González-Orozco et al., 2022).

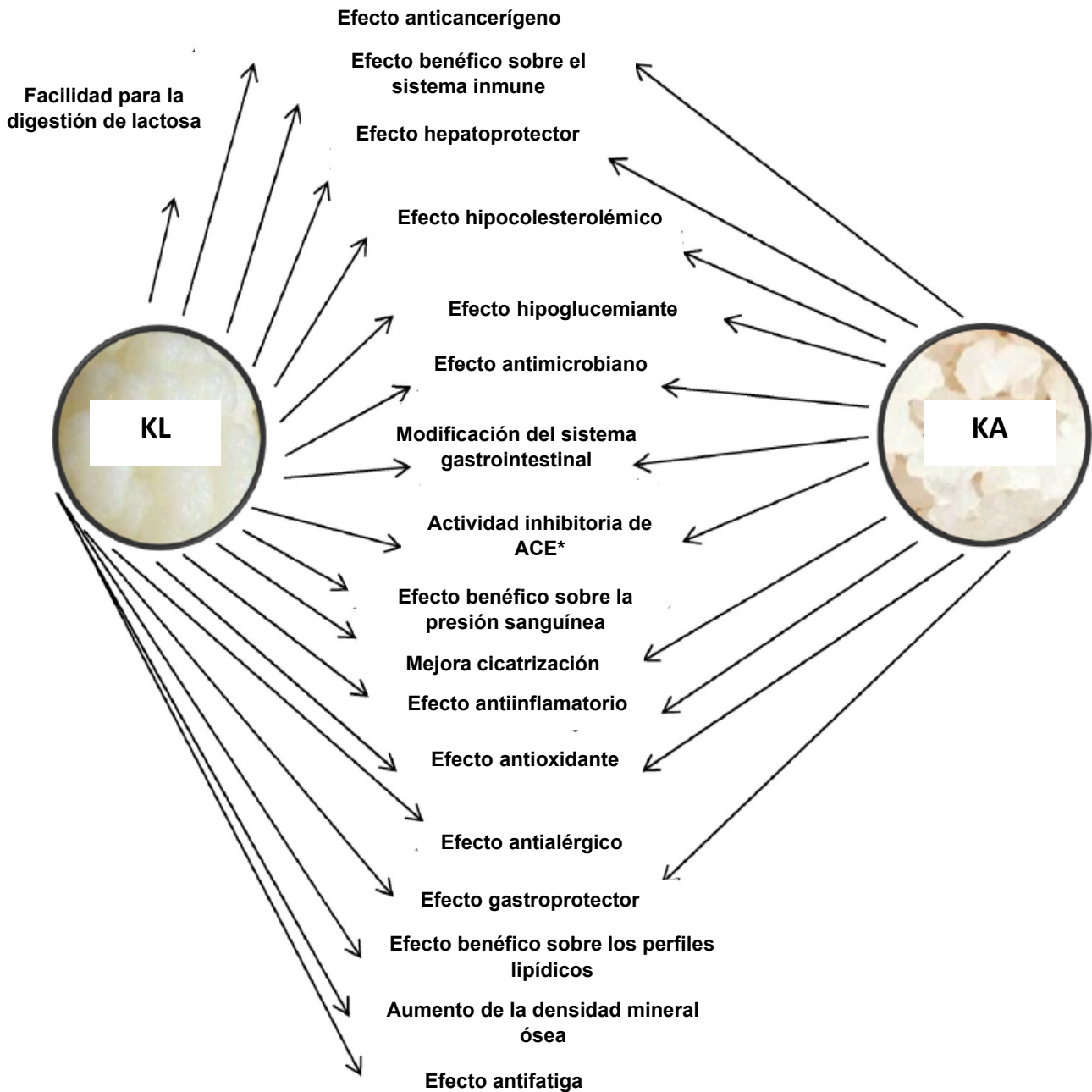


Figura 2: Efectos sobre la salud aportados por kefir de leche y de agua. Esquema adaptado de Güzel-Seydim et al (2021). *ACE, enzima convertidora de la angiotensina (del inglés “angiotensin-converting enzyme”).

I.2. Técnicas moleculares de identificación y cuantificación de hongos

Los métodos moleculares son un campo de estudio que está en constante evolución, presentan una amplia versatilidad y pueden ser utilizados en la detección, identificación y cuantificación de los hongos filamentosos y levaduras (Palomino Camargo & González Muñoz, 2014; Pitt & Hocking, 2022). Existe una amplia variedad de técnicas moleculares, entre las que se encuentran la amplificación y secuenciación de regiones específicas, RFLP (restriction fragment length polymorphism), RAPD (random amplified polymorphic DNA), qPCR (quantitative polymerase chain reaction), entre otras. Las técnicas permiten la identificación a nivel de especie, la discriminación a nivel de cepa o la detección y cuantificación de una especie determinada.

I.2.1. Técnicas de identificación

La identificación molecular es una parte fundamental de la identificación polifásica de hongos y levaduras. La misma se basa generalmente en la amplificación y secuenciación de regiones del ADN que codifican para los ribosomas. Esta región fue seleccionada por estar presente en todos los organismos vivos, tener un posible origen en común y presentar regiones altamente conservadas (que permiten la unión de primers) seguidas de regiones variables que permiten la determinación de relaciones evolutivas (Kurtzman, 2004). Los genes ribosomales (5,8S; 18S y 26S/28S para levaduras y hongos respectivamente) se agrupan en tándem formando unidades de transcripción, las cuales se repiten en el genoma entre 100 y 200 veces, y se encuentran separadas por una región no codificante denominada IGS (Intergenic Spacer) (Figura 3) (Fernández-Espinar et al., 2006).

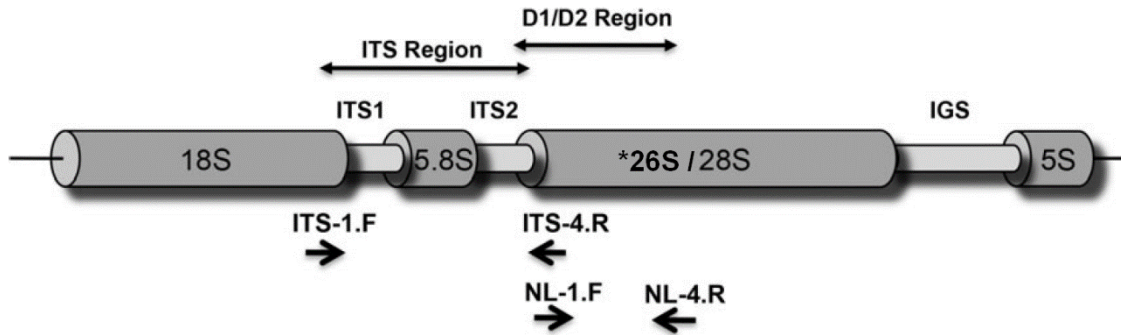


Figura 3: Diagrama del rADN con los sitios de unión de los primers universales. Esquema adaptado de Romanelli et al. (2014). *26S para levaduras y 28S para hongos filamentosos (Arbefeville et al., 2017).

Entre las secuencias de los genes del 18S y 5,8S así como de los 5,8S y 26S/28S, se encuentran secuencias espaciadoras no codificantes conocidas como ITS1 e ITS2 (Internal Transcribed Sequence). Todas ellas representan poderosas herramientas para ser utilizadas en la identificación a nivel de especie de hongos filamentosos y levaduras. Las regiones más comunes para la identificación de las levaduras son las regiones ITS1/ITS2 y D1/D2 (en el extremo 5' del gen 26S) (Kurtzman & Robnett, 1998; Pitt & Hocking, 2009).

La disponibilidad de las secuencias ITS1/ITS2 y D1/D2 en bases de datos, como Genbank y su herramienta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), permiten la identificación de un aislamiento de levadura desconocido al alinear y comparar las secuencias con la base de datos. Para poder asignar una especie utilizando esas regiones, las secuencias deben diferir en menos de 1 %, es decir que debe haber una homología de 99 % o mayor (Kurtzman, 2015). De esta manera, la secuenciación de las regiones ITS1/ITS2 y D1/D2 se convirtieron en la principal técnica de identificación de las levaduras y son consideradas “barcode” para hongos (Seifert, 2009). El ADN “barcode” (“código de barras de ADN”) consiste en el uso de una región de ADN corta y estandarizada para la identificación rápida y precisa de especies (Paz et al., 2011). La confiabilidad y precisión de estas regiones en la identificación de las levaduras continúa siendo altamente reconocida en la actualidad (Boekhout et al., 2021).

Otra técnica basada en la variabilidad de la región ITS1/ITS2, para la identificación de las levaduras es RFLP (restriction fragment length polymorphism). En esta técnica las regiones ribosomales amplificadas son luego digeridas con enzimas de restricción para la obtención de perfiles de bandas característicos de cada especie, los

cuales se encuentran en la base de datos <http://yeast-id.com> (Fernández-Espinar et al., 2006).

I.2.2. Técnica de cuantificación de biomasa

La técnica de PCR cuantitativa (qPCR) es una técnica desarrollada en 1996, ampliamente utilizada en diversos campos de estudio como la genética, microbiología, oncología, bioquímica, inmunogénica, ecología “next generation sequencing”, farmacogenómica, entre otras (Fernández-Espinar et al., 2006; Raso & Biassoni, 2020). La técnica consiste en la medida continua de fluorescencia, generada por la reacción de la polimerasa, en un rango de ciclos. A diferencia de una PCR tradicional, qPCR permite la cuantificación del ADN en la muestra como estimativo de la biomasa fúngica, al convertir la señal fluorescente (generada por medio de fluoróforos) en un valor de concentración de ADN (Dorak, 2006). Existen dos clases de fluoróforos, los intercalantes no específicos y las sondas con afinidad a secuencias específicas del ADN. Dentro de la primera clase se encuentra el SYBR Green, un intercalante que se une al surco menor de la doble cadena, generando fluorescencia. A mayor cantidad de ADN de doble cadena en la mezcla de reacción, mayor SYBR Green intercalado y mayor será la señal. En los primeros ciclos la señal de fluorescencia es baja (por haber poco ADN amplificado) por lo que es difícil distinguirla del ruido de fondo. Al transcurrir la reacción de amplificación la señal aumenta de manera exponencial hasta llegar a una fase de plateau por saturación debida al consumo de algún componente de la reacción (Figura 4).

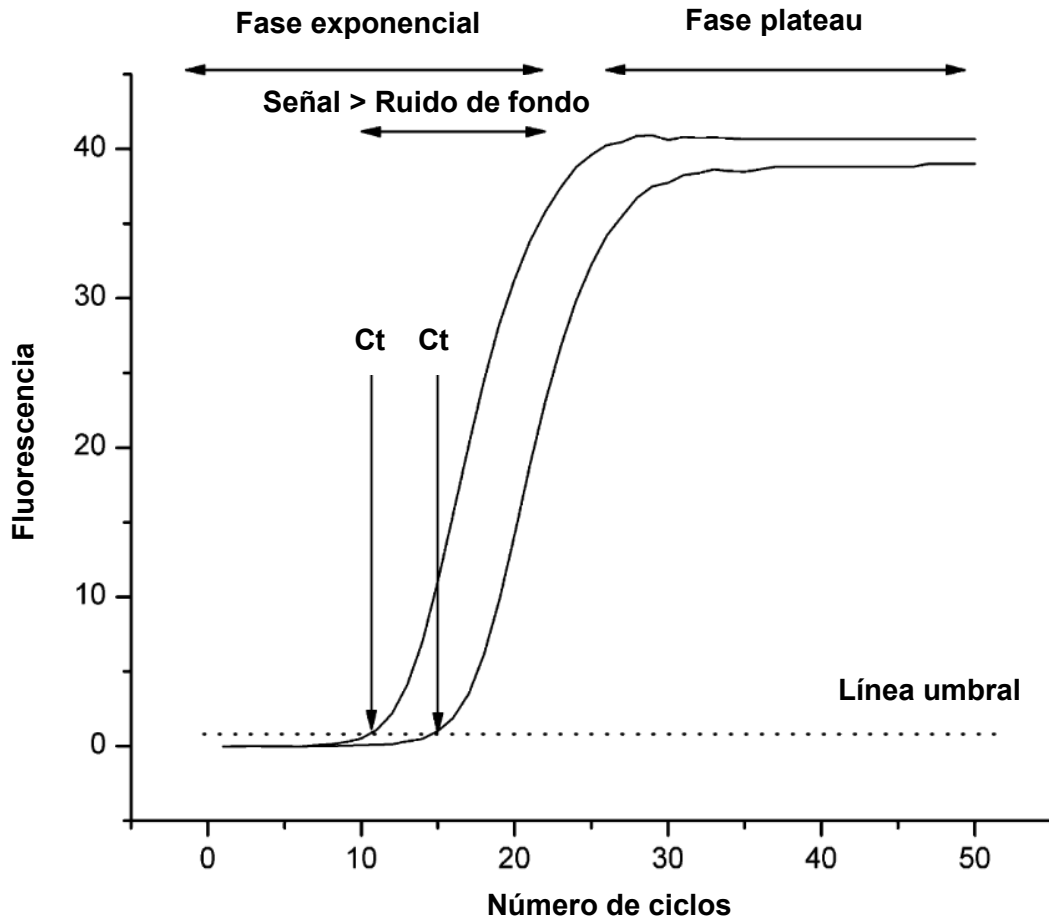


Figura 4: Modelo de curvas de respuesta en qPCR. Adaptada de Kubista et al. (2006).

Es importante destacar que en las qPCR generalmente todas las muestras llegan a la fase plateau al mismo nivel, por lo que la medida de la señal al terminar los ciclos no es indicativa de la cantidad inicial de ADN en la muestra. Lo que refleja la cantidad de ADN inicial en la muestra es la cantidad de ciclos necesarios para llegar a un valor umbral de fluorescencia (en inglés “threshold”) mayor al ruido de fondo. Este valor se denomina Ct, el cual es inversamente proporcional al logaritmo de la concentración de ADN inicial de la muestra. El valor umbral se debe colocar en la región exponencial para todas las curvas.

La cuantificación del ADN inicial de la muestra se realiza a partir de una curva estándar del ADN de interés. Los valores de Ct obtenidos en la qPCR para cada concentración, se grafican en función del logaritmo decimal de la concentración del ADN (N_0). Los datos se ajustan a la siguiente ecuación:

$$Ct = k \cdot \log(N_0) + Ct1$$

Siendo k la pendiente de la curva, N_0 la concentración del ADN inicial y $Ct1$ la ordenada al origen. A partir de la curva obtenida se calcula la eficiencia (E) de la reacción de acuerdo a:

$$E = 10^{\frac{1}{k}} - 1$$

La eficiencia de la reacción se considera confiable cuando se encuentra entre 0,90 y 1,00, lo cual corresponde a valores de pendiente entre 3,1 y 3,6. El coeficiente de correlación (R^2) es un parámetro que da una idea del ajuste de la curva estándar a la recta, el cual debe ser cercano a 1. El rango dinámico, estimado a partir de los parámetros y la curva estándar, es el rango donde existe una relación lineal entre las concentraciones logarítmicas del ADN y sus Ct , el cual permite determinar la concentración del ADN en la muestra (Dorak, 2006).

Las muestras biológicas son complejas, por lo que puede haber presentes sustancias inhibitorias de la reacción que disminuyen la eficiencia de la qPCR, lo que se denomina efecto matriz. Las sustancias inhibitorias pueden interferir con la lisis celular para la extracción del ADN, degradar o capturar ácidos nucleicos e inhibir la ADN polimerasa necesaria para la amplificación. La inhibición de la reacción de amplificación es uno de los factores que más afectan a la técnica, pudiendo generar falsos positivos o sensibilidad reducida (Rodríguez et al., 2012). Una manera de evaluar el efecto matriz es realizar diluciones de la matriz y agregarle concentraciones conocidas del ADN de interés. Al realizar los cálculos se comparan los valores obtenidos sin y con matriz, para determinar si hay diferencias significativas entre ellos. Si existe efecto matriz, se debe trabajar con una dilución adecuada de la muestra para eliminarlo.

Los fluorómetros del tipo intercalante no son específicos, por lo que es un requisito fundamental realizar una curva de melting al final de la qPCR para descartar amplificaciones inespecíficas del ADN (Aguilera et al., 2014). La curva de melting se realiza aumentando la temperatura del amplicón obtenido, lo que genera que las hebras se vayan separando con la consecuente disminución de la fluorescencia. La curva de melting es el opuesto de la derivada de la intensidad de la fluorescencia en función de

la temperatura y la temperatura de melting (T_m) del amplicón corresponde al pico máximo de la curva. En la curva de melting las amplificaciones inespecíficas, se detectan por la presencia de más de un pico (Dorak, 2006) (Figura 5).

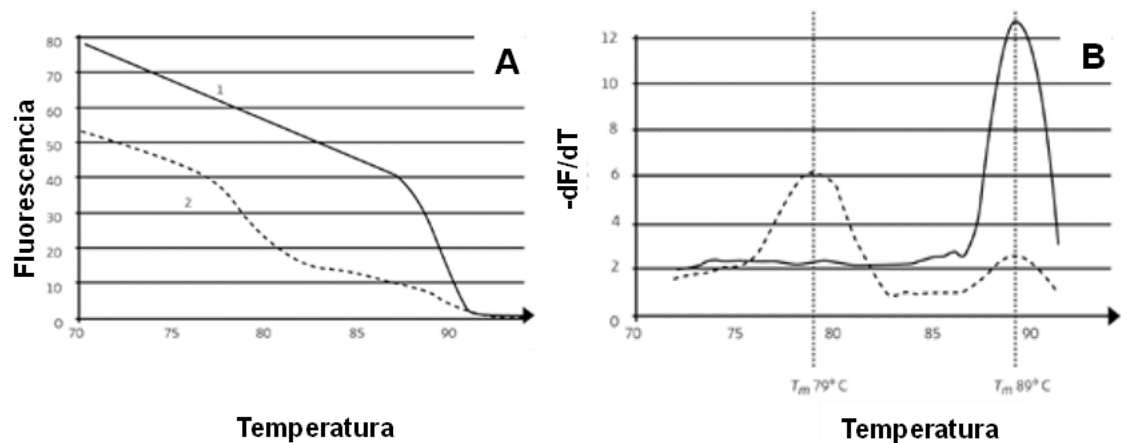


Figura 5: Melting de amplicones. A: Fluorescencia versus temperatura; B: Curva de melting, $-dF/dT$ versus la temperatura. (—) un solo amplicón ($T_m = 89\text{ °C}$); (---) dos amplicones ($T_m = 79\text{ °C}$ y $T_m = 89\text{ °C}$) (Aguilera et al., 2014)

La efectividad de las medidas de control empleadas contra hongos filamentosos se analiza por métodos de cuantificación de biomasa fúngica. Entre las técnicas moleculares, qPCR ha demostrado ser una herramienta idónea por su confiabilidad, sensibilidad y especificidad para la cuantificación de micelio y esporas de hongos. Siendo utilizada en una amplia variedad de matrices, desde interiores de edificios hasta alimentos de consumo humano y animal (Cox et al., 2020; Haugland et al., 2004; Leclercq-Perlat et al., 2013; Rahman et al., 2020; Roumani et al., 2022; Suanthie et al., 2009).

La biomasa fúngica es proporcional al contenido de ADN, debido al mecanismo que estimula la duplicación del núcleo al superar un determinado valor crítico (de la relación entre el volumen del citoplasma y del núcleo). El diseño de primers específicos, permite monitorear los cambios en la biomasa de una especie fúngica particular, aún en presencia de otros microorganismos. Lo que representa una ventaja adicional en relación a otras metodologías (Arquiza & Hunter, 2014).

I.3. Hongos filamentosos toxicogénicos

Los hongos filamentosos se encuentran entre los microorganismos de vigilancia a nivel mundial, ya que ciertas cepas de algunas especies son contaminantes de una amplia gama de materias primas, subproductos y productos finales. Su contaminación genera pérdidas económicas y riesgo principalmente por la producción de micotoxinas (detalladas en I.4) (Dumitru et al., 2020; Liu et al., 2018). Entre los gastos generados se encuentran los relacionados a la atención médica humana y animal, disminución en la producción ganadera, eliminación de alimentos y piensos contaminados, y la implementación de medidas de control (Milićević et al., 2015). A pesar de que las pérdidas son difíciles de calcular, se estima que en Australia (país con clima seco y tecnología avanzada) se pierden \$10.000.000 por año por el crecimiento fúngico y se considera que el valor es mayor en países con climas húmedos tropicales y tecnología menos avanzada. Por lo que la estimación de 10-20 % de pérdidas de todos los productos alimentarios por el crecimiento de hongos, es bastante atinado según Pitt et al. (2022). Los cereales son particularmente susceptibles a la contaminación por hongos filamentosos, por lo que se encuentran entre las principales causas de pérdida de la calidad e inocuidad de los mismos (Christensen & Kaufmann, 1969; Mohapatra et al., 2017).

Los hongos filamentosos se presentan en la naturaleza bajo la forma de micelio o esporas sexuales o asexuales (llamadas conidios). Además, bajo condiciones adversas tales como desecación o escasez de nutrientes, forman estructuras de resistencia. De este modo permanecen latentes hasta que las condiciones ambientales cambian y se hacen favorables; es entonces cuando las esporas germinan dando nuevo micelio (Cotty, 1988; Yu et al., 2005).

La contaminación fúngica puede ocurrir tanto en el campo precosecha, lo que está íntimamente ligado con los factores ambientales, así como también postcosecha debido a un almacenamiento o procesamiento indebidos (Battilani et al., 2009; Bryden, 2012). Cada etapa tiene una microbiota contaminante asociada, encontrándose hongos que típicamente invaden en el campo y otros durante el almacenamiento (Serna-Saldivar, 2018). Los principales géneros de hongos micotoxigénicos asociados con la contaminación de cereales son *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium* (Alassane-Kpembé et al., 2017; Habschied et al., 2021). Muchas especies del género *Fusarium* se encuentran distribuidas normalmente en los suelos y son patógenos de plantas, por lo tanto generalmente están asociadas con invasiones precosecha (Pitt & Hocking, 2022). Las especies del género *Penicillium* son consideradas hongos típicamente del

almacenamiento. Si bien las especies de *Aspergillus* se relacionan con la postcosecha, *A. flavus* también contamina en la etapa precosecha (Serna-Saldivar, 2018).

I.3.1. Factores que controlan el crecimiento fúngico y la producción de micotoxinas

La contaminación fúngica puede ocurrir a través de una pequeña cantidad de esporas fúngicas, transferidas desde una planta/grano infectado o preexistente en las instalaciones, que sirven como inóculo inicial. Las mismas al encontrarse ante condiciones favorables se desarrollan rápidamente y pueden generar distinto grado de daño del grano (Mohapatra et al., 2017). Existe una amplia variedad de factores que influyen en el crecimiento y producción de micotoxinas, los cuales se clasifican en factores extrínsecos e intrínsecos. Los factores extrínsecos están relacionados con las condiciones ambientales, como la temperatura, la humedad relativa, las concentraciones de O₂ y CO₂. Los factores intrínsecos están asociados con las propiedades físicas y químicas de los granos, entre ellos se encuentran el contenido de humedad (o la actividad acuosa), pH, composición nutricional, integridad del grano, etc. (Magan et al., 2010; Mills & Woods, 1994; Smith et al., 2016). Aunque son factores independientes, la interacción entre ellos determina la susceptibilidad a la contaminación y al subsiguiente desarrollo fúngico (Jallow et al., 2021). Por lo tanto, la incidencia de micotoxinas es variable y esporádica en diferentes años y regiones geográficas debido principalmente por las condiciones climáticas (Alshannaq & Yu, 2017; Medina, González-Jartín, et al., 2017; Pinotti et al., 2016). Los factores que presentan un mayor efecto sobre el crecimiento fúngico son el contenido de humedad (o actividad acuosa) y la temperatura. Cada hongo toxicogénico presenta diferentes valores óptimos y extremos de temperatura y actividad acuosa, lo que resulta en un crecimiento y producción de micotoxinas diferencial para cada uno (Magan & Lacey, 1984). Los cambios en las condiciones climáticas debidas al calentamiento global generan modificaciones en la microbiota de los cereales (Battilani et al., 2016; Chakraborty & Newton, 2011; Janhanger, 2018; Zhang et al., 2012).

La interacción con otros microorganismos, insectos y roedores, así como agentes antimicrobianos, también afectan el crecimiento y el metabolismo de los hongos. Asimismo, el genoma de la planta determina la cantidad de micotoxinas que puede producir un hongo que ha colonizado exitosamente el sustrato en la etapa de pre o postcosecha. La búsqueda de variedades resistentes así como las derivadas de la

ingeniería genética buscan controlar la producción de toxinas en cultivos como el maíz, maní y soja (Vaamonde, 1996).

I.4. Micotoxinas

Las micotoxinas son metabolitos secundarios de bajo peso molecular, producidos por ciertos hongos filamentosos, que tienen un efecto perjudicial sobre la salud humana y animal. Constituyen un problema a nivel mundial por su alta incidencia y niveles de ocurrencia en alimentos. Las especies toxicogénicas de mayor importancia pertenecen a tres géneros de hongos, *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium*. Estos hongos son capaces de crecer sobre una gran variedad de sustratos bajo diversas condiciones ambientales. Dentro de los 400 compuestos identificados como micotoxinas, 30 son los que mayor atención han recibido por sus efectos sobre la salud humana y animal (Alassane-Kpembé et al., 2017). Entre las familias más importantes de micotoxinas se encuentran las aflatoxinas (AFs) (B1, B2, G1, G2 y M1), los tricotecenos (principalmente deoxinivalenol -DON- y nivalenol -NIV), las ocratoxinas (principalmente ocratoxina A -OTA), las fumonisinas (FBs) (principalmente B1, B2 y B3) y la zearalenona (ZEA) (Agriopoulou et al., 2020; Pitt & Hocking, 2022). Ciertas micotoxinas pueden producir cuadros agudos, denominados micotoxicosis, pero los efectos más comunes sobre la salud son debidos a la exposición crónica. Los síntomas de la exposición a las micotoxinas son tan variados como sus estructuras químicas (Pitt & Hocking, 2022). Para cada toxina existe un órgano primariamente afectado, así el órgano blanco de las AFs es el hígado, para la OTA es el riñón, para el DON es la mucosa intestinal y para la ZEA es el tracto urogenital (Akbari et al., 2017; Zain, 2011).

En general las micotoxinas son resistentes a la temperatura (termoestables) y al procesamiento, como la molienda y el lavado, entre otras; lo que permite que permanezcan casi de manera inalterada en toda la cadena de producción (Echeverría & Chicagui Larrotta, 2015; Tolosa Chelós, 2017). Adicionalmente, ciertas especies de hongos son capaces de producir más de un tipo de micotoxinas, y una misma micotoxina puede ser producida por diferentes especies de hongos. En consecuencia, en un alimento contaminado se puede encontrar más de una micotoxina simultáneamente. La presencia simultánea de micotoxinas, puede presentar un efecto tóxico aditivo o sinérgico (Stoev, 2008). El estudio del efecto tóxico de la combinación de micotoxinas es limitado, por lo que se desconocen los riesgos de la exposición a múltiples micotoxinas para la salud humana (Siri-anusornsak et al., 2022). Se han estudiado *in*

vitro los efectos tóxicos sinérgicos de la exposición conjunta a AFs-FBs, AFs-DON y AFs-OTA (JEFCA, 2018; Ruiz et al., 2011; Smerak et al., 2001). Se ha detectado la co-ocurrencia de micotoxinas en maíz en EEUU durante los años 2017 y 2018, donde el 80 % de las muestras analizadas presentó por lo menos 4 micotoxinas diferentes en simultáneo (Fusilier et al., 2022). Resultados similares fueron obtenidos para maíz del Sudeste Asiático en donde más del 90 % de las muestras contenían AFs combinadas con FBs u OTA, y un 37 % de estas muestras presentaron 4 micotoxinas en simultáneo (AFs-DON-OTA-FB1) (Siri-anusornsak et al., 2022). El efecto sinérgico de las micotoxinas generaría daños en la salud humana y animal aun encontrándose dentro de los valores reglamentarios (Eskola et al., 2020; Grenier & Oswald, 2011).

I.4.1. Aflatoxinas

Las aflatoxinas son compuestos orgánicos, no proteicos, formados por un anillo de dihidro o tetrahidrofurano unido a un anillo de cumarina. Las cuatro aflatoxinas producidas naturalmente por los hongos son la aflatoxina B1, B2, G1 y G2. La “B” y la “G” hacen referencia a “blue” (azul) y “green” (verde) que son los colores producidos por fluorescencia bajo luz UV respectivamente. Existen otras dos aflatoxinas de importancia, denominadas M1 y M2, las cuales se obtienen por hidroxilación de las aflatoxinas B1 y B2 respectivamente, siendo excretadas en la leche de animales que han ingerido alimentos contaminados (Figura 6).

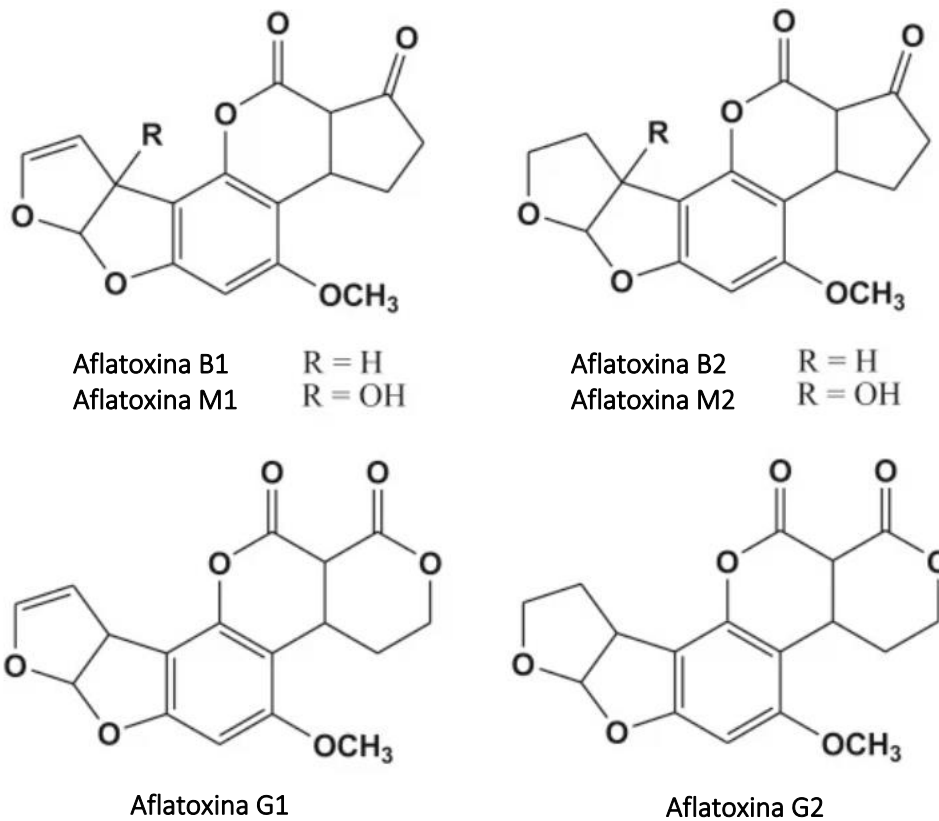


Figura 6: Estructura química de las aflatoxinas.

Las aflatoxinas son producidas en alimentos principalmente por *A. flavus* y *A. parasiticus*. Otras especies de *Aspergillus* productoras de la toxina, pero con menor impacto en alimentos, son *A. nomius* y *A. minisclerotigenes* (Pitt & Hocking, 2022). *A. flavus* sólo tiene la capacidad de producir aflatoxinas del tipo B, mientras que *A. parasiticus*, *A. nomius* y *A. minisclerotigenes* pueden producir de ambos tipos (B y G).

Las aflatoxinas presentan una toxicidad en humanos y animales que puede ser aguda o crónica. Los efectos tóxicos de las aflatoxinas se conocen desde hace años, sin embargo, en la actualidad parecería que los efectos son más diversos que los inicialmente identificados. Se cree que los efectos tóxicos de las aflatoxinas incluyen la toxicidad aguda, la carcinogenicidad hepática, el retraso del crecimiento en niños, la inmunosupresión y la cirrosis hepática (Pitt et al., 2012; Pitt & Hocking, 2022). La toxicidad aguda, denominada aflatoxicosis, es debida a concentraciones inusualmente altas en alimentos y en general es poco frecuente. Los síntomas en humanos incluyen vómitos, dolores abdominales, edema pulmonar, infiltraciones grasas y necrosis del

hígado que pueden ocasionar la muerte del individuo (IARC, 2015). El efecto de la exposición crónica a las aflatoxinas por alimentos contaminados (con menor concentración de aflatoxina en comparación a los casos agudos), producen un mayor impacto sobre la salud humana (Williams et al., 2004). Se ha demostrado que AFB1 es la sustancia más mutagénica y carcinogénica conocida, siendo clasificada como un carcinógeno humano de categoría 1 por la Agencia Internacional Investigaciones sobre el Cáncer (IARC, por sus siglas en inglés) (IARC, 1993; Rastogi et al., 2006). Adicionalmente, AFB1 es la aflatoxina que presenta mayor prevalencia (Neme & Mohammed, 2017). Le siguen en toxicidad AFG1 y AFM1 (JECFA 1999, 2017). En humanos, el principal órgano afectado es el hígado, ya que en él y a través de las enzimas del citocromo P450, se convierte en el 8-9 epóxido. Este epóxido puede unirse a las proteínas del hígado, generando una insuficiencia hepática; y unirse al ADN, lo que conlleva al desarrollo del cáncer de hígado (Bedard & Massey, 2006; Guimarães et al., 2018). El cáncer de hígado es el sexto tipo de cáncer más común en el mundo y dentro de los factores involucrados en su desarrollo se encuentran la exposición a aflatoxinas, la cual presenta un efecto sinérgico con el virus de la hepatitis B (Okeke et al., 2020). Adicionalmente, se ha encontrado una correlación entre deficiencias en el crecimiento en los primeros años de edad y la exposición a aflatoxinas (JEFCFA, 2018; Shirima et al., 2013; Turner et al., 2007). En cuanto a la inmunosupresión, los estudios en líneas celulares y animales domésticos evidencian el deterioro de la respuesta de hipersensibilidad retardada, disminuciones en la actividad fagocítica de los macrófagos, mayor susceptibilidad a la infección y respuesta reducida a las vacunas. En el caso de la salud animal, el impacto negativo de las aflatoxinas está asociado a una menor productividad (leche, huevos, ganancia de peso, etc.) (Moral et al., 2020; Neme & Mohammed, 2017).

La mayoría de las alertas reportadas en la Unión Europea por el Sistema de alerta rápida de alimentos y piensos (RASFF, por sus siglas en inglés) son debidas a lotes contaminados con aflatoxinas (Moral et al., 2020). Generalmente, la exposición humana a las aflatoxinas es debida principalmente al maíz y al maní, y en menor medida a los frutos secos. El maíz, el maní y el algodón son cultivos para los cuales *A. flavus* parece tener afinidad, invadiendo el cultivo antes de la cosecha; mientras que en granos pequeños (trigo, cebada y arroz) no parecería existir dicha afinidad y los altos niveles de aflatoxinas sólo aparecerían como el resultado de un almacenamiento deficiente (Pitt & Hocking, 2022). La exposición por los productos animales es generalmente baja, en particular, para los rumiantes los cuales desintoxican las aflatoxinas de manera eficiente. Los rumiantes pueden ingerir hasta 300 µg/kg de aflatoxinas, y no sufrir daño sobre la salud del animal, ni dejar residuo alguno en la carne. La excepción serían las vacas

lecheras por el riesgo de producción y secreción de AFM1 en la leche. Los niveles en huevos y carne de animales monogástricos pueden ser más altos, pero en general la toxicidad para el animal limita consumo de piensos excesivamente contaminados, minimizando así los residuos (Stoloff, 1977).

Es de destacar que además de la exposición por ingesta, se han detectado altos niveles de aflatoxinas (mayor a 600 µg/kg) en el polvo del aire generado durante la manipulación de maíz y maní (Sorenson, 1999). Una importante proporción de las aflatoxinas es contenida en los conidios de *A. flavus* y *A. parasiticus*, por lo que cuando se respiran se absorben a los pulmones generando efectos potencialmente perjudiciales sobre la función de los macrófagos alveolares (Miller, 1994; Williams et al., 2004). Además, las aflatoxinas pueden ser absorbidas a través de la piel, por lo que podría ser una fuente adicional de riesgo para las personas que trabajan con los granos contaminados (Pitt & Hocking, 2022).

Debido a los efectos tóxicos de las aflatoxinas fueron las primeras micotoxinas en establecerse, en 1960, niveles máximos en alimentos y piensos. Desde esa fecha en adelante se han impuesto a nivel mundial límites máximos, los cuales pueden variar de acuerdo al país o región (Magnoli et al., 2019). En EEUU para alimentos de consumo humano (exceptuando la leche) se acepta un límite máximo de 20 ng aflatoxinas totales/g alimento y de 0,5 ng/g en leche (FDA, 2000). En la Comunidad Europea, los límites son más estrictos y se aceptan los valores máximos de 4 a 15 ng/g (dependiendo del alimento) y entre 0,025 y 0,05 ng/g para la leche (EC, 2023). En ambos casos, los límites para la alimentación animal son un poco más permisivos, los valores dependen del tipo de animal, su edad y destino final de los mismos. Sin embargo, los valores permitidos se encuentran en los rangos de 20-300 ng/g en EEUU y 10-50 ng/g en EC (CAST, 2003; J. Smith, 1997). En Argentina y la región del Mercosur el límite regulatorio es de 20 ppb de AF totales y 5 ppb de AFB1 para alimentos para consumo humano y 0,5 ppb para AFM1 (siendo más restrictivos en el caso de alimentos para infantes) (CAA, Cap. III-Art. 156 bis y quinto).

I.4.2. Deoxinivalenol

Las principales micotoxinas producidas por el género *Fusarium* son los tricotecenos, los cuales son sesquiterpenos tricíclicos que contienen un doble enlace entre los C-9 y C-10 y un anillo 12,13-epóxido. Existen más de 200 tricotecenos, los cuales se clasifican en los grupos A, B, C y D, de acuerdo a las sustituciones en el C-8 y otras posiciones alrededor de la estructura central. Los tricotecenos de relevancia en

cereales son los del grupo A (no tienen un grupo carbonilo en la posición del C-8) al que pertenecen el diacetoxiscirpenol (DAS) y la toxina T-2, y los del grupo B (que tienen un grupo carbonilo en el C-8) al que pertenecen el nivalenol (NIV) y deoxinivalenol (DON) y sus derivados acetilados 4-acetilnivalenol (4-ANIV), 3-acetildeoxinivalenol (3-ADON) y 15-acetildeoxinivalenol (15-ADON) (Figura 7). En particular, las especies del complejo *F. graminearum* tienen el potencial de producir tres diferentes quimiotipos: 15-ADON (con producción de DON y 15-ADON), 3-ADON (con producción de DON y 3-ADON), y NIV (Desjardins, 2006).

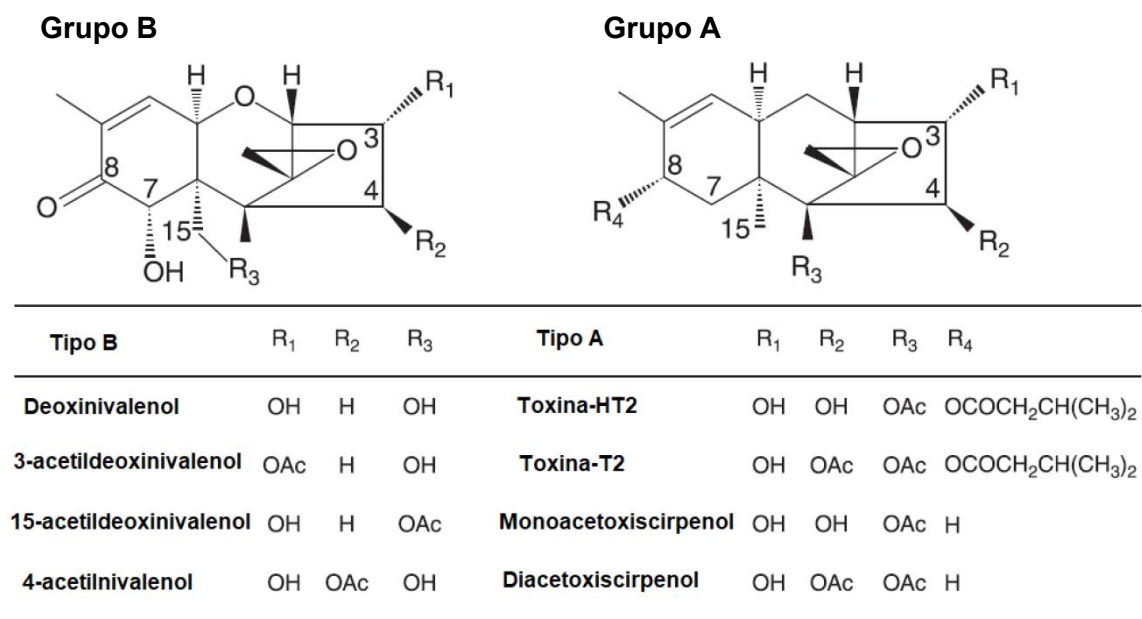


Figura 7: Estructura química de los tricotecenos de los grupos A y B (Rychlik, 2012).

Todos los tricotecenos son inhibidores de la síntesis de proteínas, que al unirse a los ribosomas eucarióticos interfieren con el correcto funcionamiento, generando una desregulación de proteínas relacionadas al sistema inmune y apoptosis. Dentro de los tricotecenos, el DON (también conocido como vomitoxina) no es el de mayor toxicidad, sin embargo es el más comúnmente encontrado en alimentos. A diferencia de las aflatoxinas, el DON no es carcinogénico, mutagénico ni teratogénico y está clasificado en el grupo 3 (no clasificable como cancerígeno en humanos) por la IARC (IARC, 1993; Pitt & Hocking, 2022). Los síntomas más comunes en humanos y animales incluyen lesiones en la mucosa del tracto gastrointestinal, resultando en hemorragias y toxicidades hematológicas, vómitos y rechazo del alimento, y en casos crónicos

anorexia, reducción de la ganancia de peso, cambios neuroendocrinos y daños inmunológicos (Larsen et al., 2004; Pestka, 2007; Pestka & Smolinski, 2005). Además, los tricotecnos tienen varios efectos fitotóxicos en una amplia variedad de plantas, sus tejidos y líneas celulares, provocando marchitez, clorosis, necrosis, entre otros (Desjardins, 2006). Las micotoxinas son estables luego de procesos de elaboración de alimentos y bebidas y, por lo tanto, es posible encontrarlas también en los productos procesados (Lauren & Smith, 2001). El DON genera efectos negativos sobre la salud de los animales, pero su transferencia a la carne, huevos o leche es prácticamente nula, por lo cual la exposición humana a esta toxina por ingesta de productos de origen animal es muy baja (Tolosa Chelós, 2017). La principal vía de exposición en humanos es a través de cereales y sus subproductos contaminados.

La legislación internacional regula los límites máximos en piensos y cereales (o sus derivados) para consumo humano. Dentro de las regulaciones, la Unión Europea establece un valor máximo de 1750 µg/kg para los granos de maíz enteros para consumo humano, mientras que la FDA recomienda valores de 1 ppm para trigo y sus derivados (FDA, 2010; EU, 2010). En nuestro país recién en el año 2019 se incorporó al Código Alimentario Argentino el límite máximo de DON, siendo el valor establecido de 1000 µg/kg para el maíz, trigo y sus derivados (CAA, Cap. III, Art. 156 quater).

I.5. Maíz y almacenamiento postcosecha

Dentro de las áreas destinadas a la agricultura mundial, los cultivos de cereales ocupan más de la mitad de la extensión (Dumitru et al., 2020). Los cereales de mayor importancia son trigo, arroz y maíz. El maíz (*Zea mays* L.) es el alimento más consumido en el mundo, cerca del 42 % de la población mundial depende del mismo. Alrededor del 87 % de la producción total de maíz se consume y produce en países en desarrollo (Dumitru et al., 2020; Khan et al., 2018). En Argentina el maíz representa uno de los cultivos más importantes, siendo el cuarto productor a nivel mundial; junto con EEUU, Ucrania y Brasil comprenden el 70 % de las exportaciones mundiales del grano (BCBA, 2021; Serna-Saldivar, 2018). Su producción está concentrada en las provincias de Córdoba, Buenos Aires, Santa Fe y Santiago del Estero (FADA, 2019). El maíz se emplea tanto para la alimentación humana como la animal y para la obtención de biocombustibles (Alaniz Zanon et al., 2022; Chulze et al., 2021; Dumitru et al., 2020).

En Argentina el maíz normalmente se cosecha con una humedad entre 14 y 16 %, pero existe también la cosecha del maíz con humedad entre 18 y 20 %, lo que

requiere secado para evitar el desarrollo fúngico (Chulze, 2010). En el país la humedad recomendada para el almacenamiento de los granos es de 14 % y el valor máximo oficial para la comercialización es de 14,5 % (Alaniz Zanon et al., 2022). De acuerdo a los informes del INTA Balcarce del 2015, los granos con una humedad mayor a 16 % representan un riesgo, ya que son condiciones en las que los hongos toxigénicos podrían crecer (de la Torre et al., 2015) (Tabla 1). Sin embargo, cuando la cosecha del maíz ocurre durante el otoño y a principios del invierno (con un clima caracterizado por ser húmedo y frío), los agricultores realizan la cosecha con altas humedades (19-22 %), por lo cual necesita un secado extenso, lo que conlleva a un mayor riesgo de contaminación (Alaniz Zanon et al., 2022). Cuando el maíz presenta una humedad superior a 25 %, se puede almacenar en sistemas herméticos como las silobolsas, lo que favorece el crecimiento de BAL que acidifican el medio a valores que inhiben el desarrollo fúngico. El maíz así almacenado es empleado para el consumo animal (de la Torre et al., 2018).

Tabla 1: Humedad del maíz y tiempo de almacenamiento seguro

Humedad	Riesgo	Tiempo de almacenamiento seguro	Prácticas recomendadas	Consumo
< 14,5 %	Bajo	Entre 6 meses y 1 año	Almacenar en silobolsa o silo tradicional con aireación	Humano o animal
14,5 - 16,5 %	Moderado	Entre 1 y 3 meses	Almacenar en silobolsa Bajar humedad y almacenar en silo tradicional	Humano o animal
16,5 – 25 %	Alto	No se puede conservar	Secar hasta 14,5 % de humedad Humedecer encima de 25 % humedad	Humano o animal
> 25 %	Bajo	Entre 6 meses y 1 año	Almacenar en silobolsa	Animal

Tabla adaptada de de la Torre et al. (2015)

I.6. Contaminación fúngica del maíz y micotoxinas asociadas

Los principales hongos filamentosos relacionados con la contaminación del maíz pertenecen a los géneros *Fusarium*, *Aspergillus* y *Penicillium*. Especies de los géneros *Fusarium* y *Aspergillus* representan el mayor riesgo sobre los granos. Si bien las especies micotoxigénicas de *Fusarium* se encuentran más extendidas que las de *Aspergillus*, estas últimas producen micotoxinas de mayor impacto en la salud humana y animal (Serna-Saldivar, 2018).

Fusarium es el principal patógeno del maíz en la planta, entre las especies más comunes se encuentran *F. graminearum*, *F. verticillioides*, *F. proliferatum* y *F. subglutinans* (Burgess et al., 1981; Marasas, 1984; Pitt & Hocking, 2022; Serna-Saldivar, 2018). La primera de estas especies habitualmente causa una pudrición generalizada, que se detecta en la superficie del grano como una decoloración y presencia de micelio de color rosado a rojo (Burgess et al., 1981). En Argentina las especies de este género se encuentran en todas las regiones de cultivo del maíz, siendo *F. verticillioides* la especie predominante, seguido por *F. proliferatum* y *F. graminearum* (Chiotta et al., 2020) (Tabla 2).

Dentro de las especies de *Aspergillus* contaminantes del maíz, *A. flavus* y *A. parasiticus* son las más relevantes. Ambas especies pueden crecer y contaminar el maíz durante el almacenamiento debido a la capacidad de crecer a altas temperaturas y bajas actividades acuosa, condiciones factibles en el almacenamiento. A partir de 1970 se citan reportes en EEUU para *A. flavus* en maíz recién cosechado con altos niveles de aflatoxinas (Lillehoj, Fennell, et al., 1976; Lillehoj, Kwolek, et al., 1976; Shotwell, 1977). Bajo ciertas condiciones ambientales, de altas temperaturas y estrés hídrico, *A. flavus* puede crecer de manera extensiva en los cultivos a campo, generando altos niveles de aflatoxinas precosecha. *A. flavus* se encuentra ampliamente distribuido en el maíz mundial, sin embargo es más común encontrarlo en regiones cálidas (Serna-Saldivar, 2018). Dado el aumento de las temperaturas promedio su incidencia y sus micotoxinas asociadas parecerían estar aumentando en varios países europeos (Pitt & Hocking, 2022).

A nivel mundial existen varias micotoxinas asociadas al maíz, la predominancia de una u otra depende de la región geográfica y del año. Luego del trigo, el maíz en Europa es el grano con la mayor presencia de micotoxinas, siendo las de mayor concentración FBs, DON, AFs y ZEA (Palumbo et al., 2020). Asimismo, en América del Sur, en un estudio que evaluó la presencia de micotoxinas en maíz comercial de Argentina, Brasil, Bolivia, Colombia y Perú en los años 2020 y 2021, las principales

micotoxinas encontradas fueron FBs, ZEA y AFB1 (Tyska et al., 2022). Por otro lado, en una investigación entre los años 2015 y 2017 en maíz de la provincia de Buenos Aires, se observó la presencia de *Fusarium* sp. con producción de distintas micotoxinas. La concentración de DON tuvo valores entre 281 y 359 ng/g en el 90 % de las muestras, las FBs se detectaron a valores muy bajos de 0,3 ng/g en ciertas muestras, mientras que NIV y ZEA no fueron detectadas (Castañares et al., 2019). Sin embargo, una revisión de Chiotta et al. (2020) cita para el maíz de distintas regiones de Argentina a las FBs como las micotoxinas de mayor concentración, con valores entre 1000 y 10.000 ng/g. Mientras que DON y ZEA se detectaron entre el 10 y 30 % de los casos, con valores entre 0,1-140 ng/g y 0,1-85 ng/g respectivamente. Los autores destacan la baja incidencia de aflatoxinas en maíz de Argentina (5-10 %), aunque la misma está influenciada por las condiciones climáticas (Chiotta et al., 2020).

Tabla 2: Principales especies fúngicas y micotoxinas asociadas al maíz en Argentina

Especie fúngica	Incidencia (%)	Micotoxina	Muestras positivas (%)	Concentración (ng/g)
<i>Fusarium verticillioides</i>	80-100	FBs	90-100	1.000-10.000
<i>F. proliferatum</i>	10-20	--	--	--
<i>F. graminearum</i>	60-75	DON	30	0,1-140
		ZEA	<10	0,1-85
<i>Aspergillus flavus</i>	10-70	AFs	5-10	30-300
<i>A. parasiticus</i>	10-30	--	--	--

FBs: fumonisinas; DON: deoxinivalenol; ZEA: zearalenona; AFs: aflatoxinas. Tabla adaptada de Chiotta et al. (2020).

En conclusión, las distintas investigaciones demuestran la importancia de detectar la presencia de las micotoxinas AFs, DON, FBs y ZEA en maíz, dado el efecto adverso sobre la salud humana y animal.

I.7. Prevención de contaminación fúngica

La contaminación fúngica tiene múltiples orígenes posibles, por lo que es necesario un enfoque integral para la prevención de la infección por hongos y sus micotoxinas asociadas. El Codex Alimentarius ha desarrollado varias guías en donde se agrupan las prácticas a realizar para la prevención de la contaminación de cultivos, materias primas y productos, las cuales se basan en las buenas prácticas agrícolas (BPA), buenas prácticas de manufactura (BPM) y el análisis de peligros y de puntos críticos de control (más conocido por sus siglas en inglés HACCP) (Awad et al., 2010) (FAO, 2001). Las guías tratan las prácticas en las diferentes etapas, pre y postcosecha, de la cadena de producción. Las prácticas precosecha abarcan la selección de cultivares resistentes y semillas de buena calidad, la labranza de la tierra, evitar la sobrepoblación de plantas, la rotación de cultivos, así como el control de insectos, entre otras. Entre las prácticas postcosecha se destacan la limpieza y selección de las cosechas, el control de la humedad y temperatura, buenas condiciones de almacenamiento y el control de plagas (Habschied et al., 2021; Vila-Donat et al., 2018; Xu et al., 2022).

I.7.1. Control biológico de hongos filamentosos

El uso excesivo y prolongado de agroquímicos para el control de hongos resulta perjudicial tanto para seres humanos, como animales y ecosistemas. Por lo tanto, técnicas alternativas complementarias como el control biológico se aplican para la prevención de infecciones (Nguyen et al., 2017). La búsqueda y desarrollo de agentes de biocontrol contra hongos filamentosos ha sufrido un impulso en la última década debido al retiro del mercado, por parte de la Unión Europea, de una serie de grupos de compuestos químicos utilizados en la protección de cultivos (Medina, Mohale, et al., 2017). Entre los microorganismos evaluados como agentes de control biológico, se encuentran bacterias, levaduras y hongos filamentosos atoxigénicos (Nešić et al., 2021). El uso de levaduras presenta ventajas frente a otros microorganismos, ya que sus requerimientos nutricionales son sencillos, permiten la colonización de una amplia gama de sustratos y a su vez no producen esporas alergénicas, micotoxinas o antibióticos (Chanchaichaovivat et al., 2007; Freimoser et al., 2019; Hernandez-Montiel et al., 2021). Diversas investigaciones demuestran la capacidad antifúngica de las levaduras en diferentes matrices de alimentos y piensos infectados por hongos como frutas, verduras y cereales. Los hongos contaminantes característicos de cada matriz, pertenecientes a

los géneros *Alternaria*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Mucor*, *Rhizopus* y *Botrytis*, fueron inhibidos por levaduras de diversos géneros como *Candida*, *Debaryomyces*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Wickerhamomyces*, *Metschnikowia*, entre otros (Freimoser et al., 2019; Hernandez-Montiel et al., 2021; Piasecka-Jozwiak & Chablowska, 2017).

Los mecanismos de acción de inhibición fúngica de los microorganismos antagonistas, incluyen:

- *Competencia por nutrientes y espacio*: el agente de biocontrol compite con el hongo filamentoso contaminante por el espacio y/o por uno o varios nutrientes, como pueden ser las fuentes de carbono, nitrógeno, hierro, agua, etc., lo que en consecuencia conlleva a una disminución del crecimiento del hongo. Se considera que este es el principal modo de acción de las levaduras antagonistas (Schaible & Kaufmann, 2005; Spadaro & Droby, 2016; Wisniewski et al., 2007).

- *Liberación de metabolitos antifúngicos*: el antagonista libera compuestos con capacidad antifúngica durante su metabolismo primario y secundario. Existen dos grandes grupos de compuestos:

a) *Compuestos solubles en el medio*: son moléculas que difunden al medio en donde se aplica el antagonista, siendo compuestos de naturaleza muy variada. Uno de los compuestos más conocidos y estudiados en el caso de las levaduras, son las toxinas killer de naturaleza peptídica. El primer registro para este tipo de toxinas fue en *S. cerevisiae*, que las liberaba al medio al competir con otras levaduras. Luego se observó que estas toxinas también podían actuar sobre hongos filamentosos contaminantes de alimentos (Freimoser et al., 2019).

b) *Compuestos orgánicos volátiles (VOC)*: son moléculas pequeñas (< 300 Da) con baja solubilidad en agua y alta presión de vapor. Los compuestos pertenecen a una amplia gama, entre los que se encuentran los alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres, etc. (Morath et al., 2012). La inhibición a través de estos metabolitos sería superior a la de los compuestos solubles, ya que pueden difundir a mayores distancias en sistemas heterogéneos compuestos por sólidos, líquido y gases (Fialho et al., 2010).

- *Liberación de enzimas líticas*: el antagonista libera al medio enzimas relacionadas con la degradación de la pared fúngica, como lo son las quitinasas, glucanasas y proteasas (Castoria et al., 1997, 2001; Chernin & Chet, 2002; Jijakli & Lepoivre, 1998; Lorito et al., 1993; Mortuza & Ilag, 1999).

- *Parasitismo*: este mecanismo de acción es más frecuente en hongos filamentosos como agentes biocontrol, como lo son *Trichoderma* y *Gliocladium*. Hay poca información bibliográfica de este mecanismo de acción en levaduras antagonicas. El primer reporte de parasitismo en levaduras, fue observado para *Pichia guilliermondii* sobre *Botrytis cinerea* y *Penicillium* sp. (Sharma et al., 2009; Wisniewski et al., 1991).

- *Inducción de la resistencia de la planta*: la adición de un microorganismo no patógeno puede aumentar la respuesta del sistema inmune de la planta, aumentando así sus defensas contra hongos patogénicos. Hay varios reportes de este mecanismo, entre los que se pueden destacar el de los aislamientos de *S. cerevisiae*, *Rhodosporidium paludigenum*, *Candida saitoana*, *C. oleophila* y *Metschnikowia* sp. contra hongos patogénicos en frutas (de Miccolis Angelini et al., 2019; Droby et al., 2002; Freimoser et al., 2019).

En el biocontrol suelen actuar varios mecanismos de acción simultáneamente, siendo la competencia por nutrientes y espacio uno de los principales mecanismos de acción de los antagonistas (Droby et al., 2000; Janisiewicz et al., 2000). El grado de importancia de cada mecanismo varía de acuerdo a la especie de levadura antagonica, al hongo contaminante, y a la matriz de aplicación (Liu et al., 2013). Conocer el modo de acción de los agentes de biocontrol es fundamental para el control del crecimiento fúngico, y a su vez permite identificar los posibles riesgos a los humanos y al ambiente, y la posibilidad de generación de resistencia por parte del hongo patógeno (Mohanram & Kumar, 2019).

1.7.2. Agentes de biocontrol comerciales

Los estudios relacionados con microorganismos para biocontrol han aumentado considerablemente en los últimos años, sin embargo la disponibilidad de productos de biocontrol en el mercado es limitada. Los productos disponibles han ido lentamente en aumento, especialmente en países como EEUU, que cuentan con la mayor proporción

en el mercado (Lahlali et al., 2022). Para que un microorganismo pueda ser usado como agente de biocontrol no sólo debe ser efectivo contra el hongo blanco, sino que además debe considerarse su bioseguridad, condiciones de producción, opciones de formulación y equipamiento para su aplicación (Freimoser et al., 2019). Luego del estudio de sus características y el otorgamiento de los permisos requeridos para su aplicación y comercialización de acuerdo a la legislación pertinente, han llegado al mercado agentes de biocontrol que incluyen bacterias, hongos filamentosos atoxigénicos y levaduras. Los agentes de biocontrol aprobados por la Agencia de Protección Ambiental de EEUU (EPA, del inglés “Environmental Protection Agency”) pertenecen principalmente a hongos filamentosos y bacterias (Lahlali et al., 2022). Dentro de las levaduras se han comercializado los productos Nexy[®] (Lesaffre - Bionext, Francia) y Aspire[®] (Ecogen Inc., EEUU) cuyo agente de biocontrol en ambos es *Candida oleophila*, los mismos son empleados en frutas. Aspire[®] fue el primer producto de biocontrol postcosecha comercializado (Wisniewski et al., 2007). Otros productos comerciales son Boni-Protect[®] (Bio-protect, Alemania) con *Aureobasidium pullulans* como su agente de biocontrol, Shemer[®] (Bayer CropScience, Israel) con *Metschnikowia fructicola* y Yieldplus[®] (Lallemand, Montreal, Canadá) con *Cryptococcus albidus*. Yieldplus[®] y Aspire[®] luego de haber sido comercializados por mucho tiempo, fueron retirados del mercado (Droby et al., 2009; Freimoser et al., 2019; Mbili, 2012). En la siguiente tabla se detallan los productos de biocontrol, con sus microorganismos involucrados y la matriz sobre la cual pueden ser aplicados.

Tabla 3: Agentes de biocontrol comerciales

Producto	Fabricante	Levadura de biocontrol	Matriz de aplicación	Patógeno blanco
Nexy®	Lesaffre - Bionext, Francia	<i>Candida oleophila</i>	Plátanos, manzanas, cítricos	<i>Botrytis cinerea</i> ; <i>Penicillium</i> spp.; <i>Colletotrichum musae</i>
Boni-Protect®	Bio-protect, Alemania	<i>Aureobasidium pullulans</i>	Frutas pomáceas*	<i>Neofabraea</i> spp.; <i>Penicillium expansum</i> , <i>Monilinia fructigena</i> ; <i>Botrytis cinerea</i>
Shemer®	Bayer/Koppert, Países Bajos	<i>Metschnikowia fructicola</i>	Batatas, uvas, frutas pomáceas*, drupas**, frutillas	<i>Botrytis cinerea</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Rhizopus</i> , <i>Aspergillus</i>
Candifruit®	IRTA/Sipcam - Inaagri, SA Valencia, España	<i>Candida sake</i>	Frutas pomáceas*	<i>Penicillium</i> , <i>Botrytis cinerea</i> , <i>Rhizopus</i>
Yield Plus®	Anchor yeast, Sudáfrica	<i>Cryptococcus albidus</i>	Frutas pomáceas*, cítricos	<i>Botrytis cinerea</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Mucor</i>
Aspire®	Ecogen, EEUU	<i>Candida oleophila</i>	Frutas pomáceas*, drupas**, cítricos, frutillas	<i>Botrytis cinerea</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Monilinia</i>

*Frutas pomáceas: pera, manzana, etc. **Drupas: ciruela, cereza, durazno, etc. Tabla adaptada de Freimoser et al. (2019) y Lahlali et al. (2022).

La eficiencia de los productos de biocontrol a campo suele ser baja, además de que su disponibilidad en el mercado puede ser escasa, por lo que la aceptación por parte de los agricultores no siempre es buena, prefiriendo el uso de fungicidas sintéticos (Lahlali et al., 2022). En Argentina no existe una legislación específica para el registro y comercialización de agentes de biocontrol, su uso se regula según la Resolución 350/99, que aprueba el Manual de Procedimientos, Criterios y Alcances para el Registro de Productos fitosanitarios en la República Argentina, con el fin de aprobar la venta y utilización de los mismos previa evaluación de datos científicos suficientes que demuestren que el producto es eficaz para el fin que se destina y no presenta riesgos a la salud y el ambiente (SENASA, 1999). De acuerdo a datos publicados por SENASA,

en el año 2014 sólo 11 productos biológicos estaban registrados, perteneciendo la mayoría a bacterias del género *Bacillus* (Rivera et al., 2014).

I.7.3. Biocontrol y micotoxinas

Las investigaciones en biocontrol se centran mayormente en el efecto del antagonista sobre la inhibición del hongo patogénico, siendo más escasos los estudios acerca del efecto sobre la producción de micotoxinas. La producción de micotoxinas depende de múltiples factores, por lo que la inhibición del crecimiento de un hongo micotoxigénico no necesariamente involucra la reducción en la producción de micotoxinas. Por lo tanto en los estudios de biocontrol es importante analizar el crecimiento fúngico, así como también el contenido de micotoxinas (Pfliegler et al., 2015). Sin embargo, el principal abordaje en el control de micotoxinas involucra la eliminación o reducción del inóculo del hongo micotoxigénico en las etapas pre y postcosecha (Neme & Mohammed, 2017), lo cual puede ser logrado a través de biocontrol como fue detallado en el ítem I.7.1. Otra estrategia consiste en la decontaminación de las micotoxinas en postcosecha (Taheur et al., 2019). La decontaminación de micotoxinas se refiere al tratamiento para remover, destruir o modificar la estructura de las micotoxinas en la matriz, para reducir su efecto tóxico. Las estrategias para prevenir la presencia de micotoxinas y eliminar, inactivar o reducir su biodisponibilidad en alimentos contaminados incluyen métodos físicos, químicos y biológicos (CAST, 2003; Bueno et al., 2001; Kabak et al., 2006). Dentro de los métodos físicos se encuentran la inactivación térmica, irradiación y tratamiento con plasma de baja temperatura. Por otro lado, los métodos químicos se basan en la adición de diferentes sustancias químicas que reaccionan con las micotoxinas disminuyendo su concentración, como los ácidos (fórmico y propiónico), bases (amoníaco, hidróxido de sodio), agentes oxidantes (ozono, peróxido de hidrógeno), agentes reductores (bisulfito de sodio) y adsorción (zeolitas, arcillas, carbón activado). Por último, los métodos biológicos consisten en el agregado de microorganismos que pueden adsorber y/o degradar las micotoxinas. Los métodos físicos y químicos de detoxificación tienen de limitaciones los equipamientos costosos, consumo excesivo de tiempo para su aplicación, ineficiencia, pérdida de nutrientes y en algunos casos presentan residuos que pueden representar un riesgo a la salud (Agriopoulou et al., 2020; Stoev, 2013). En comparación, los métodos biológicos son más eficientes, específicos y amigables con el ambiente (Wang et al., 2019). Recientemente, se han estudiado estrategias

novedosas para la decontaminación de micotoxinas que involucran el uso de extractos de plantas y nanopartículas (Agriopoulou et al., 2020; Habschied et al., 2021).

Dentro de los métodos biológicos aplicados postcosecha se encuentran la adsorción y la biodegradación de las micotoxinas por microorganismos. Las levaduras, viables o no, tienen la capacidad de adsorber micotoxinas y disminuir su biodisponibilidad en alimentos y piensos (Luo et al., 2020). Se considera que este fenómeno es debido a la adsorción a la pared celular, y dado que la composición de las paredes de las levaduras es muy variada, existen diversas capacidades de adsorción (McCormick, 2013; Pfliegler et al., 2015). Además, la adsorción depende de diversos factores como el tipo de micotoxina, el microorganismo usado y su concentración, la temperatura y el pH, entre otros. La integridad de la pared celular de las levaduras es un aspecto relevante en la adsorción de micotoxinas (Armando et al., 2012; Guo et al., 2012; Luo et al., 2020). Se evidenció que la adsorción de patulina por parte de levaduras de los géneros *Saccharomyces*, *Candida* y *Pichia*, disminuía o desaparecía cuando la pared celular era dañada artificialmente o removida. Adicionalmente, se determinó que las paredes celulares con una red tridimensional más densa y gruesa, presentaban mejores capacidades de adsorción de la micotoxina (Luo et al., 2015). Resultados similares fueron obtenidos para OTA y ZEA frente a la pared celular de *S. cerevisiae* (Armando et al., 2012). En el año 2009, la Unión Europea incorporó a su legislación una nueva categoría de aditivos para ser usados en la alimentación animal, que aprobaba el uso de adsorbentes de micotoxinas en los piensos (EC, 2009).

La biodegradación consiste en el uso de microorganismos y/o sus enzimas para degradar las micotoxinas y convertirlas en productos con menor o nula toxicidad (Li et al., 2018; Petruzzi et al., 2014). Los mecanismos de biotransformación de bacterias, hongos y levaduras, incluyen (de)acetilación, oxigenación, escisión de anillo o cadena lateral, deepoxidación, isomerización y glucosilación (Wielogórska et al., 2016). La aplicación de la biotransformación en alimentos presenta la desventaja de la posible generación de cambios en las propiedades organolépticas, especialmente en alimentos con base láctea o jugos de frutas (Luo et al., 2016). En comparación con la adsorción, la biodegradación no ha tenido una amplia aplicación en alimentos/piensos, lo que puede deberse a la falta de información en relación a los mecanismos involucrados, la toxicidad de los productos generados y el efecto sobre el valor nutricional (Wielogórska et al., 2016). De acuerdo a los antecedentes consultados sólo habría un producto comercial con este mecanismo de acción, el Mycofix® BBSH (Biomim, Getzersdorf, Austria), elaborado con la bacteria *Eubacterium* BBSH 797 aislada de rumen bovino, la cual tiene la capacidad de biotransformar DON y otros tricotecenos en piensos (Vila-Donat et al., 2018).

I.8. Rasgos fenotípicos asociados a virulencia

La investigación en levaduras como agentes de biocontrol en alimentos, requiere el estudio del potencial de virulencia de las mismas (de Melo Pereira et al., 2022; Nally, 2011). La virulencia es un proceso multifactorial por lo cual su estudio integral resulta complejo de abordar. El desarrollo de la infección no sólo depende de los factores de virulencia de la levadura sino también de la respuesta inmune del huésped (Van Burik & Magee, 2001). Así es como respuestas del huésped muy exacerbadas o muy débiles pueden conllevar a daño y la consecuente infección (Brunke et al., 2016). Se han relacionado rasgos fenotípicos con la virulencia de las levaduras principalmente a través de estudios *in vitro* comparando aislamientos clínicos frente a cepas industriales no virulentas. En levaduras patógenas como *Candida albicans* y *Cryptococcus neoformans*, se han descrito diferentes rasgos fenotípicos relacionados con la virulencia de las mismas (Ciurea et al., 2020; Karkowska-Kuleta et al., 2009; Yang, 2003). Estos factores están asociados con los dos procesos requeridos para la patogénesis: a) supervivencia y crecimiento del microorganismo patógeno en el huésped y b) daño y disrupción de la homeostasis del huésped que se manifiestan como síntomas de la enfermedad (Brunke et al., 2016). Entre los rasgos generales asociados a la patogenicidad se encuentran el crecimiento a 37 y 42 °C, la capacidad de liberar enzimas hidrolíticas, la capacidad de adhesión, crecimiento invasivo, resistencia al estrés oxidativo, entre otras. Se cree que la resistencia de los mamíferos a las infecciones fúngicas se debe a una combinación entre el aumento de la temperatura corporal (fiebre) y la inmunidad adaptativa, por lo cual la capacidad de la levadura a crecer a altas temperaturas es crucial para el establecimiento de la infección (Robert & Casadevall, 2009; Van Burik & Magee, 2001). Por otro lado, la liberación de enzimas hidrolíticas facilita la adhesión e invasión de los tejidos, generando daño celular y permitiendo la nutrición del patógeno; entre las enzimas liberadas se encuentran las proteasas, lipasas y fosfolipasas (Karkowska-Kuleta et al., 2009; Llopis Pla, 2012). La capacidad de adhesión de las levaduras patógenas a las células epiteliales es un factor crucial para la posterior colonización, penetración e invasión de los tejidos (Hernández Haro, 2014). Para facilitar este proceso, algunas levaduras patógenas alteran su estructura o morfología, este es el caso de *C. albicans* y *C. neoformans* (Karkowska-Kuleta et al., 2009). Las levaduras patógenas también presentan otros mecanismos que le permiten evadir la respuesta inmune del huésped, uno de ellos es la resistencia al estrés oxidativo ejercida por especies reactivas del oxígeno y nitrógeno generadas por varias células fagocíticas del huésped, las cuales son tóxicas para la mayoría de los microorganismos (Bogdan et al.,

2000). Una definición clara de qué es un factor de virulencia es difícil de obtener ya que muchos de los atributos tienen un “doble sentido”, es decir que factores que son importantes para la virulencia pueden ser usados por cepas no patógenas para la supervivencia al ambiente (Brunke et al., 2016). Además, se han encontrado superposición entre atributos deseables en un agente de biocontrol y los relacionados con la virulencia (Zajc et al., 2019). Por lo tanto, es probable que los factores exclusivamente específicos del patógeno o del huésped sean raros o inexistentes y, en un sentido más amplio, un factor de virulencia es un rasgo de supervivencia que se da en un huésped (susceptible), que por su acción directa y la respuesta del huésped resulta en la infección (Brunke et al., 2016). Existe una gran controversia respecto al origen evolutivo y la composición genética específica asociada a un carácter clínico de las levaduras, por lo que se desconoce con exactitud si cualquier cepa, independientemente de su nicho ecológico u origen geográfico, podría ser capaz de llevar a cabo una colonización si encuentra las condiciones favorables en el hospedador (Llopis Pla, 2012).

I.9. Capacidad antifúngica del kefir

Entre las variadas propiedades del kefir, enumeradas anteriormente (Figura 2), se destaca la capacidad antimicrobiana. Se ha registrado capacidad antimicrobiana del kefir contra bacterias patógenas como *Escherichia coli*, *Shigella sonnei*, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus*, entre otras; parásitos como *Giardia* y hongos como *Candida albicans* y *Aspergillus* spp., entre otros (Franco et al., 2013; Kim et al., 2016; Londero et al., 2014; Silva et al., 2009). Gamba, Caro, et al. (2016) observaron que la leche fermentada con gránulos de kefir, inhibía el crecimiento de *Aspergillus flavus in vitro*, y cuando se aplicaba a arepas de maíz se alargaba su vida útil. Otro estudio de los mismos autores demostró que el permeado de suero fermentado con granos de kefir inhibía el crecimiento de *A. flavus*, *A. parasiticus* y *Penicillium sumatrense*, *in vitro* y cuando se añadía a pan y a alimento de aves, lo que aumentaba su resistencia a la contaminación por hongos (Gamba, Moure, et al., 2016). En diversas investigaciones se observaron altas inhibiciones de *Fusarium* sp. y *Aspergillus* spp. enfrentados a leche fermentada con kefir de leche (Al-Mohammadi et al., 2021; Ismaiel et al., 2011; Taheur et al., 2020; Tenorio-Salgado et al., 2021). A su vez, Al-Mohammadi et al. (2021) analizaron la inhibición de la leche fermentada neutralizada encontrándose inhibiciones (las cuales fueron menores que las obtenidas con la leche fermentada sin neutralizar) y

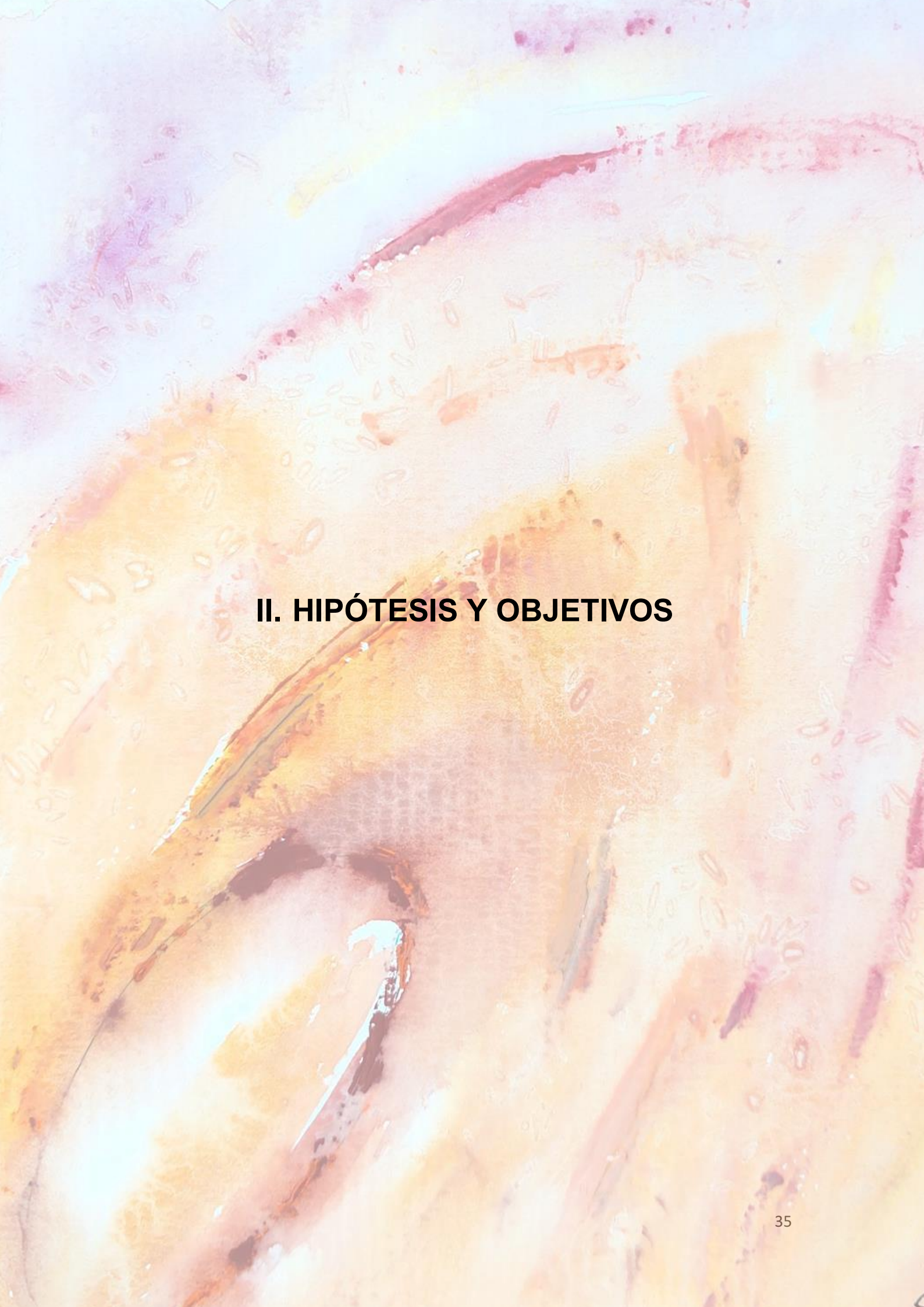
concluyeron que la inhibición no era debida exclusivamente al pH ácido sino a la presencia de otras sustancias liberadas al medio. Se ha propuesto que el efecto inhibitorio es debido a un efecto sinérgico entre ambos (Arena et al., 2019). Tenorio-Salgado et al. (2021) postularon que la inhibición ejercida por el kefir de leche se debe a la liberación de metabolitos al medio, así como también a la competencia por nutrientes y espacio, lo que explicaría por qué el SLC presenta menor poder inhibitorio que el sobrenadante completo.

La capacidad inhibitoria ha sido estudiada tanto en kefir entero, como en sus microorganismos aislados. En particular, el estudio de las bacterias ácido lácticas (BAL) ha ganado más predominio, es así que en una revisión reciente se señala que en los estudios antimicrobianos empleando kefir el 91,66 % correspondía a BAL (Arias-agudelo et al., 2022). En particular para el efecto antifúngico, existen diversas investigaciones que documentan su capacidad antifúngica frente a los géneros *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium* y *Botrytis* (Chen et al., 2021; Purutoğlu et al., 2020). Si bien diversas investigaciones se han centrado en las levaduras del kefir, aún los antecedentes son escasos. En un estudio reciente, la capacidad de inhibición de levaduras aisladas del kefir de leche —*Saccharomyces* sp., *Meyerozyma* sp. y *Kazachstania* sp.— frente a *Penicillium* spp. en frutos, demostró un grado variable de inhibición fúngica según la especie estudiada (Zhimo et al., 2020).

En cuanto a la producción de micotoxinas, se encontró que la leche fermentada con kefir de leche (24 h a 25 °C) generaba una inhibición casi total (99 %) en la producción de AFB1 y OTA. La inhibición bajaba levemente al utilizar el sobrenadante libre de células, pero caía drásticamente a valores de 28 y 9 % respectivamente cuando el sobrenadante era neutralizado a pH 7. Los autores destacaron la adsorción como el mecanismo principal más probable, y agregaron un posible efecto de los ácidos orgánicos que pueden reaccionar con AFB1 convirtiéndola en un producto considerablemente menos tóxico (Taheur et al., 2020). Al analizar la capacidad del consorcio del kefir de leche de decontaminar AFB1, ZEA y OTA se determinó que la capacidad de adsorción se hallaba entre 82 y 100 % en leche y no se detectaron productos de biotransformación. Entre los microorganismos aislados del consorcio, el de mayor capacidad de adsorción fue la levadura *Kazachstania servazii*, que presentó valores entre 62 y 94 % (Taheur et al., 2017). Du et al. (2021) registraron valores de adsorción de OTA del 90 % con kefir de leche fermentado en leche, pero al aislar los microorganismos del consorcio y analizar su adsorción, ninguno superaba el 47 %. En otro estudio se investigó la remoción de AFG1 por gránulos de kefir de leche en pistachos, determinando que aún en una baja proporción de gránulo (10 %) la

eliminación era alta (hasta 96 %), lo que sugiere alta eficiencia para la eliminación de la micotoxina frente al consorcio (Ansari et al., 2015).

En cuanto a los estudios del kefir de agua, los antecedentes son más escasos. En un estudio, se observó la capacidad del kefir de agua junto a su sobrenadante de inhibir el crecimiento de *A. flavus* en sorgo húmedo, comportamiento que no fue observado al utilizar sólo el sobrenadante libre de células; por lo cual el efecto inhibitorio se relacionó con los microorganismos (Gonda et al., 2019). Por otro lado, se observó una reducción en la germinación de conidios, en la tasa de crecimiento y un aumento del tiempo de latencia de *A. ochraceus*, al ser enfrentado *in vitro* con sobrenadantes libres de células de soluciones de panela (azúcar poco refinada) fermentadas con kefir de agua (Caro Velez & León Peláez, 2015; Caro Vélez & León Pelaez, 2014). Bahati et al. (2021) observaron que las BAL aisladas de kefir de agua presentaron altas capacidades de adsorción de patulina en jugo de manzana (93 %).

The background is a watercolor illustration with a warm, golden-yellow and orange color palette. It features soft, blended washes of color and some darker, more defined strokes, creating an abstract, textured effect. The overall composition is organic and artistic.

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

II.1. Hipótesis

La diversidad de microorganismos presentes en los gránulos de kefir se relaciona con la capacidad antimicrobiana del consorcio. Las levaduras que lo conforman presentan propiedades antifúngicas contra hongos filamentosos contaminantes de matrices alimentarias. En consecuencia, las levaduras pueden aplicarse como agentes de control biológico evitando o retrasando el crecimiento fúngico y la producción de las micotoxinas concomitantes en la matriz.

II.2. Objetivo General

Los hongos filamentosos son contaminantes de una amplia gama de alimentos, produciendo pérdidas económicas a nivel mundial por disminución de calidad y de seguridad alimentaria. El control biológico ha emergido como una alternativa para el control de las infecciones con un menor impacto ambiental por la reducción del uso de pesticidas. La búsqueda de microorganismos para biocontrol comprende una variedad de nichos, entre los cuales el kefir resulta novedoso por sus escasos antecedentes. Por lo tanto el objetivo de este trabajo es determinar la presencia de distintas especies de levaduras en la microbiota de kefir de diferentes orígenes y caracterizar su potencial antifúngico frente a especies de *Aspergillus* y *Fusarium graminearum* para su posible aplicación como agentes de biocontrol.

II.3. Objetivos específicos

1. Aislar, caracterizar e identificar levaduras provenientes del kefir de distintos orígenes, cultivados bajo distintas condiciones.
2. Determinar la capacidad antifúngica de los aislamientos de levaduras identificadas a partir del estudio de diferentes mecanismos de inhibición para su selección.
3. Determinar el efecto de las levaduras sobre la producción de micotoxinas *in vitro*.
4. Determinar el efecto de los aislamientos de secuestrar micotoxinas *in vitro*.
5. Detectar la producción de actividades enzimáticas de los aislamientos relacionadas con rasgos de virulencia y deterioro del maíz.
6. Evaluar rasgos fenotípicos relacionados con la virulencia de los aislamientos.
7. Estudiar el potencial antifúngico de los aislamientos en maíz almacenado.
8. Estudiar el efecto de los aislamientos sobre la producción de micotoxinas en maíz almacenado.



III. MATERIALES Y MÉTODOS

III.1. Material biológico

Los gránulos de kefir de agua (CMUNLP 1, CMUNLP 2, CMUNLP 4, CMUNLP 5 y CMUNLP 6) y los gránulos de kefir de leche (CIDCA AGK1, CMUNLP 8 y CMUNLP 9) fueron obtenidos de hogares de la ciudad de La Plata, con la excepción de CMUNLP1 cuya procedencia fue de la India y AGK1 que pertenece a la colección del Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA, UNLP, Argentina). Los gránulos fueron cultivados en botellas de 250 ml con leche o permeado de suero para los gránulos de kefir de leche y soluciones de azúcar de mascabo, miel de caña o chancaca para los gránulos de kefir de agua, en una relación gránulo/sustrato del 10 % p/v e incubados por 48 h a 28 °C. Los gránulos se separaron con un colador, se les agregó nuevo sustrato y se volvieron a incubar a por 48 h a 28 °C. Este proceso se repitió 2 veces antes de realizar el aislamiento de las levaduras (Caro Vélez & León Pelaez, 2014; Gamba, Caro, et al., 2016). Para la conservación de los gránulos de kefir de leche se almacenaron a -20°C sumergidos en leche, mientras que para los de kefir de agua se utilizó una solución de azúcar de mascabo al 4,5% p/v a temperatura de refrigeración.

Los hongos filamentosos *Aspergillus flavus* y *A. parasiticus* pertenecen a la colección de la Cátedra de Microbiología de la Universidad Nacional de La Plata y *Fusarium graminearum* pertenece a la colección de la Dra. Teresa Alconada (CINDEFI-UNLP). Todos los hongos se conservaron en crioviales con agar agua (ver Anexo I) a 4 °C.

III.2. Aislamiento de las levaduras del kefir

Las levaduras se aislaron de los gránulos de kefir y de los sobrenadantes fermentados obtenidos en el punto III.1. Para ello 10 g o 10 ml (según corresponda) fueron tomados en esterilidad y agregados a 90 ml de solución fisiológica, para luego ser homogeneizados por 2 min en un BagMixer® 400 W (Interscience, France). De esta primera dilución se realizaron diluciones seriadas, 100 µl de las cuales se sembraron por superficie en placas de Petri con agar YGC (ver Anexo I). Las placas se incubaron a 28 °C por 5 d y las colonias obtenidas fueron diferenciadas de acuerdo a sus características macro y microscópicas, detalladas en la tabla 4. Las colonias seleccionadas se estriaron en agar YPD tres veces consecutivas antes de proceder a realizar su identificación. Los aislamientos se mantuvieron en tubos inclinados con agar

YPD a 4 °C hasta su uso y en glicerol al 15 % v/v a -80 °C para su almacenamiento prolongado.

Tabla 4: Características morfológicas observadas en los aislamientos

Característica	Descripción
Color de la colonia	Blanco/Rosado
Consistencia	Rígida/Creмосa
Borde	Regular/Irregular
Superficie	Lisa/Rugosa/Aterciopelada; Brillante/Opaca
Geometría de la colonia	Globosas/Ovoide/Elipsoidal; Cóncava/ Convexa
Morfología celular	Unicelular, pseudohifa, hifa con ramificaciones, artroconidios rectangulares

III.3. Identificación de las levaduras

III.3.1. Extracción de ADN genómico

La extracción del ADN genómico se realizó a partir de colonias individuales de cada levadura obtenidas de cultivos en agar YPD. Cada colonia se resuspendió en 100 µl de una solución de LiC₂H₃O₂ 200 mM y 1 % p/v de SDS y se incubó por 15 min a 70 °C. A continuación, se agregaron 300 µl de etanol 96°, se homogeneizó utilizando un agitador y se centrifugó a 15000 g por 3 min. Se descartó el sobrenadante y al pellet se lo lavó con etanol 70 % v/v. Se dejó secar el excedente de etanol a temperatura ambiente, se disolvió el pellet en 150 µl de agua miliQ y se realizó un spin down por 15 s a 15000 g. El sobrenadante se guardó a -20 °C hasta su utilización (Lööke et al., 2011).

Para la extracción del ADN mitocondrial (ADNmt) para RFLP, se centrifugaron cultivos de 24 h crecidos en caldo YPD y cada precipitado se lavó dos veces antes de resuspenderlo en 0,5 ml de solución 1 M sorbitol, 0,1 M EDTA y pH 7,5. Luego se agregaron 20 µl de una solución de zimoliasa 2,5 mg/ml (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific Inc®), y se incubó a 37 °C durante 30-60 min para obtener los esferoblastos. A continuación, se centrifugó por 1 min a 12000 g y resuspendieron los pellets en 0,5 ml de una solución con 50 mM Tris-HCl, 20 mM EDTA, pH 7,4. Luego se adicionaron 50 µl

de solución 10 % v/v de SDS. Se incubaron a 65 °C por 5 min, y se agregaron 200 µl de KCH₃CO₂ 5 M a 0 °C e incubó por 30 min en hielo. Posteriormente, se centrifugó a 15000 g durante 5 min y los sobrenadantes obtenidos se transfirieron a tubos limpios conteniendo 1 volumen de isopropanol a 0 °C. Se incubaron en hielo por 20 min y se centrifugaron a 15000 g por 10 min para la precipitación del ADN. El precipitado fue lavado con etanol absoluto, luego con etanol 70 % v/v y se secó al vacío (SpeedVac Vacuum Cocentrator, Thermo Fisher Scientific Inc[®]) para eliminar cualquier residuo del etanol. Por último, se resuspendió el ADN en agua miliQ estéril y se cuantificó en espectrofotómetro NanoDrop (Thermo Fisher Scientific Inc[®]) (Querol et al., 1992).

III.3.2. Amplificación de las regiones ITS1/ITS2 y D1/D2

Se amplificaron las regiones ITS1/ITS2 usando los primers ITS1 e ITS4 (White et al., 1990) y D1/D2 utilizando los primers NL1 y NL4 (Kurtzman & Robnett, 1997) (ver secuencias en el Anexo II). La mezcla de reacción fue de 50 µl, con 2 µl ADN genómico; 5 µl Buffer 10X; 4 µl dNTPs 2,5 µM; 0,5 µl ITS1; 0,5 µl ITS4; 0,25 µl Taq ADN polimerasa; 2,5 µl MgCl₂ 50 mM y 35,25 µl agua miliQ. El programa utilizado consistió en una etapa inicial de 5 min a 95 °C, seguida por 40 ciclos de 30 s a 95 °C, 30 s a 52 °C y 60 s a 72 °C, para finalizar con 10 min a 72 °C.

La región amplificada se sembró junto al marcador de peso molecular de 100 pb (Invitrogen Company, Thermo Fisher Scientific Inc[®]) en un gel de agarosa al 1,5 % p/v teñido con SYBR Safe y revelado bajo luz UV.

III.3.3. Análisis de restricción de la región ITS1/ITS2

El análisis de restricción (RFLP, restriction fragment length polymorphism) se realizó de acuerdo a Esteve-Zarzoso et al. (1999). Se amplificó la región ITS1/ITS2 como se describió en III.3.2 y luego se realizó la digestión con las enzimas de restricción Hinf I, Hae I y Hha I (Fast digest, Roche Molecular Biochemicals) con una incubación de 2 h a 37 °C. Luego las muestras se sembraron en un gel de agarosa al 3 % p/v teñido con SYBR Safe y revelado bajo luz UV, utilizando un marcador de peso molecular de 100 pb (Invitrogen Company, Thermo Fisher Scientific Inc[®]).

III.3.4. Secuenciación de la región D1/D2

Los amplicones se purificaron con MinElute® (Qiagen Group, Alemania) de acuerdo a las indicaciones del proveedor y se enviaron para su secuenciación desde ambos extremos al servicio de Genómica de la Universidad de Valencia (España) o a Macrogen (Seúl, Corea del Sur). De los cromatogramas se obtuvieron las secuencias consenso utilizando el programa Mega 11 (Tamura et al. 2021) y la identificación de los aislamientos se logró comparándolas con la base de datos Genbank usando BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

III.3.5. Árboles filogenéticos

Los árboles filogenéticos se realizaron con el programa MEGA 11 (Tamura et al., 2021) de las secuencias de la región 26S rADN D1/D2 de cada grupo de aislamientos. El método utilizado fue de Bootstrap por Neighbour-Joining con un valor de réplicas de 1000. El porcentaje de los árboles replicados en el que los árboles se agruparon (obtenidos por la técnica), se presentan como los valores bootstrap en cada caso. Las secuencias de las cepas tipo fueron obtenidas de la base de datos de Genbank.

III.3.6. Amplificación aleatoria de ADN polimórfico

La identificación de la especie de *Geotrichum* se realizó incorporando una amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPD, randomly amplified polymorphic DNA) empleando el primer M13 (ver Anexo II) (Gente et al., 2006). La mezcla de reacción fue de 50 µl, con 1 µl ADN genómico; 5 µl Buffer 10X; 4 µl dNTPs 2,5 µM; 2,5 µl M13; 0,25 µl Taq ADN polimerasa; 2,5 µl MgCl₂ 50 mM y 35,25 µl agua miliQ. El programa corrido consistió en una etapa inicial de 4 min a 94 °C, seguida por 35 ciclos de 30 s a 94 °C, 1 min a 50 °C y 30 s a 72 °C, para finalizar con 6 min a 72 °C. Los perfiles se evidenciaron con un gel de agarosa al 1,2 % p/v teñido con SYBR Safe y revelado bajo luz UV, utilizando un marcador de peso molecular de 100 pb (Invitrogen Company, Thermo Fisher Scientific Inc®).

III.3.7. Anál isis de restricción de genes específicos

Los aislamientos de *Saccharomyces* fueron identificados mediante una amplificación adicional de genes específicos y una posterior digestión con enzimas de restricción (Pérez-Través et al., 2014). Se amplificaron las regiones génicas *MAG2* y *GSY1* con los primers detallados en el Anexo II y el programa de PCR detallado en el punto III.3.2. La digestión de cada fragmento amplificado se realizó con 15 µl de cada uno y la endonucleasa de restricción *MspI* (Roche Molecular Biochemicals, Alemania) de acuerdo a las instrucciones del proveedor. Los fragmentos de restricción se separaron en geles de agarosa al 3 % p/v en buffer TAE 1X, teñidos con SYBR Safe y revelados bajo luz UV. Se empleó una mezcla de marcadores de peso molecular de 50 pb + 100 pb (Roche Molecular Biochemicals, Alemania).

III.3.8. Anál isis de restricción del ADN mitocondrial

El RFLP del ADNmt fue obtenido por la digestión de las muestras del punto III.3.1 con la endonucleasa *HinfI* FD (Fastdigest, Roche Molecular Biochemicals), incubando por 2 h a 37 °C. Los fragmentos de restricción se separaron en un gel de agarosa al 0,8 % p/v en buffer TAE 1X teñido con SYBR Safe y revelado bajo luz UV. Como marcador de peso molecular se empleó el ADN del fago λ digerido con endonucleasa *PstI* (fago λ/*PstI*, rango 247-11501 pb) (Roche Molecular Biochemicals). Para este análisis se requiere un ADNmt de una concentración mínima de 3000 ng/µL de ADN total purificado, la cual fue medida en un espectrofotómetro NanoDrop (Thermo Fisher Scientific Inc®).

III.3.9. Asimilación de fuentes de carbono

Los estudios de asimilación de fuentes de carbono específicas se emplearon en la discriminación de especie, en los grupos obtenidos de acuerdo a la identificación molecular. Los ensayos se realizaron a través de auxonogramas de acuerdo a (Kurtzman et al., 2011). Se utilizaron cultivos frescos de cada aislamiento, los cuales se centrifugaron a 3000 rpm por 10 min. Los pellets obtenidos se resuspendieron en solución fisiológica y se incubaron por 24 h a 28 °C, para agotar las reservas de nutrientes para evitar falsos positivos. Un mililitro de cada suspensión se inoculó por

profundidad en medio de cultivo YNB y una vez solidificado el medio, se colocó en la periferia de las placas una pequeña cantidad de la fuente de carbono correspondiente para la especie (Kurtzman et al., 2011). Las placas se incubaron por 7 días, observándolas periódicamente para detectar el crecimiento de la levadura alrededor de la fuente de carbono, en el caso de asimilaciones positivas.

III.4. Caracterización de la capacidad antifúngica

III.4.1. Inóculos microbianos

Los inóculos de los hongos *A. flavus* y *A. parasiticus* consistieron en suspensión de conidios obtenidos a partir de cultivos en placas de Petri con medio agar papa (PDA) incubados a 28 °C por 7 d. Una vez esporulados, se agregaron 10 ml de una solución dispersante de esporas (ver Anexo I) y los conidios se removieron con un ansa estéril, ajustando el recuento final a 10⁴ conidios/ml utilizando una cámara de Neubauer (León Peláez et al., 2012). El inóculo de *F. graminearum* consistió en un disco de 6 mm de diámetro extraído de la periferia de un cultivo de 7 d del hongo en medio de cultivo PDA, dada la dificultad para esporular.

Los inóculos de levaduras se obtuvieron a partir de repiques desde el cepario de -80 °C a caldo YPD e incubando por 48 h a 28 °C. Se realizaron dos repiques adicionales sucesivos y el tercer caldo fue utilizado como el inóculo de las levaduras, al que llamaremos cultivo fresco. La concentración utilizada varió de acuerdo al ensayo y fue medida por cámara de Neubauer, a su vez la viabilidad de las células fue corroborada por recuento en placa.

III.4.2. Preparación de los sobrenadantes libres de células

Las levaduras identificadas fueron cultivadas en frascos de 250 ml conteniendo 50 ml de caldo MEA e incubando a 28 °C por 48 h a 150 rpm. A continuación, se centrifugaron los medios fermentados a 3000 rpm por 15 min y los sobrenadantes se esterilizaron por filtración utilizando membranas de acetato de 0,22 µm de poro (Sigma-Aldrich®). La esterilidad de los sobrenadantes libres de células (SLC) así obtenidos, se confirmó inoculándolos en placas de Petri con medio de cultivo MEA e incubando por 5 d a 28 °C. Los SLC se almacenaron en tubos Eppendorf de 2 ml a -20 °C hasta su uso.

III.4.3. Reducción de la germinación de conidios

En una placa de 96 fosas, se colocaron 190 μl de los SLC (obtenidos en el punto III.4.2) y se inocularon con 10 μl de una suspensión de 10^4 conidios/ml de *A. flavus* o *A. parasiticus*. El control positivo consistió en el medio de cultivo estéril inoculado con 10 μl de la suspensión fúngica y el control negativo consistió únicamente de SLC. La placa se incubó a 28 °C por 48 h y luego se midió la DO a 580 nm (Beckman DU 650, 580 nm). La reducción de la germinación de conidios se calculó a partir de la siguiente ecuación:

$$\% RG = \frac{(DO_C - DO_T)}{DO_C} \cdot 100$$

Donde, DO_C es la DO del control positivo; DO_T es la DO del tratamiento (Lavermicocca et al., 2003).

La capacidad de inhibición se consideró alta si el valor de % RG era mayor a 70 %; media entre 40-70 %, baja entre 20-40 % y nula por debajo de 20 % (Gerez et al., 2009). Se realizaron dos ensayos independientes por quintuplicado para cada combinación de levadura y hongo filamentoso.

III.4.4. Cultivos duales

El efecto inhibitorio de las levaduras sobre los hongos filamentosos se realizó en cultivos duales, los cuales consistieron en el crecimiento simultáneo en placas de Petri de 90 mm de diámetro con medio de cultivo PDA. Se sembraron 10 μl de una suspensión de conidios como inóculo de *A. flavus* y *A. parasiticus* o un disco para *F. graminearum* a 2 cm del borde de la placa. A 5 cm de los inóculos se sembró por ansada el inóculo de la levadura (como marca la figura 8). Las placas se incubaron a 28 °C por 14 d, realizando observaciones periódicas para evaluar visualmente el comportamiento de ambos microorganismos (Pantelides et al., 2015). Se realizaron dos ensayos independientes con triplicados para cada tratamiento.

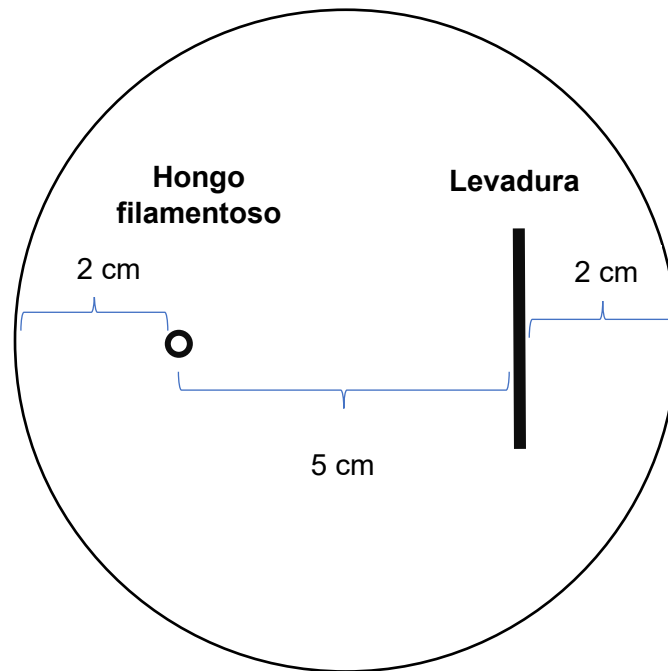


Figura 8: Esquema del ensayo dual en placa de Petri y disposición de los inóculos

III.4.5. Compuestos orgánicos volátiles

La producción de VOC se analizó a través del método de la doble placa, en el cual dos placas de Petri de 5 cm de diámetro con medio PDA se inocularon, enfrentaron y sellaron con tres vueltas de Parafilm® (Marienfeld Superior, Alemania), de manera tal de generar una cámara entre ambas placas donde puedan ser liberados los compuestos volátiles. La placa superior se inoculó por superficie con una suspensión de un cultivo fresco de la levadura y la inferior con 10 μl de una suspensión de 10^4 conidios/ml para *A. flavus* y *A. parasiticus* o un disco para *F. graminearum* (punto III.4.1). Las placas se incubaron a 28 °C durante 14 d y se midió diariamente el diámetro del hongo filamentoso con dos medidas perpendiculares entre sí para cada colonia (Vero et al., 2013). Se realizaron dos ensayos independientes con triplicados para cada combinación de hongo y levadura. Se calculó la tasa de crecimiento y la fase de latencia del hongo por regresión lineal de las mediciones versus el tiempo para la fase exponencial.

III.4.6. Efecto sobre la producción de deoxinivalenol

El efecto de las levaduras sobre la producción de DON por parte de *F. graminearum* fue analizado en placas de Petri con medio PDA por triplicado para cada aislamiento. Las levaduras se sembraron por superficie y *F. graminearum* en el centro de la placa. Las placas se incubaron a 28 °C por 14 d, midiéndose el diámetro periódicamente (para la determinación del crecimiento como fue detallado en III.4.5) y al finalizar el tiempo de incubación se guardaron a -20 °C hasta su análisis.

III.4.6.1. Extracción de deoxinivalenol

Para la extracción de DON, se extrajo de las placas de Petri el medio de cultivo entero y se lo colocó en un Erlenmeyer al que se le agregaron 125 ml de una mezcla acetonitrilo-acetato de etilo-agua (50:41:9, v/v) y se agitó por 30 min a 300 rpm. Luego se filtró por papel Whatman N°1 y se tomaron 20 ml del filtrado al que se le agregaron 1,4 g de sulfato de amonio para provocar la precipitación por sales o salting-out. La limpieza o clean-up de la muestra se realizó en una columna cromatográfica de 10 mm de diámetro interno y 50 mm de alto con 0,7 g de carbón activado (charcoal), 0,5 g de alúmina neutra y 0,3 g de celite. La columna se rellenó con un disco de papel Whatman N°1, sobre el cual se colocaron 0,1 g de celite y 1,5 g de la mezcla golpeándola suavemente para compactarla (Rizzo et al., 1997; Trucksess et al., 1984). La columna se fijó a un kitasato de 125 ml conectado a una trampa de agua a través de la cual se reguló la velocidad de flujo del solvente a 2 a 3 ml por minuto. Se agregaron a la columna 20 ml del extracto, seguido por 2 lavados con 10 ml del solvente de extracción. El eluato se evaporó a sequedad en baño María. Se añadieron 3 ml de acetato de etilo al residuo, se calentó a ebullición en baño María y se filtró con papel Whatman N°1, repitiendo este procedimiento dos veces. El residuo resultante se recolectó en un matraz y se llevó a sequedad en rotavapor. Luego se transfirió a un tubo Eppendorf y se resuspendió en 500 µl de acetato de etilo-metanol (95:5). La muestra se dividió en viales con 100 µl del extracto para mediciones independientes. Los viales fueron secados en una corriente suave de Nitrógeno y se almacenaron a -20 °C hasta su análisis por cromatografía gaseosa.

III.4.6.2. Cuantificación de deoxinivalenol

A las muestras obtenidas en el paso anterior se les agregó 100 µl de anhídrido trifluoroacético (TFAA) para su derivatización, y 30 mg de bicarbonato de sodio (NaHCO₃) para destruir restos del derivatizante que no haya reaccionado. Se agitó con vortex por 10 s, se colocó en baño termostático a 80 °C por 30 min, y se dejó a temperatura ambiente. El residuo obtenido fue disuelto en 100 µl de una solución conformada por 2-amino-5-clorobenzofenona (ACBP) en tolueno con una concentración de 10 µg/ml, el cual se utilizó como estándar interno. Luego se agitó por 10 s y se agregaron 1000 µl de agua para remover el exceso de reactivos. Se dejó reposar hasta que se separaron las dos fases, acuosa y orgánica. Se transfirió la capa toluénica a un vial con sulfato de sodio anhidro para eliminar el agua. Se agitó por 10 s y se dejó reposar hasta que se separaron las dos fases. Se transfirió la fase toluénica a otro vial para su análisis (Schollenberger et al., 1998; Schwadorf & Müller, 1991).

La detección de DON se realizó con un cromatógrafo gas-líquido Shimadzu GC17 con un detector de captura de electrones (ECD), con una columna capilar RX-5MS (30 m; 0,25 mm x 0,25 µm). La temperatura del inyector fue de 250 °C y la del detector de 300 °C. Se utilizó un programa de temperatura que consistió en 2 min a 90 °C, y luego se incrementó de 90 a 275 °C (2 min) a 23 °C por minuto y desde 275 a 290 °C (5 min) a 30 °C por minuto. Se empleó nitrógeno como gas auxiliar y carrier. El volumen de inyección fue de 2 µl y el tiempo de corrida por muestra de 27 min (Croteau et al., 1994).

Para el análisis de los datos se utilizó una curva de calibración entre el tiempo de retención de la toxina estándar (Sigma-Aldrich, EEUU) y el del estándar interno. El rango de concentraciones medido fue entre 50 y 400 pg. La curva de calibración se construyó graficando el área relativa (AR) (relación del área de la toxina y del estándar interno, ACBP) contra la concentración en cada punto y se determinó el rango de linealidad mediante una curva de regresión. Los resultados obtenidos se multiplicaron por los factores correspondientes de extracción y dilución de la muestra y se expresaron en µg/g.

III.4.7. Captura de aflatoxinas

Para analizar la capacidad de captura de AFB1 de las levaduras, se utilizó una solución estándar de AFB1 (Sigma Aldrich, EEUU) disuelta en metanol y almacenada

en oscuridad a -20 °C hasta su utilización. La solución de trabajo consistió en diluir la solución stock en buffer PBS hasta la concentración deseada.

Los cultivos frescos de las levaduras se centrifugaron y lavaron dos veces con PBS estéril. Se realizó el recuento en cámara de Neubauer y los pellets se resuspendieron en la solución de trabajo de AFB1, para obtener las concentraciones finales de 10⁶ UFC/ml (para *G. candidum* la concentración fue de 10⁴ UFC/ml) y 200 ppb respectivamente. Los tubos se incubaron en oscuridad, con agitación (300 rpm) por 30 min. Luego, se centrifugaron y los sobrenadantes que contenían la AFB1 no adsorbida fueron recolectados y almacenados a -20 °C para su posterior cuantificación (Bueno et al., 2007).

III.4.7.1. Cuantificación de aflatoxinas por HPLC

La cantidad de AFB1 no adsorbida en los sobrenadantes se cuantificó mediante cromatografía líquida de fase reversa (Waters Alliance 2695, EEUU), con una bromación electroquímica post columna y un detector de fluorescencia (Waters 2996, EEUU). Se utilizó una columna Sunfire C18 (3,5 µm; 4,6 x 150 mm), un flujo de 1 ml/min con una fase móvil detallada en la tabla 5, la temperatura de la columna fue de 35 °C, el volumen de inyección de 10 µl y la temperatura de inyección de 15 °C. La bromación electroquímica se realizó mediante una celda Kobra-Cell (R-Biopharm, Alemania) a 100 µA. La detección se llevó a cabo con una longitud de onda de excitación de 360 nm y de emisión de 440 nm. El tiempo de corrida de las muestras fue de 30 min.

Tabla 5: Gradiente de la fase móvil en HPLC

Tiempo (min)	A	B	C
0	72	18	10
20	72	18	10
25	10	80	10
26	10	80	10
27	72	18	10
28	72	18	10

Solventes: A: Agua miliQ + 0,1983 g/l KBr + 160 µl/l HNO₃; B: Acetonitrilo;

C: Metanol.

Para la determinación de la concentración de AFB1 en las muestras se realizó una curva de calibración en el rango de 10 a 100 ppb.

III.4.8. Estimación de los mananos de pared

III.4.8.1. Hidrólisis ácida

La extracción de los mananos de la pared de las levaduras se realizó de acuerdo a Quirós et al. (2011). Alícuotas de 2 ml de un cultivo fresco de cada levadura, se colocaron en tubos de 2 ml con tapa a rosca previamente pesados (para posteriormente determinar el peso seco de las levaduras), se centrifugaron descartando el sobrenadante y se agregaron 2 ml adicionales de cada cultivo en los mismos tubos, y se centrifugó nuevamente. Los pellets resultantes se lavaron dos veces con agua destilada estéril y se secaron al vacío (Savant® SpeedVac concentrator, Thermo Scientific) a 65 °C hasta peso constante. Posteriormente se realizó la hidrólisis ácida de los pellets, resuspendiéndolos en 100 µl de H₂SO₄ 1 M e incubando a 100 °C por 5,5 h. Luego se homogeneizaron y centrifugaron para separar la levadura y obtener el sobrenadante, el cual fue diluido con 900 µl de agua miliQ.

III.4.8.2. Cuantificación de la glucosa y manosa por HPLC

La cuantificación de glucosa y manosa fue realizada de muestras obtenidas en III.4.8.1, a las que se le eliminaron los restos de H₂SO₄ por extracción en fase sólida (SPE), eluyendo las muestras por columnas Strata® NH₂ (500 mg/3ml tubo, Phenomenex, EEUU) previamente acondicionadas por lavados con 15 ml de agua miliQ. Los eluatos se filtraron con membranas de nylon con 0,22 µm de tamaño de poro y se guardaron a -20 °C hasta su análisis por HPLC.



Figura 9: Columnas Strata® NH₂ (Phenomenex, EEUU) asociadas a un equipo de vacío para la remoción de H₂SO₄ de los hidrolizados de levaduras.

En el HPLC se empleó una columna de plomo PL Hi-Plex Pb 8 µm (Varian, Inc., Reino Unido) y un detector de índice de refracción. La fase móvil consistió en agua miliQ con un flujo de 0,6 ml/min a 70 °C y el tiempo de corrida por muestra fue de 20min. Cada muestra se midió por duplicado. La curva estándar se preparó con manano comercial de *S. cerevisiae* (Sigma-Aldrich) tratado como las muestras (punto III.4.8.1) y diluido en agua miliQ dentro del rango de 250 a 25 mg/l. Los resultados determinados a partir de la curva estándar se normalizaron considerando el peso seco de levadura, que se calculó como la diferencia entre el peso del tubo con levadura seca y el peso del tubo vacío.

III.5. Caracterización de rasgos fenotípicos de virulencia

III.5.1. Actividades enzimáticas

Para la detección de las actividades amilasa, proteasa, lipasa y fosfolipasa se llevaron a cabo ensayos en placas de Petri conteniendo medios inductores. Todas las placas se inocularon en el centro con 10 µl de un cultivo fresco de cada levadura y se incubaron por 7 d a 28 °C.

III.5.1.1. Actividad amilasa

Para la detección de la actividad se utilizó el medio de cultivo agar YNB suplementado con 2 g/l de almidón soluble, que luego de la incubación fue inundado con Lugol. En los casos de actividad positiva se observó un halo claro alrededor de la colonia contra un fondo oscuro del medio (Gopinath et al., 2002).

III.5.1.2. Actividad proteasa

Para determinar la presencia de la actividad proteolítica se utilizó un medio de cultivo constituido por leche descremada como único nutriente (5 % p/v leche descremada en polvo y 2 % p/v agar agar) (Pailin et al., 2001). La actividad proteolítica se evidenció como un halo traslúcido alrededor de las colonias.

III.5.1.3. Actividad lipasa y fosfolipasa

La actividad lipasa fue detectada utilizando un medio de cultivo cromogénico que consistió en 1 % p/v aceite de oliva, 10 mM CaCl₂, 0,1 % p/v rojo de fenol y 2 % p/v agar agar a pH 7,3-7,4. Las levaduras con actividad positiva se evidenciaron con un cambio de color de rojo/rosado a amarillo alrededor de la colonia (Singh et al., 2006).

En los casos en los que se obtuvieron resultados positivos, se procedió a la cuantificación de la actividad lipasa a partir de los extractos crudos. Se utilizó un medio de cultivo con 20 ml de un caldo con 10 g/l glucosa, 50 g/l peptona, 1 g/l MgSO₄·7H₂O, 1 g/l NaNO₃, 10 g/l aceite de oliva y 1 g/l Tween 80 (emulsionado por 1 min a máxima velocidad) en Erlenmeyers de 100 ml. Se inocularon con un cultivo fresco de la levadura e incubaron a 28 °C por 48 h a 150 rpm. Luego de la incubación se centrifugaron las muestras a 5000 rpm por 10 min y los sobrenadantes se separaron para la cuantificación enzimática por titulación. La mezcla de reacción de 10 ml, consistió en 1 ml del sobrenadante más 9 ml de una emulsión con 25 % de aceite de oliva como sustrato, obtenida con goma arábica como surfactante y agitando a velocidad máxima por 1 min. La incubación de la mezcla de reacción fue de 1 h a 37 °C. La reacción se detuvo por el agregado de acetona/etanol 1:1 (v/v) y se tituló la cantidad de ácidos libres liberados con NaOH 0,05 M utilizando fenolftaleína como indicador. La unidad enzimática se

definió como la cantidad de enzima que genera 1 μmol de ácido graso en las condiciones de ensayo empleadas (Macedo et al., 1997).

La actividad fosfolipasa se determinó utilizando Agar Sabouraud glucosado (ver Anexo I) suplementado con 10 % v/v de yema de huevo, 11,7 g/l NaCl y 0,111 g/l CaCl_2 . La actividad se detectó por la presencia de un halo de precipitación blanco alrededor de la colonia (Price et al., 1982).

III.5.2. Resistencia al pasaje gastrointestinal

En un primer ensayo se determinó la viabilidad de las levaduras en las condiciones de pH del pasaje gastrointestinal. Cultivos frescos de las levaduras se centrifugaron descartando los sobrenadantes, los pellets se lavaron dos veces con buffer PBS, se realizó el recuento en cámara de Neubauer y se resuspendieron en PBS estéril termostatizado a pH 2,5 (ajustado con HCl 1M), para simular la fase gástrica. Las suspensiones se incubaron por 2 h a 37 °C. Luego de la incubación, las suspensiones fueron centrifugadas y lavadas dos veces con PBS antes de resuspender los pellets en PBS termostatizado a pH 8 (ajustado con NaOH 1M), para simular la fase intestinal. Se incubaron por 2 h a 37 °C. Se tomaron muestras para realizar recuentos en placa al inicio y al finalizar las etapas gástrica e intestinal.

A continuación, para profundizar en el estudio de las condiciones gastrointestinales se repitió el ensayo utilizando una solución de sales y pepsina 0,3 % p/v a pH 2,5 para la fase gástrica y una solución de sales con pancreatina 0,1 % p/v y sales biliares 7 % p/v para la fase intestinal (ver Anexo I) (Minekus et al., 2014).

III.5.3. Adhesión a células Caco-2

Se estudió la capacidad de las levaduras de adherirse a células Caco-2, una línea de células de adenocarcinoma colorrectal humano, ampliamente utilizadas como modelo *in vitro* de barrera de epitelio intestinal. Las células Caco-2 (DSMZ, Alemania. Pasajes 27-33) se cultivaron en el medio Dulbecco's Modified Eagle's Minimal Essential Medium (DMEM, Himedia, India) suplementado como está descrito en el Anexo I e incubaron en atmósfera de 5 % de CO_2 a 37 °C, cambiándole el medio cada 2 o 3 d. Las monocapas se prepararon en placas de poliestireno de 24 fosas (Euroclone, Italia) y se utilizaron para el ensayo de adhesión post confluencia. Cada fosa se lavó dos veces con

PBS atemperado a 37 °C y se agregó a cada una 250 µl de nuevo DMEM suplementado y 50 µl del inóculo de levadura a una concentración de $6 \cdot 10^4$ células/ml. Las placas se incubaron 1 h a 37 °C en atmósfera de 5 % de CO₂. Luego se tomó el sobrenadante y la monocapa se lavó tres veces con PBS para remover las levaduras no adheridas. A continuación se adicionó 300 µl de PBS en cada fosa y las células se removieron con un scraper para obtener las levaduras adheridas. Las levaduras adheridas y no adheridas fueron cuantificadas mediante recuento en placa en agar YPD y el porcentaje de adhesión fue calculado en relación al número total de levaduras (Pérez-Torrado et al., 2012). Como controles positivos de adhesión se utilizaron dos aislamientos pertenecientes a la colección de Amparo Querol (IATA-CSIC, Valencia, España), *Candida albicans* SC5314 como control de alta adhesión y *Wickerhamomyces anomalus* 2937 como control de media adhesión. Se realizaron dos ensayos independientes por triplicado para cada levadura.

III.5.4. Crecimiento a altas temperaturas

Para evaluar la capacidad de crecimiento a altas temperaturas se inocularon diluciones seriadas de cada aislamiento en placas con medio de cultivo YPD, se guardaron en bolsas herméticas para evitar deshidratación y se incubaron a 28 °C (temperatura control), 37 °C y 42 °C por 5 d (de Llanos et al., 2006).

III.6. Caracterización de la capacidad antifúngica en maíz molido de las levaduras del kefir

III.6.1. Ensayos en minisilo

Para recrear condiciones extremas de almacenamiento del maíz y su posible contaminación fúngica, se molieron granos sanos y enteros (humedad 13 %) a alta velocidad por 30 s en un molinillo (Durabrand, EEUU), a modo de obtener una mayor superficie expuesta. Luego, se esterilizó con vapor de agua (121 °C, 15 min) y se secó a 37 °C hasta peso constante. Se agregaron de acuerdo a Rankin (2009) 7,9 ml de líquido cada 50 g de harina de maíz para lograr una humedad de 20-25 % (rango crítico).

Dentro del volumen se incluyeron los inóculos de levaduras, hongo y/o solución fisiológica (según corresponda, ver Tabla 6).

Para obtener las condiciones de minisilo, el maíz molido se colocó y compactó en tubos plásticos de 15 ml con la tapa perforada (0,5 mm), colocando una membrana de acetato de 0,22 μm de tamaño de poro para evitar contaminaciones.

Se ensayaron los crecimientos individuales de las levaduras, el hongo *A. flavus* y el enfrentamiento entre ambos en el maíz molido en condiciones de minisilo. El inóculo de *A. flavus* consistió en una suspensión de conidios de a una concentración final de 10^2 conidios/g maíz molido. Para el inóculo de levaduras se ensayaron: a) levaduras lavadas (sin el sobrenadante), b) levadura con el sobrenadante y c) kefir entero (con el sobrenadante). En la tabla 6 se detallan los volúmenes de cada inóculo para cada tratamiento. En el control *A. flavus* fue reemplazado por 1 ml de solución fisiológica. Los minisilos se incubaron a 25 °C por 14 d, tomándose muestras en los días 0, 2, 4, 7, 10 y 14 a partir de las cuales se realizaron recuentos en placa (punto III.6.1.1), medidas de pH y humedad (punto III.6.1.3).

Tabla 6: Inóculos para minisilos

Volúmenes por tratamiento					
Tratamiento	<i>A. flavus</i> $5 \cdot 10^4$ conidios/ml	levadura lavada*	Levadura con sobrenadante o kefir entero	Agua	Total (ml/50g maíz molido)
a)	1ml	1ml	--	5,9ml	7,9ml
b)	1ml	--	6,9ml	--	7,9ml
c)	1ml	--	6,9ml	--	7,9ml

*Las concentraciones van desde 10^1 - 10^8 UFC/ml dependiendo del ensayo y de la levadura.

III.6.1.1. Determinación del crecimiento microbiano por recuento en placa

El recuento en placa de los microorganismos se realizó por la metodología tradicional para los hongos filamentosos y las mezclas de microorganismos (levaduras y hongos), colocando 100 μl de la dilución correspondiente sobre la placa de Petri con

medio YPD y esparciéndolo con perlas de vidrio hasta su total absorción (Messer et al., 2000). Los recuentos se realizaron a las 24/48 h para las levaduras y a los 5 d para *A. flavus*. En el caso de las levaduras individuales, se realizó el recuento a través de la técnica de microgota SP-SDS (del inglés “single plate-serial dilution spotting”) (Thomas et al., 2015). En esta técnica, la placa de Petri de 90 mm de diámetro se dividió en 6 secciones y en cada sección se sembraron 20 µl totales de cada dilución distribuidos en varias gotas. Se dejó secar el inóculo y se incubaron las placas a 28 °C durante 24 h. Para determinar las UFC/ml, se consideraron las secciones que tuvieron entre 6 y 60 colonias de levaduras y se realizó el siguiente cálculo:

$$C = n \times 5 \times 10^{d+1}$$

C: concentración de levaduras en UFC/ml

N: recuento de colonias de la sección

D: dilución sembrada en la sección

III.6.1.2. Determinación de la biomasa fúngica por qPCR

La extracción del ADN de las muestras de maíz molido se realizó utilizando el kit comercial ZR Fungal/Bacterial DNA MiniPrep® (Zymo Research, EEUU) de acuerdo a las indicaciones del proveedor. La cuantificación del ADN de *A. flavus* se realizó mediante qPCR utilizando el equipo Rotor-Gene 6000® (Corbett Life Science, Australia) y los primers omt los cuales amplifican el gen de la O-metiltransferasa involucrado en la biosíntesis de aflatoxina B1 (Shweta et al., 2013). La mezcla de reacción para cada muestra fue de 10 µl, conformada por 5 µl de SensiFAST SYBR® No-ROX kit (Bioline, Alemania); 0,5 µl de omt-F; 0,5 µl omt-R (25 µM) (ver Anexo II), 1 µl del templado de ADN, 3 µl de agua miliQ. El programa consistió en un calentamiento inicial de 5 min a 95 °C seguido por 35 ciclos de 30 s a 95 °C para la desnaturalización y 35 s a 59 °C para la hibridación y extensión. Luego, se realizó una curva de melting para asegurarse que lo amplificado correspondía exclusivamente a un solo producto, para ello se aumentó la temperatura de 50 °C a 99 °C. Cada muestra fue analizada por triplicado.

Para la determinación del rango dinámico se realizó una curva estándar con diluciones decimales seriadas del ADN extraído de un cultivo puro de *A. flavus* en medio líquido YES 72h, al que se lo amplificó como se describió previamente. La concentración

del ADN fue cuantificada en un fluorómetro Qubit (Invitrogen, EEUU). Por medio del programa Rotor-Gene 6000 Series Software 1.7 (Corbett Life Science, Australia) se graficaron los Ct en función del logaritmo en base 10 de la concentración del ADN, en la zona lineal de la curva se determinó el límite de detección y el rango dinámico.

Previo al análisis de las muestras, se determinó el efecto matriz para establecer si el maíz (la matriz en este caso) generaba algún efecto sobre la señal detectada. Se realizó una extracción de ADN de maíz sin inocular, se efectuaron diluciones seriadas y a cada una se le agregó la misma cantidad conocida de ADN fúngico. A su vez se realizaron controles, uno positivo conteniendo agua miliQ y la misma cantidad conocida de ADN y otros dos negativos conteniendo matriz y agua miliQ respectivamente, ambos sin ADN adicionado. Se llevó a cabo la qPCR y el análisis de los resultados, como se detalló previamente. Para el análisis de las muestras se tomó la mínima dilución de la matriz que no generaba diferencias significativas con el control positivo.

III.6.1.3. Determinación de la humedad y pH

La determinación de la humedad en el maíz molido se realizó por secado en estufa a 130 °C durante 1 h (AOAC, 1999). Los recipientes vacíos se colocaron durante 1h en el horno a 130 °C (SL30SDB, Sanjor, Argentina) previo a la pesada, se colocaron en un desecador con silicagel hasta su enfriamiento, para luego realizar la pesada en una balanza analítica (XB 220 A, Precisa Instruments Ltd., Suiza). Se pesaron el recipiente vacío y luego del agregado de aproximadamente 2 g de la muestra húmeda. Luego se secaron en estufa durante 1 h a 130 °C y se pesaron nuevamente una vez enfriadas. El porcentaje de humedad (en base húmeda) se calculó como:

$$\%Humedad = \frac{(m_s - m_v)}{(m_h - m_v)} \times 100$$

m_s : masa del recipiente luego del secado en estufa

m_h : masa del recipiente conteniendo el maíz molido húmedo, previo al tratamiento térmico

m_v : masa del recipiente vacío

La medida de pH se realizó de la dilución -1 para cada muestra utilizando un pHmetro (Altronix®).

III.6.1.4. Efecto sobre la producción de micotoxinas

Se estudió el efecto de las levaduras sobre la producción de aflatoxinas por parte de *A. flavus* en maíz molido. Se adicionaron 20 ml del solvente de extracción (acetonitrilo/agua/ácido acético, 79:20:1) por cada 10 g de cada muestra finamente molida (Arcano Fw-100, desintegrador universal de alta velocidad), luego se homogeneizó en Ultra-Turrax® por 3 min y se sonicó por 60 min. A continuación se centrifugó a 3000 rpm y 10 ml del sobrenadante fueron transferidos a un nuevo vial y evaporados hasta sequedad a 45 °C bajo una corriente de nitrógeno. Por último el residuo seco fue resuspendido en metanol/agua (70:30), filtrado con membranas de nylon de 0,22 µm y guardado a -20 °C hasta su análisis (Castañares et al., 2019). La cuantificación de las micotoxinas extraídas se realizó como fue detallado en el punto III.4.7.1, utilizando para la curva de calibración un estándar que contenía las cuatro aflatoxinas B1, B2, G1 y G2 (Trilogy, R-Biopharm).

III.7. Análisis estadístico

Se utilizaron los softwares STATISTICA 7 (StatSoft, EEUU) y Sigmaplot 14.0 (Systat Inc., EEUU) para el análisis estadístico y las gráficas. Se realizaron pruebas paramétricas y no paramétricas según correspondía con un p valor de 0,05. Para corroborar el cumplimiento de los requisitos necesarios para las pruebas paramétricas, se evaluaron los residuales para la aleatoriedad (en caso de que no fueran muestras pareadas), se realizó la prueba de Shapiro-Wilk para la normalidad y la prueba de Levene para la homocedasticidad. En caso de cumplirse los requisitos, se aplicaron test paramétricos como el ANOVA y en el caso contrario se aplicaron test no paramétricos. Al obtenerse diferencias significativas (independientemente de la prueba utilizada), se procedió a realizar un análisis post-hoc. Cada una de las pruebas realizadas se encuentran detalladas en cada capítulo.

A watercolor illustration of a landscape. In the foreground, there is a dark green, circular shape resembling a tree or a large rock with white spots. To its right, a river flows through a green valley. The background features rolling hills in shades of green, yellow, and orange, with a light blue sky. The overall style is soft and artistic.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IV.1. Aislamiento e identificación de las levaduras del kefir

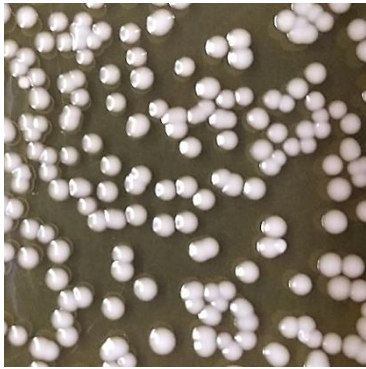
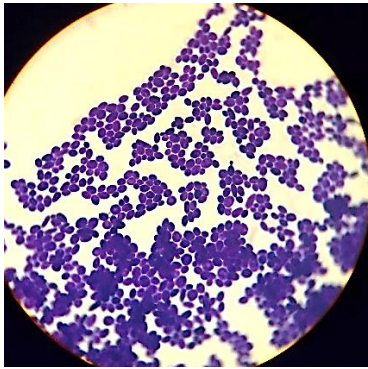

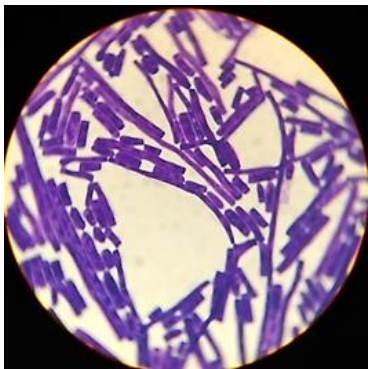

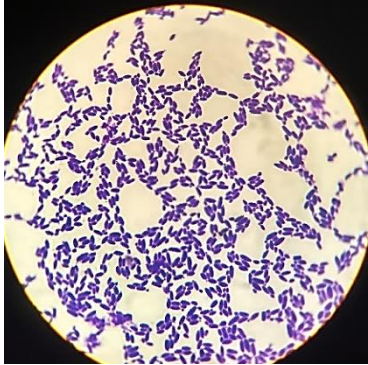
El concepto de especie ha evolucionado a lo largo de los años debido a los avances tecnológicos y a los enfoques empleados, es así que en algunas áreas como la biología evolutiva y sistemática la definición de especie aún se encuentra en discusión (Boekhout et al., 2021; Malik et al., 2014). En hongos la reproducción puede ser sexual o asexual, lo que aumenta la complejidad al momento de la identificación de la especie. El estado en el cual el hongo se reproduce a través de esporas sexuales, como ascosporas, basidiosporas, etc., es llamado teleomorfo; mientras que el estado en donde la reproducción es asexual se denomina anamorfo (Kirk et al., 2008). La nomenclatura de las especies fúngicas está regida por el Código Internacional de Nomenclatura para algas, hongos y plantas (ICN, por sus siglas en inglés) (McNeill et al., 2012; Pitt & Hocking, 2022). En éste se destaca el concepto de “un hongo, un nombre”, por lo cual si el hongo presenta el estado sexual y asexual debe tener un solo nombre (el del teleomorfo) (Boekhout et al., 2022). Sin embargo, en algunos casos es frecuente encontrar ambas denominaciones, como en los géneros de levaduras *Dekkera* vs. *Brettanomyces*, *Geotrichum* vs. *Galactomyces*, y *Kloeckera* vs. *Hanseniaspora* (Boekhout et al., 2022).



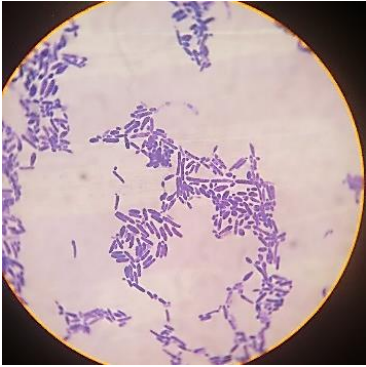

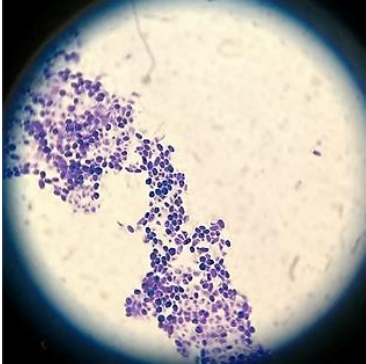

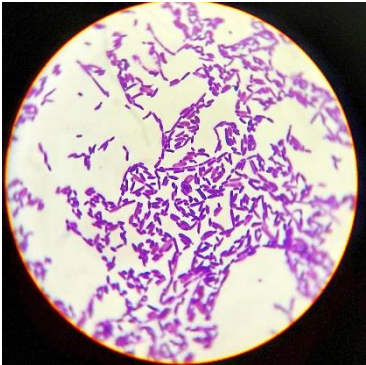
La identificación de levaduras a través de sus propiedades fenotípicas, que incluyen las morfologías de colonia y de célula, el crecimiento bajo diferentes fuentes de carbono y nitrógeno, la fermentación de azúcares, el crecimiento a diferentes temperaturas, entre otras, ha sido el enfoque tradicionalmente utilizado (Kurtzman et al., 2011). Las técnicas moleculares generaron una ampliación de los métodos de identificación y han ganado terreno sobre las técnicas fenotípicas. Sin embargo, gradualmente se está tendiendo a un enfoque polifásico en donde las técnicas fenotípicas se combinan con las moleculares (Boekhout et al., 2021; Malik et al., 2014).

IV.1.1. Aislamiento y caracterización morfológica

El aislamiento de las levaduras del kefir se realizó a partir de gránulos de distintos orígenes fermentados en diferentes sustratos y de sus sobrenadantes. Las colonias obtenidas por agotamiento en estría y sucesivos repiques en placas de Petri, se analizaron por sus características morfológicas macro y microscópicas. Las colonias caracterizadas se reunieron en seis grupos de acuerdo a su morfología (Kurtzman et al., 2011), como se resume en la siguiente tabla:

Tabla 7: Agrupamiento de los aislamientos por características morfológicas

Grupo	Aislamiento	Características de la colonia	
		Macroscópicas	Microscópicas*
I	9B 33 35 38	Blancas, cremosa, lisas, brillantes, regulares, cóncavas	Unicelular globosas, grandes
			
		Blancas, rígidas, aterciopeladas, regulares, cóncavas	Hifas con ramificaciones, artroconidios rectangulares
			
III	14 20 27 22 23 25	Blancas, cremosa, lisas, opacas, irregulares, cóncavas	Unicelular ovoides y pseudohifas
			

IV	5	<p>Blancas/Rosadas**, cremosa, rugosas, opacas, irregulares, cóncavas</p>  	<p>Unicelular elipsoidales y pseudohifas</p> 
	9A		
	11		
	16		
	17		
	21		
24			
29			
32			
V	26	<p>Blancas, cremosas, lisas, regulares, cóncavas</p> 	<p>Unicelular globosas, chicas</p> 
		<p>Blancas, cremosa, rugosas, opacas, irregulares, cóncavas</p> 	<p>Unicelular elipsoidales, pseudohifas</p> 
VI	37		

*1000X

** Con el tiempo de incubación las colonias viran de blancas a rosadas en medio YPD.

IV.1.2. Identificación molecular y bioquímica

En la identificación molecular realizada, a partir de la extracción del ADN total y la amplificación de las regiones ITS1/ITS2 y D1/D2, se determinó el tamaño de los fragmentos amplificados resultantes en un gel de agarosa. De la región ITS1/ITS2 se realizó un RFLP utilizando las enzimas de restricción Hinf I, Hae III y Hha I, que junto a la posterior secuenciación de la región D1/D2 permitió, a través de bases de datos, clasificar a los aislamientos en los mismos seis grupos resultantes de la caracterización morfológica. Las bases de datos utilizadas fueron Yeast-id (<https://www.yeast-id.org/>) y Genbank con su herramienta BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) respectivamente. Para poder asignar una especie con las secuencias de la región D1/D2, las mismas no deben diferir en menos de 1 %, es decir que debe haber una homología de 99 % o mayor (Kurtzman, 2015). De este modo se lograron identificar nueve aislamientos pertenecientes a los grupos IV y VI. En los restantes grupos fueron aplicadas técnicas moleculares adicionales y pruebas bioquímicas para la identificación definitiva.

IV.1.2.1. Aislamientos del Grupo I

En los cuatro aislamientos del grupo I (9B, 33, 35 y 38) se obtuvo por amplificación de la región ITS1/ITS2 un fragmento de 850 pb, el cual por RFLP mostró los patrones de bandas de la figura 10. En la figura 10 se muestra el perfil de bandas de 9B, el cual comparte con el resto de los aislamientos.

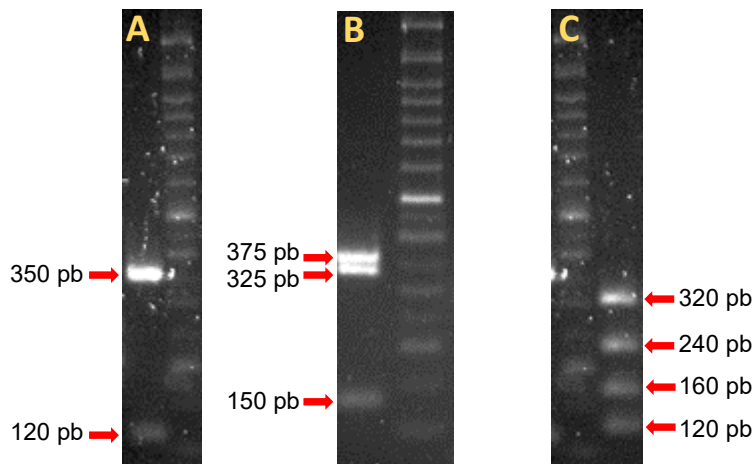


Figura 10: RFLP de la región ITS1/ITS2 del aislamiento 9B. Enzimas de restricción empleadas, A: Hinf I; B: Hha I; C: Hae III. Marcador de peso molecular de 50 + 100 pb.

Al comparar los patrones de bandas con la base de datos Yeast-id, los aislamientos fueron coincidentes en un 100 % de similitud con las especies *S. cerevisiae*; *S. paradoxus*; *S. cariocanus* y *C. maltosa*.

De la secuenciación de la región D1/D2 amplificada, a través de la herramienta BLAST se obtuvo una alta similitud con las especies *S. cerevisiae*, *S. cariocanus* y *S. paradoxus*, descartándose de esta manera la especie *C. maltosa*. Para confirmar la identificación entre las especies de *Saccharomyces*, se realizó un RFLP de genes específicos, amplificando el gen *MAG2* y *GSY1* y utilizando la enzima de restricción MspI. Los fragmentos amplificados fueron de 1000 y 770 pb respectivamente. En la figura 11 se muestra el perfil de digestión del aislamiento 9B como representativo del grupo.

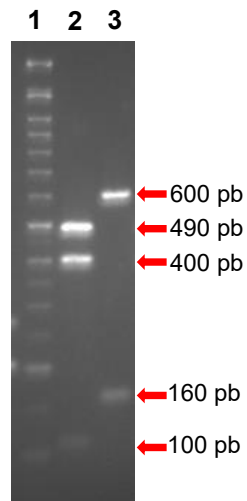


Figura 11: RFLP de los genes *MAG2* y *GSY1* del aislamiento 9B. Enzima de restricción empleada *MspI*. Calle 1: marcador de peso molecular de 50 + 100 pb; calle 2: *MAG2* y calle 3: *GSY1*.

Para los cuatro aislamientos se obtuvieron perfiles de bandas coincidentes, correspondientes con la especie *S. cerevisiae* de acuerdo a Pérez-Través et al. (2014).

Los árboles filogenéticos se realizaron para los aislamientos 33, 35 y 38 con las secuencias de la región D1/D2 y para 9B a modo excepcional se realizó con la región ITS1/ITS2, por lo que en la figura 12 se presentan dos árboles filogenéticos.

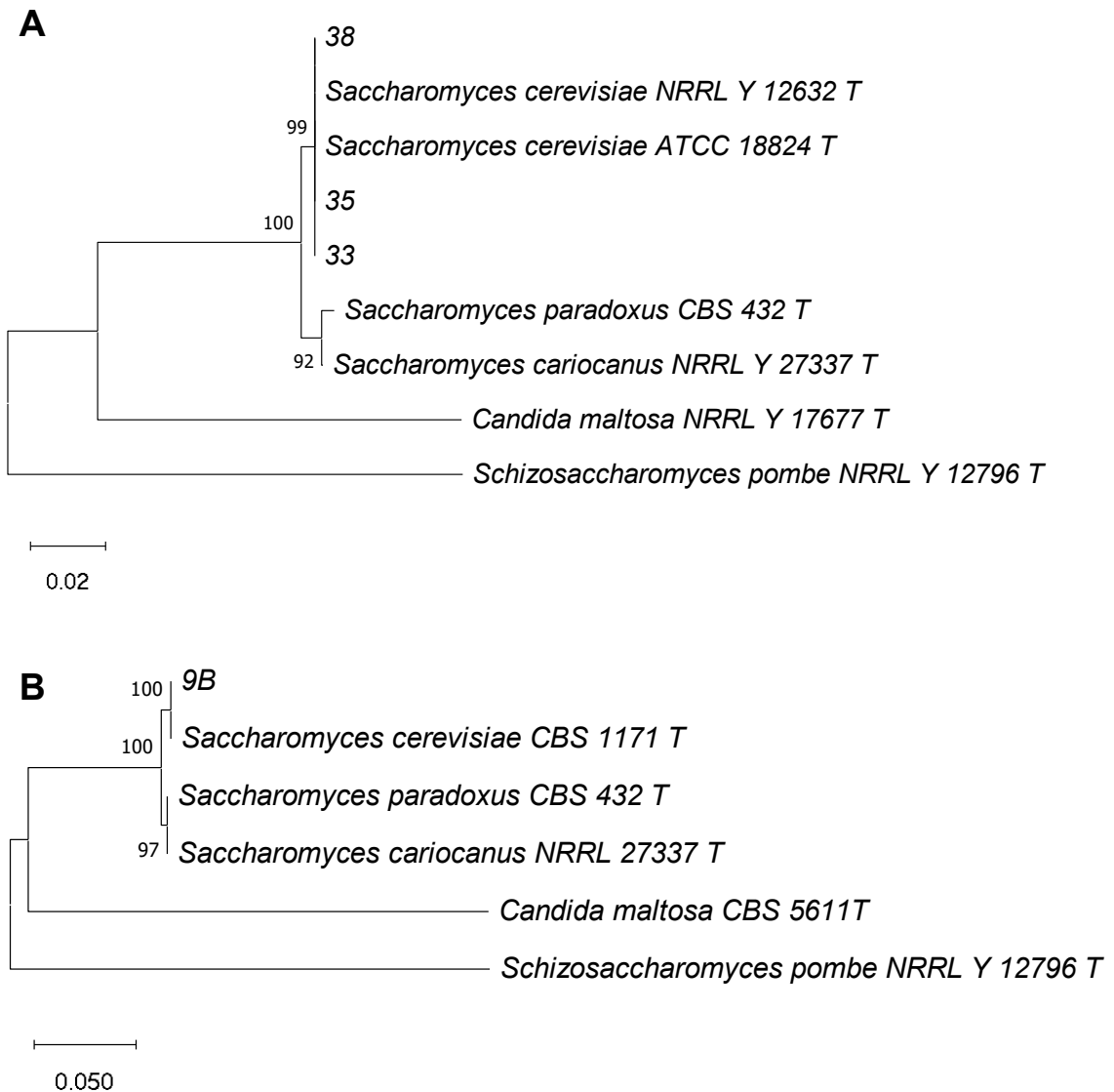


Figura 12: Árboles filogenéticos de los aislamientos del *Grupo I*. A: región D1/D2 de los aislamientos 33, 35 y 38. B: región ITS1/ITS2 del aislamiento 9B. Las cepas tipo se indican con una “T” y los valores de bootstrap se indican en los nodos. *Schizoccharomyces pombe* NRRL Y 12796 se utilizó como outgroup.

Por último, se realizó una caracterización intraespecífica de los aislamientos identificados, a través de RFLP del ADN mitocondrial con la enzima HinfI. Como se observa en la figura 13, tres de los aislamientos presentaron perfiles de bandas a diferencia del aislamiento 38 para el cual no se detectó perfil. Los aislamientos 33, 35 y

9B presentaron un patrón de bandas único, que evidenció ausencia de variabilidad intraespecífica entre ellos, a pesar de provenir de gránulos de diferente origen.

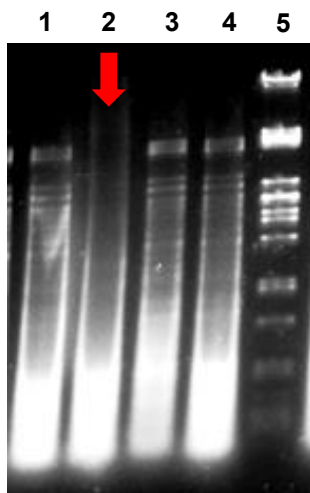


Figura 13: RFLP del ADNmt de los aislamientos del *Grupo I*. Calle 1: 33; calle 2: 38 (flecha roja); calle 3: 35; calle 4: 9B; calle 5: marcador de peso molecular fago λ PstI.

Como la ausencia de bandas podría atribuirse a la ausencia de mitocondrias, se realizó un ensayo sembrando la levadura en medio YNB suplementado con glicerol. El glicerol no puede ser metabolizado por las levaduras mediante la vía fermentativa, pero en condiciones aeróbicas puede ser metabolizado a través de las mitocondrias. A modo de control el aislamiento también fue sembrado en YNB suplementado con glucosa. Además, se sembró el aislamiento 35 el cual fue empleado como control de la presencia de perfil de bandas. Luego de la incubación, se observó que el aislamiento 35 pudo crecer en ambos medios, mientras que el 38 sólo pudo crecer en el medio suplementado con glucosa (Figura 14), lo cual confirmaría la ausencia de mitocondrias.

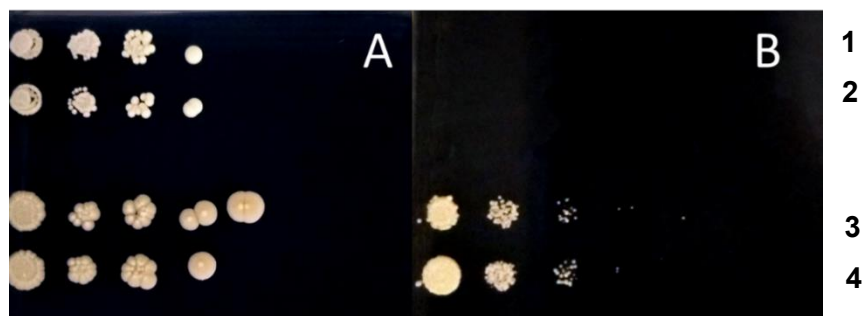


Figura 14: Crecimiento del aislamiento 38 en medios de cultivo diferenciales. A: medio YNB con 20 % p/v glucosa; B: YNB con 3 % v/v glicerol. 1 y 2: aislamiento 38; 3 y 4: aislamiento 35.

IV.1.2.2. Aislamientos del Grupo II

Para los cuatro aislamientos de este grupo, el alineamiento de la secuenciación de la región D1/D2 con la base de datos Genbank utilizando la herramienta BLAST, arrojó una alta similitud con la especie *G. silvicola* seguida por *G. vulgare*.

La especie *G. silvicola* fue introducida por Pimenta et al. (2005), quienes se basaron en la secuencia de la región D1/D2 de la subunidad ribosomal 26S (LSU) y técnicas fenotípicas para la identificación de la especie. A su vez, *G. vulgare* fue descrita como nueva especie por Wuczkowski et al. (2006) quienes analizaron la misma región génica que los autores anteriores, por secuenciación y PCR fingerprinting, además de la realización de las pruebas fenotípicas. Sin embargo, posteriormente ambas especies no fueron introducidas entre las especies reconocidas del género por falta de datos moleculares (Kurtzman et al., 2011), más aún Groenewald et al. (2012) a través de análisis filogenéticos y estudios de mating (apareamiento) determinaron que no había diferencia con las especies ya descritas y que *G. silvicola* era sinónimo de *Gal. candidus* y *G. vulgare* era sinónimo de *Gal. pseudocandidus*. Las especies reconocidas dentro del taxón Geotrichum son 11, de las cuales 5 presentan su teleomorfo en Galactomyces y el resto en Dipodascus (Kurtzman et al., 2011). Estas especies íntimamente relacionadas presentan polimorfismo intraespecífico en el gen ribosomal 26S, por lo que la identificación utilizando esa región del ADN puede no ser adecuada para la especie (Alper et al., 2011). Este polimorfismo, hace necesario utilizar enfoques genotípicos y fenotípicos variados para llegar a una identificación polifásica de la misma (Gente et al., 2006; Sacristán Vega, 2015). Por lo tanto, adicionalmente se

realizó un RFLP con la enzima HinfI de la región ITS1/ITS2, un RAPD con el primer M13 y un auxonograma para determinar la asimilación de fuentes de carbono específicas. Los resultados obtenidos del RFLP (Figura 15) concuerdan con lo observado por Sacristán Vega (2015) quien reportó que la digestión con la enzima de restricción HinfI generaba un perfil de bandas más claro y útil para la especie. Según los resultados, el perfil de bandas contaría con tres fragmentos de 203, 105 y 87 pb.

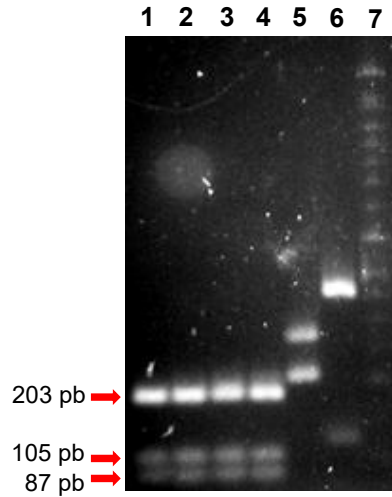


Figura 15: RFLP de la región ITS1/ITS2 de los aislamientos del *Grupo II*. Enzima de restricción empleada HinfI. Calle 1: G; calle 2: 2; calle 3: 30; calle 4: 31; calle 7: marcador de peso molecular de 50 + 100 pb. Calles 5 y 6 no corresponden al grupo.

Asimismo, se realizó un RAPD con el primer M13 para discernir entre las especies íntimamente relacionadas del género *Geotrichum* (teleomorfos *Galactomyces* o *Dipodascus*). El perfil de bandas obtenido fue consistente con lo reportado por Gente et al. (2006) para *G. candidum*, donde la de 860 pb fue la de mayor intensidad (Figura 16).

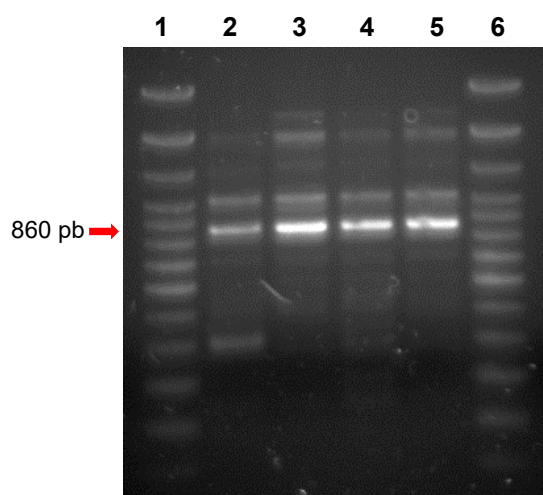


Figura 16: RAPD de los aislamientos del *Grupo II*. Calle 1 y 6: marcador de peso molecular de 100 pb; calle 2: G; calle 3: 2; calle 4: 30; calle 5: 31.

Para completar la identificación polifásica de los aislamientos se realizaron pruebas bioquímicas de acuerdo a las claves de Kurtzman et al. (2011). Se analizó la capacidad de los aislamientos de crecer a 30 y 35 °C y de asimilar D-celobiosa, D-galactosa, D-manitol, L-sorbosa, utilizando glucosa a modo de control.

Tabla 8: Asimilación de fuentes de carbono para los aislamientos del *Grupo II*.

Aislamiento*	D-celobiosa	D-galactosa	D-manitol	L-sorbosa	Crecimiento a 30 °C	Crecimiento a 35 °C
G						
2	-	+	+	+	+	+
30						
31						
Valores asignados a las especies**						
<i>G. candidum</i> (<i>Gal. candidus</i>)	-	+	+	+	+	+
<i>G. carabidarum</i> (<i>D. carabidarus</i>)	-	-	w/-	d/w	+	-
<i>G. citri-aurantii</i> (<i>Gal. citri-aurantii</i>)	-	+	+	+	+	-
<i>G. cucujoidarum</i> (<i>D. cucujoidarus</i>)	+	+	+	-	+	+
<i>G. decipiens</i> (<i>D. armillariae</i>)	+/w	+	+	-	-	-
<i>G. europaeum</i>	-	+	-	+	+	-
<i>G. fermentans</i> (<i>D. fermentans</i>)	+	+	+	+	+	+
<i>G. histeridarum</i> (<i>D. histeridarus</i>)	-	+	+	d/w	+	-
<i>G. klebahnii</i> (<i>D. klebahnii</i>)	-	+	+	+	v	-
<i>G. pseudocandidum</i> (<i>Gal. pseudocandidus</i>)	-	+	-	+	+	v
<i>G. restrictum</i> (<i>D. restrictus</i>)	-	+	+	+	-	-
<i>Geotrichum sp.</i> (<i>Gal. geotrichum</i>)	-	+	+	+	+	-

- : negativo; + : positivo; w: débil; d: demorado; v: variable. Las celdas en gris señalan las no coincidencias con los aislamientos del *Grupo II*. *El nombre del anamorfo está en negrita y entre paréntesis el del teleomorfo. G: *Geotrichum*; Gal: *Galactomyces*; D: *Dipodascus*. ** tabla adaptada a partir de Kurtzman et al. (2011).

Como se observa en la tabla 8, los aislamientos bajo análisis fueron capaces de asimilar D-galactosa, D-manitol, L-sorbose y de crecer a 30 y 35 °C, pero no asimilaron D-celobiosa. Este patrón de asimilación de azúcares coincide con el correspondiente a *G. candidum* (*Gal. candidus*).

De acuerdo a los datos obtenidos para este grupo, los aislamientos corresponden a la especie *G. candidum* (teleomorfo *Gal. candidus*). El árbol filogenético muestra la agrupación con la misma especie (Figura 17).

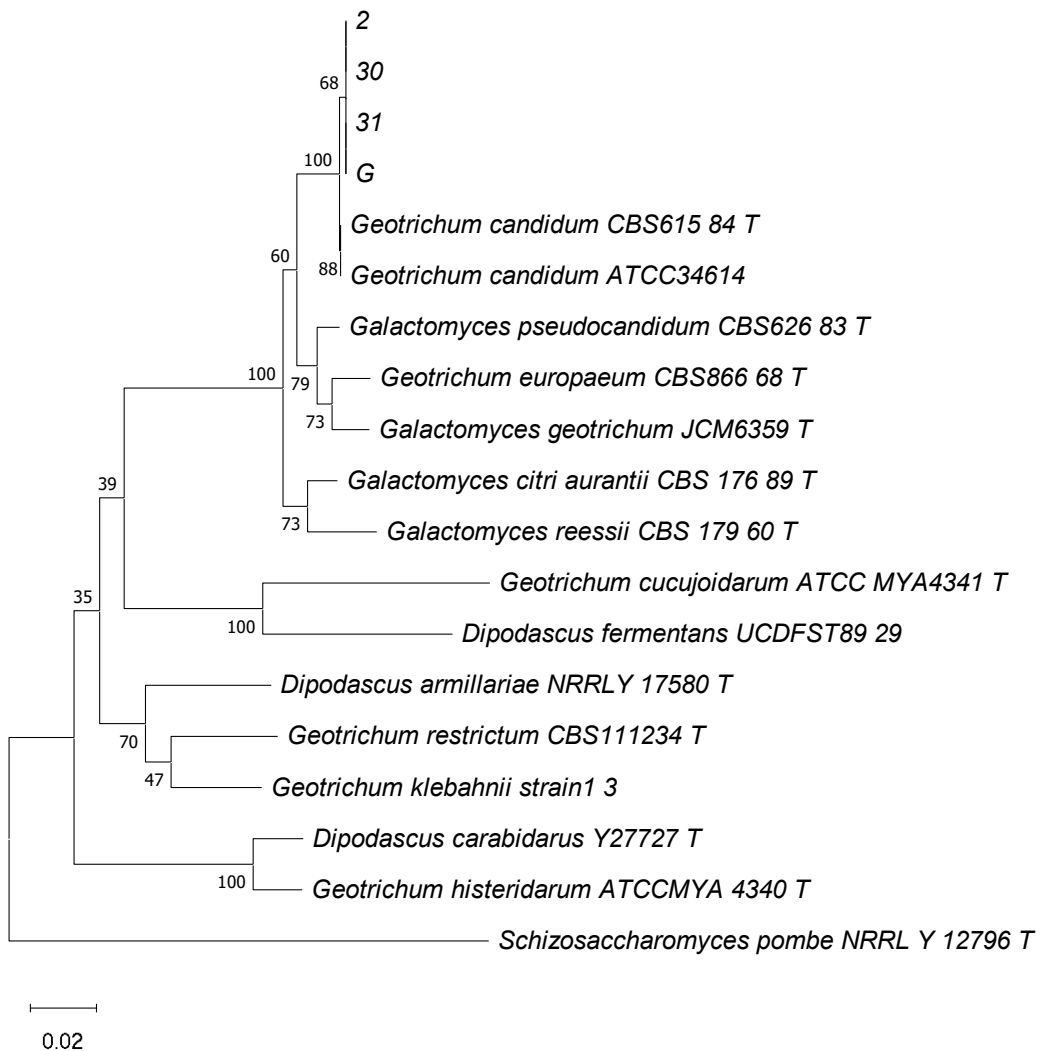


Figura 17: Árbol filogenético de la región D1/D2 de los aislamientos del Grupo II. Las cepas tipo se indican con una "T" y los valores de bootstrap se indican en los nodos. *Schizosaccharomyces pombe* NRRL Y 12796 se utilizó como outgroup.

IV.1.2.3. Aislamientos del Grupo III

Para los seis aislamientos de este grupo por RFLP de la región ITS1/ITS2 se obtuvo el perfil de bandas que se observa en la figura 18. El perfil de bandas de la figura 18 corresponde al aislamiento 22 y es representativo del grupo.

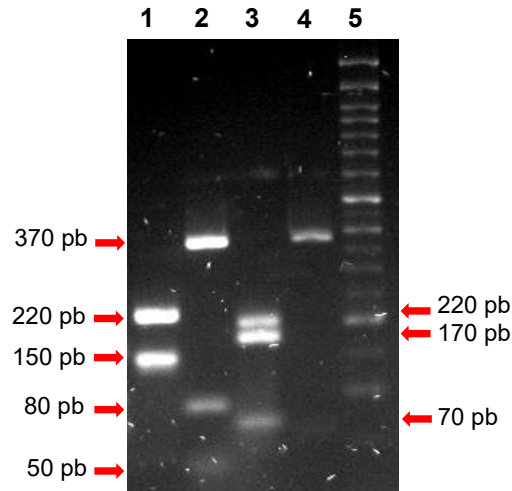


Figura 18: RFLP de la región ITS1/ITS2 del aislamiento 22. Enzimas de restricción empleadas, Calle 1: Hinf I; calle 2: Hae III; calle 3: HhaI; calle 5: marcador de peso molecular de 50 + 100 pb. Calle 4 no corresponden al grupo.

Al realizar la secuenciación de la región D1/D2 y el alineamiento con BLAST, se obtuvo que las especies con mayor similitud (99 %) eran *Pichia kudriavzevii*, *Pichia cecembensis* y *Candida glabrata* (actualmente llamada *Nakaseomyces glabratus*). Las especies fueron discriminadas como se observa en la siguiente tabla de acuerdo a la asimilación diferencial de los azúcares D-arabinosa, DL-lactato y succinato.

Tabla 9: Asimilación de fuentes de carbono para los aislamientos del *Grupo III*.

Aislamiento	D-arabinosa	DL-lactato	Succinato
14			
20			
22			
23	-	+	+
25			
27			
Valores asignados a las especies*			
<i>N. glabratus</i>	-	-	-
<i>P. kudriavzevii</i>	-	+	+
<i>P. cecembensis</i>	+	-	+

- : negativo; + : positivo; w: débil; d: demorado; v: variable. Las celdas en gris señalan las no coincidencias con los aislamientos del *Grupo III*. * adaptado a partir de Kurtzman et al. (2011).

Los aislamientos se identificaron como pertenecientes a la especie *P. kudriavzevii* dado que fueron capaces de asimilar succinato y DL-lactato. A continuación, se muestra el árbol filogenético basado en las secuencias de la región D1/D2, en donde se muestra su agrupación con la especie (Figura 19).

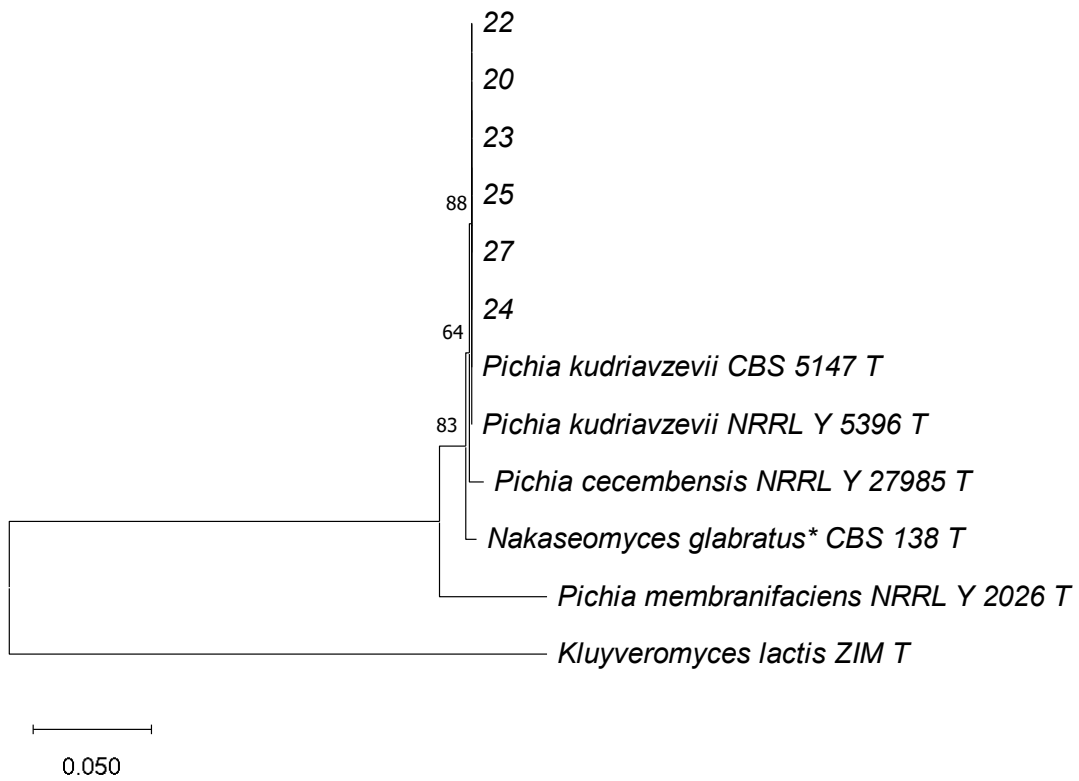


Figura 19: Árbol filogenético de la región D1/D2 de los aislamientos del *Grupo III*. Las cepas tipo se indican con una “T” y los valores de bootstrap se indican en los nodos. *Kluyveromyces lactis* ZIM 2453 se utilizó como outgroup. * anteriormente nombrada *Candida glabrata*.

IV.1.2.4. Aislamientos del *Grupo IV*

Los nueve aislamientos de este grupo inicialmente se diferenciaron en dos subgrupos de acuerdo a la coloración rosada o blanca de las colonias. Sin embargo, con el RFLP y la secuenciación de la región D1/D2 se llegó a la conclusión de que los aislamientos eran de la misma especie. En la figura 20 se muestra el perfil de bandas obtenido para el aislamiento 29 por RFLP como representativo del grupo.

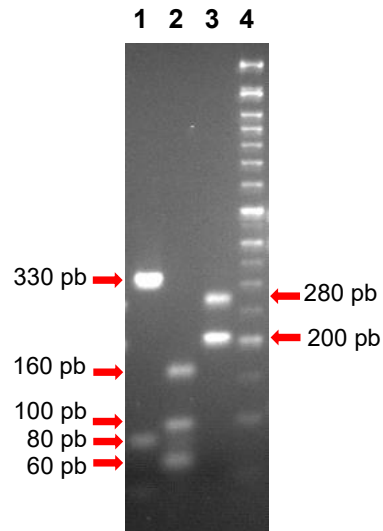


Figura 20: RFLP de la región ITS1/ITS2 del aislamiento 29. Enzimas de restricción empleadas, calle 1: HaeIII; calle 2: HhaI; calle 3: Hinf I; calle 4: marcador de peso molecular de 50 + 100 pb.

Los aislamientos fueron identificados como *P. membranifaciens*, de acuerdo a su alta similitud con la especie al compararlos con las bases de datos. En el árbol filogenético de la figura 21 se observa el agrupamiento de los aislamientos con cepas tipo de *P. membranifaciens*.

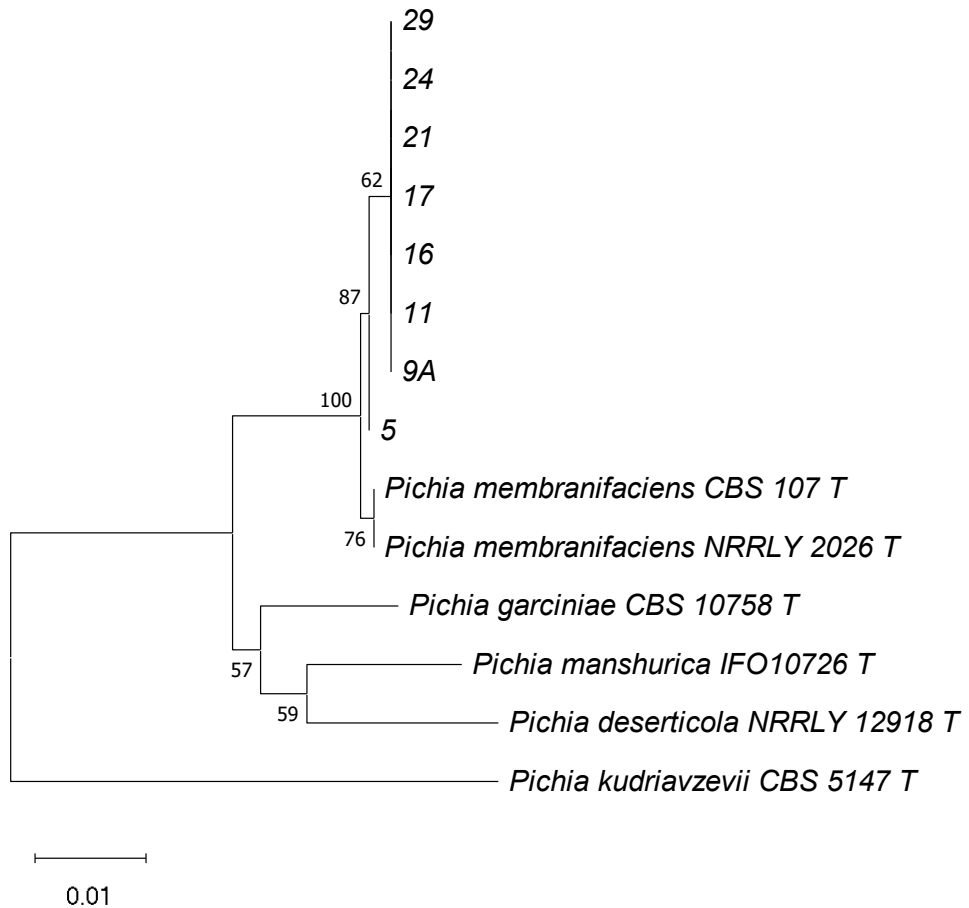


Figura 21: Árbol filogenético de la región D1/D2 de los aislamientos del *Grupo IV*. Las cepas tipo se indican con una “T” y los valores de bootstrap se indican en los nodos. *Pichia kudriavzevii* CBS 5147 se utilizó como outgroup. El aislamiento 32 no fue incluido en el árbol.

En el caso del aislamiento 32 se observó una doble banda al amplificar la región ITS1/ITS2, (480 y 520 pb) (Figura 22).

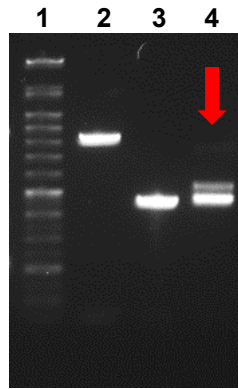


Figura 22: Región ITS1/ITS2 del aislamiento 32 (flecha roja). Calle 1: marcador de peso molecular de 50 + 100 pb, Calle 4: 32. Las calles 2 y 3 contienen muestras que no pertenecen al grupo.

Para descartar una contaminación del aislamiento se realizaron estrías sucesivas en placas de Petri. Luego del proceso de reaislamiento, se repitió la amplificación de la región ITS1/ITS2, obteniéndose los mismos resultados. En consecuencia, se realizó una separación a nivel de célula utilizando un micromanipulador (Singer MSM Manual, EEUU) para descartar la posibilidad de que se tratara de microorganismos fuertemente asociados. Por lo tanto se colocaron células individuales en distintos sectores de una placa de Petri, incubándose hasta que las colonias tuvieron un tamaño detectable a simple vista. A partir de cada colonia se realizó la amplificación de la región ITS1/ITS2, obteniéndose en todos los casos la doble banda (Figura 23).

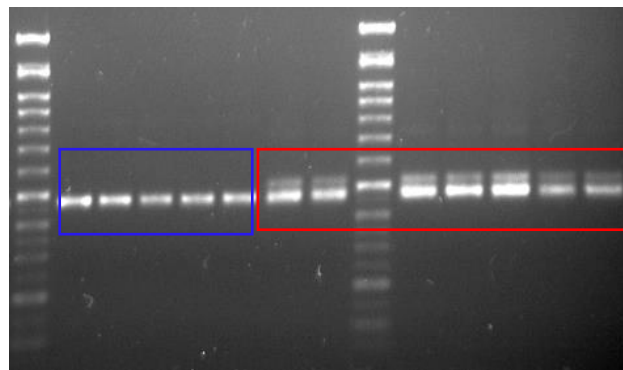


Figura 23: Región ITS1/ITS2 de los aislamientos 32 (rojo) y 11 (azul) micromanipulados. Calle 1 y 8: marcador de peso molecular de 50 + 100 pb.

La banda de 480 pb fue la más intensa para todas las colonias y corresponde con la especie *P. membranifaciens* (cuadro azul, figura 23). En un estudio con cepas de *P. membranifaciens* se observó un comportamiento similar para la misma región génica analizada a partir de un cultivo unicelular. Los autores describieron cuatro tipos diferentes de regiones ITS1/ITS2 para la especie, lo cual atribuyeron a la recombinación intergenómica de los genes ribosomales entre diferentes cepas de la especie (Wu et al., 2016).

IV.1.2.5. Aislamientos del Grupo V

El único aislamiento de este grupo, luego de la secuenciación de la región D1/D2 y alineamiento con BLAST, tuvo una similitud del 99,4 % con las especies *P. deserticola* y *C. ethanolica*. Las mismas difieren en sólo dos nucleótidos en la región D1/D2 del gen LSU rDNA, lo cual indica cuan emparentadas están ambas especies (Kurtzman et al., 2011). Por este motivo, las dos especies quedaron agrupadas en la misma rama del árbol filogenético (Figura 26). Para determinar a cuál especie pertenecía el aislamiento bajo estudio se realizó un análisis *in silico* utilizando la herramienta Nebcutter V2.0 (<http://nc2.neb.com/NEBcutter2/>), lo cual permitió determinar la región génica y la enzima de restricción a emplear para su identificación. La enzima de restricción *SacI* sobre la región ITS1/ITS2 permitió la discriminación entre las especies *C. ethanolica* y *P. deserticola*, al obtenerse dos bandas (373 y 27pb) correspondientes a *C. ethanolica* (Figura 24).

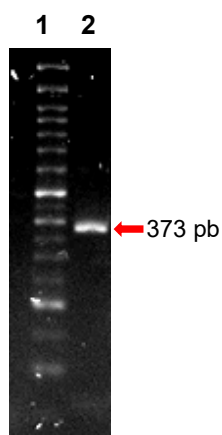


Figura 24: RFLP de la región ITS1/ITS2 del aislamiento 26. Enzima de restricción empleada: *SacI*. Calle 1: marcador de peso molecular de 50 + 100 pb; calle 2: muestra.

Adicionalmente se evaluó la capacidad de crecer a 37 °C, lo cual es una característica diferencial entre ambas especies (Kurtzman et al., 2011). El aislamiento fue capaz de crecer a esa temperatura en medio YPD, confirmándose que pertenece a la especie *C. ethanolica*.

IV.1.2.6. Aislamientos del Grupo VI

Al realizar un RFLP de la región ITS1/ITS2 con las enzimas de restricción Hha I, Hinf I y Hae III al único aislamiento de este grupo, se obtuvo el siguiente perfil de bandas:

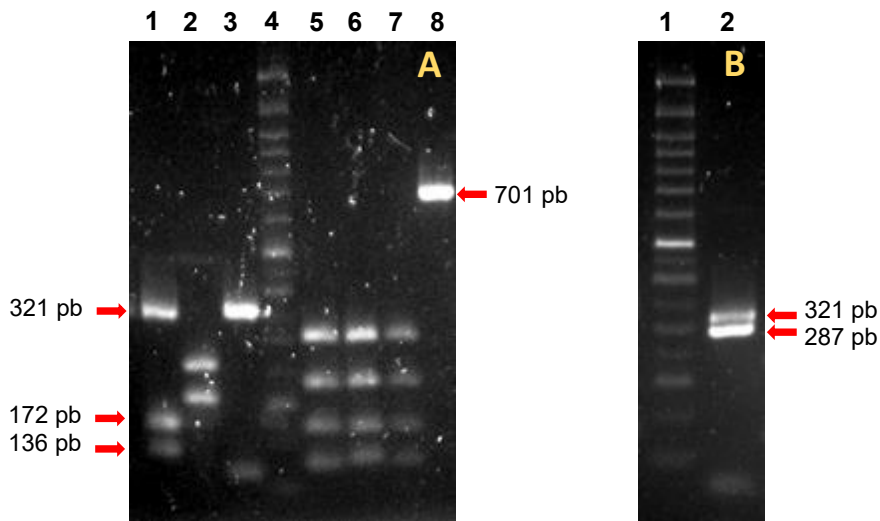


Figura 25: RFLP de la región ITS1/ITS2 del aislamiento 37. Enzimas de restricción empleadas, Calle 1A: HinfI; Calle 8A: Hae III; Calle 2B: HhaI. Calles 1A y 4B: marcador de peso molecular de 50 + 100 pb. Calles 2A, 3A, 5A, 6A y 7A no corresponden al grupo.

Adicionalmente se realizó la secuenciación y comparación con la base de datos de la región D1/D2. Los resultados obtenidos con ambas metodologías determinaron que el aislamiento correspondía a la especie *Candida boidinii*.

En la figura 26 se muestra el árbol filogenético de los aislamientos del grupo V y VI, en el cual cada especie agrupa con la especie obtenida durante el análisis.

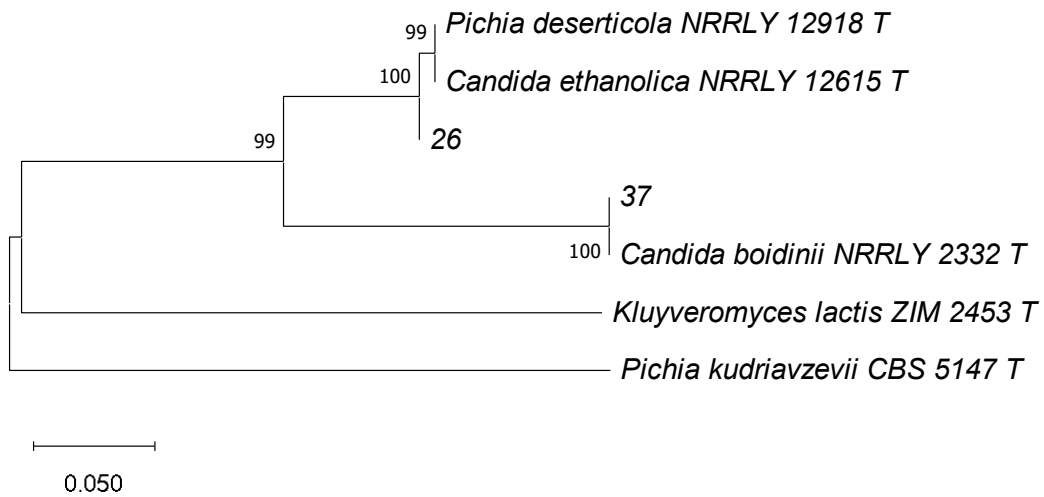


Figura 26: Árbol filogenético de la región D1/D2 de los aislamientos del Grupo V y VI. Las cepas tipo se indican con una “T” y los valores de bootstrap se indican en los nodos. *Pichia kudriavzevii* CBS 5147 se utilizó como outgroup. El aislamiento Pm 32 no fue incluido en el árbol.

Los aislamientos fueron renombrados de acuerdo a su identificación agregándoles iniciales de acuerdo a la especie, Gc, Sc, Pk, Pm, Ce y Cb para *Geotrichum candidum*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia kudriavzevii*, *P. membranifaciens*, *Candida ethanolica* y *C. boidinii*, respectivamente. En la siguiente tabla se resume la información de cada aislamiento.

Tabla 10: Identificación de las levaduras aisladas del kefir de diferente origen y condiciones de cultivo.

Grupo	Aislamiento	Especie	Tipo de gránulo	Nombre del gránulo	Sustrato de fermentación	Fracción utilizada	Técnicas utilizadas
I	Sc 9B	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	KA	CMUNLP 1	MC	Sustrato fermentado	ITS1/ITS2-RFLP Secuenciación D1/D2 MAG2 y GSY1-RFLP ADNmt-RFLP Crecimiento en glicerol
	Sc 33		KA	CMUNLP 6	AM	Gránulo	
	Sc 35		KA	CMUNLP 6	AM	Gránulo	
	Sc 38		KA	CMUNLP 2	AM	Sustrato fermentado	
II	Gc G	<i>Geotrichum candidum</i>	KL	CIDCA AGK1	L	Gránulos	ITS1/ITS2-RFLP Secuenciación D1/D2 M13-RAPD Auxonograma Crecimiento a 30 y 35 °C
	Gc 2		KL	CIDCA AGK1	L	Sustrato fermentado	
	Gc 30		KL	CMUNLP 9	L	Sustrato fermentado	
	Gc 31		KL	CMUNLP 8	L	Gránulos	
III	Pk 14	<i>Pichia kudriavzevii</i>	KL	CIDCA AGK1	PS	Sustrato fermentado	ITS1/ITS2-RFLP Secuenciación D1/D2 Auxonograma
	Pk 20		KL	CIDCA AGK1	PS	Gránulos	
	Pk 22		KA	CMUNLP 1	AM	Gránulos	
	Pk 23		KA	CMUNLP 1	AM	Gránulos	
	Pk 25		KA	CMUNLP 1	CC	Gránulos	
	Pk 27		KA	CMUNLP 1	AM	Sustrato fermentado	
IV	Pm 5	<i>Pichia membranifaciens</i>	KA	CMUNLP 1	AM	Sustrato fermentado	ITS1/ITS2-RFLP Secuenciación D1/D2
	Pm 9A		KA	CMUNLP 1	MC	Sustrato fermentado	
	Pm 11		KA	CMUNLP 1	CC	Sustrato fermentado	
	Pm 16		KA	CMUNLP 1	AM	Sustrato fermentado	
	Pm 17		KA	CMUNLP 1	AM	Sustrato fermentado	
	Pm 21		KA	CMUNLP 2	AM	Gránulos	
	Pm 24		KA	CMUNLP 1	MC	Gránulos	
	Pm 29		KA	CMUNLP 4	AM	Gránulos	
	Pm 32		KA	CMUNLP 5	AM	Gránulos	
	V		Ce 26	<i>Candida ethanolica</i>	KA	CMUNLP 1	
VI	Cb 37	<i>Candida boidinii</i>	KA	CMUNLP 2	AM	Sustrato fermentado	ITS1/ITS2-RFLP Secuenciación D1/D2

MC: miel de caña; AM: azúcar de mascabo; CC: chancaca; L: leche; PS: permeado de suero; KA: kefir de agua; KL: kefir de leche

Los datos obtenidos muestran que la presencia de las especies de levaduras fue variable entre los gránulos de kefir estudiados, dependiendo también del sustrato utilizado para su cultivo (Tabla 10). Similares observaciones fueron señaladas por diversos autores, quienes observaron variaciones en el consorcio del kefir de acuerdo al origen, almacenamiento y condiciones de cultivo (Garrote et al., 1998; Hsieh et al., 2012; Nielsen et al., 2014). Asimismo, es importante destacar que la metodología utilizada para el aislamiento e identificación también representa un factor fundamental en la determinación de las especies (Pogačić et al., 2013), por lo cual los microorganismos detectados son aquellos capaces de crecer bajo las condiciones de cultivo establecidas.

En nuestros resultados, *G. candidum* fue encontrado sólo en kefir de leche, coincidiendo con lo citado por otros autores (Garrote et al., 1997; Timar, 2010; Witthuhn et al., 2005). Sin embargo, *Galactomyces geotrichum* especie emparentada con *G. candidum*, fue hallada por primera vez en un kefir de agua proveniente de China (Tang et al., 2016).

Dentro del género *Pichia* se identificaron *P. kudriavzevii* y *P. membranifaciens*. La primera especie fue aislada de ambos tipos de kefir, excepto cuando se fermentó en leche; no obstante, su presencia en esas condiciones fue reportada por otros autores (Basavaiah et al., 2019; Gao et al., 2012). *Pichia membranifaciens* fue la especie principalmente encontrada en el kefir de agua, estando presente en los diversos gránulos y en las diferentes condiciones de fermentación. De igual forma, su presencia fue reportada en kefir de agua por Miguel et al. (2011), Fiorda et al. (2016), Gamba et al. (2019) y Gonda et al. (2019). En particular, en el kefir de agua CMUNLP 1 su presencia fue la predominante, en coincidencia con lo citado por Gonda et al. (2019). Si bien existen estudios en donde la especie ha sido reportada en kefir de leche (Du et al., 2021; Kalamaki & Angelidis, 2017), en el presente trabajo no fue hallada.

S. cerevisiae fue aislada a partir de los sustratos fermentados y los gránulos de kefir de agua CMUNLP 1, 2 y 6. La especie ha sido frecuentemente reportada tanto en el kefir de agua como de leche (Gulitz et al., 2011; Latorre-García et al., 2007; Laureys & De Vuyst, 2014; Magalhães et al., 2011; Timar, 2010).

Por último, se identificaron las especies *C. ethanolica* y *C. boidinii* aisladas del sustrato fermentado por los gránulos de kefir de agua CMUNLP 1 y 2 respectivamente. Estudios previos han informado la presencia de una amplia variedad de especies de *Candida* en ambos tipos de kefir (Güzel-Seydim et al., 2021; Lynch et al., 2021). Sin embargo, dentro de esta diversidad no se han encontrado reportes de *C. boidinii* aislada de ningún tipo de kefir, a pesar de que es una especie hallada en fermentaciones naturales (Camiolo et al., 2017; Kurtzman et al., 2011). En el caso de *C. ethanolica*,

Sarikkha et al. (2015) fueron los primeros en aislarla del kefir de agua, mientras que Azi et al. (2020) informaron que era la especie predominante en la bebida de kefir de agua cultivada en suero de soja. Al igual que en otros estudios, *C. ethanolica* no fue aislada a partir de kefir de leche. Estudios aplicando metagenómica confirman la presencia de *Candida* sp. en fermentaciones naturales, no siendo en general dominantes dado que otras especies como *S. cerevisiae* y BAL generan metabolitos que inhiben su desarrollo (de Melo Pereira et al., 2022). Así en kefir de leche, la abundancia relativa del género *Candida* sp. con respecto a otras levaduras, fue menor a 0,01 % (Du et al., 2021).

Los cuatro aislamientos de *S. cerevisiae* fueron analizados en cuanto a su variabilidad intraespecífica aplicando la técnica de RFLP del ADNmt. Los resultados obtenidos determinaron tres aislamientos idénticos según su perfil de bandas. El cuarto no presentó perfil de bandas, lo cual se relacionó a la ausencia de mitocondrias de acuerdo al crecimiento en un medio de cultivo específico. Este tipo de caracterizaciones toman importancia cuando los microorganismos son considerados para una aplicación como agentes de biocontrol, siendo la técnica a utilizar dependiente de la especie, por ejemplo en el caso de *P. kudriavzevii* se podría aplicar RAPD con los primers OPA 11 y OPA 3 (Corbu & Portocalelor, 2020).

IV.1.3. Conclusiones

Por metodologías de cultivo directo de los gránulos y sus sobrenadantes fermentados se pudieron aislar diferentes especies de levaduras en ambas fracciones.

La identificación de las levaduras requirió un estudio polifásico, que consistió en análisis morfológicos, bioquímicos y moleculares variados, dada la dificultad de arribar a la identificación inequívoca mediante un único análisis de secuencias.

La presencia de especies varió en relación al tipo y origen del kefir, así como al sustrato de fermentación. En virtud de lo cual pudo observarse que las especies *G. candidum* y *P. membranifaciens* fueron exclusivamente aisladas del kefir de leche y del kefir de agua respectivamente.

En el caso de *S. cerevisiae* se determinó la variación intraespecífica a través de un RFLP del ADNmt, obteniéndose que tres de los cuatro aislamientos provenientes de kefir de diferentes orígenes, compartían un mismo perfil bandas ADNmt. El restante aislamiento no presentó perfil de bandas, por carecer de mitocondrias de acuerdo a la ausencia de crecimiento en un medio específico.

IV.2. Caracterización de la capacidad antifúngica

Los hongos del género *Aspergillus* y *Fusarium* son de relevancia a nivel mundial ya que contaminan una amplia gama de productos agrícolas para consumo humano y animal, produciendo pérdidas económicas y de seguridad alimentaria por la producción de micotoxinas. Entre las micotoxinas generadas por estos hongos, se encuentran las aflatoxinas (AFs) que son altamente mutagénicas, teratogénicas y carcinogénicas (IARC, 1993) y el deoxinivalenol (DON) cuya toxicidad es menor que las aflatoxinas pero que por sus efectos negativos sobre la salud y alta incidencia se encuentra entre las micotoxinas de vigilancia. Por lo tanto, el control de estos microorganismos contaminantes se torna fundamental. Una de las alternativas para su control es el control biológico, la inhibición de un microorganismo por otro, y en este contexto las levaduras representan una fuente ventajosa ya que sus requerimientos nutricionales son sencillos, permiten la colonización de una amplia gama de sustratos y a su vez no producen esporas alergénicas, micotoxinas o antibióticos (Chanchaichaovivat et al., 2007; Freimoser et al., 2019; Hernandez-Montiel et al., 2021). Las levaduras pueden ejercer una inhibición del crecimiento de los hongos, así como tener un efecto sobre la producción de micotoxinas, encontrándose entre los mecanismos de acción involucrados la competencia por nutrientes y espacio, la liberación de metabolitos antifúngicos (solubles o volátiles), parasitismo, adsorción de micotoxinas, entre otras. Conocer el modo de acción de los agentes de biocontrol es relevante en el control del crecimiento fúngico, y a su vez permite identificar los posibles riesgos a los humanos y al ambiente, y la posibilidad de generación de resistencia por parte del hongo patógeno (Mohanram & Kumar, 2019). En este capítulo se analiza, por diferentes metodologías, la capacidad de inhibición de *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* y *Fusarium graminearum* por parte de los aislamientos identificados en la sección IV.1, con el objetivo de seleccionar aislamientos con potencial para ser usados como agentes de biocontrol.

IV.2.1. Reducción de la germinación de conidios

Inicialmente la caracterización antifúngica se basó en el análisis de la reducción de la germinación de conidios de *A. flavus* y *A. parasiticus* por sobrenadantes libres de células (SLC) de los 25 aislamientos bajo estudio. *Fusarium graminearum* no fue incluido en este ensayo dada la dificultad en la producción de los conidios y de sostener esta capacidad tras sucesivos repiques en los medios utilizados, como MEA, PDA, Spezieller

Nahrstoffarmer agar (SNA) (Gamba, 2015) y agar afrecho (Ortega, 2017). Este comportamiento fue descrito por otros autores (Kanatani & Takeda, 1991; Zhang et al., 2022). Es importante resaltar que los pH de los SLC estuvieron cerca del pH del medio MEA estéril (6,5), encontrándose en los rangos de 5,8-6,5 para *S. cerevisiae*, 6,5-6,8 para *P. membranifaciens*, 6,5-6,6 para *C. ethanolica* y 7,2-7,7 para *C. boidinii*. Siendo la excepción los aislamientos de *G. candidum* y *P. kudriavzevii*, cuyos rangos de pH fueron 8,6-8,7 y 8,2-8,5 respectivamente.

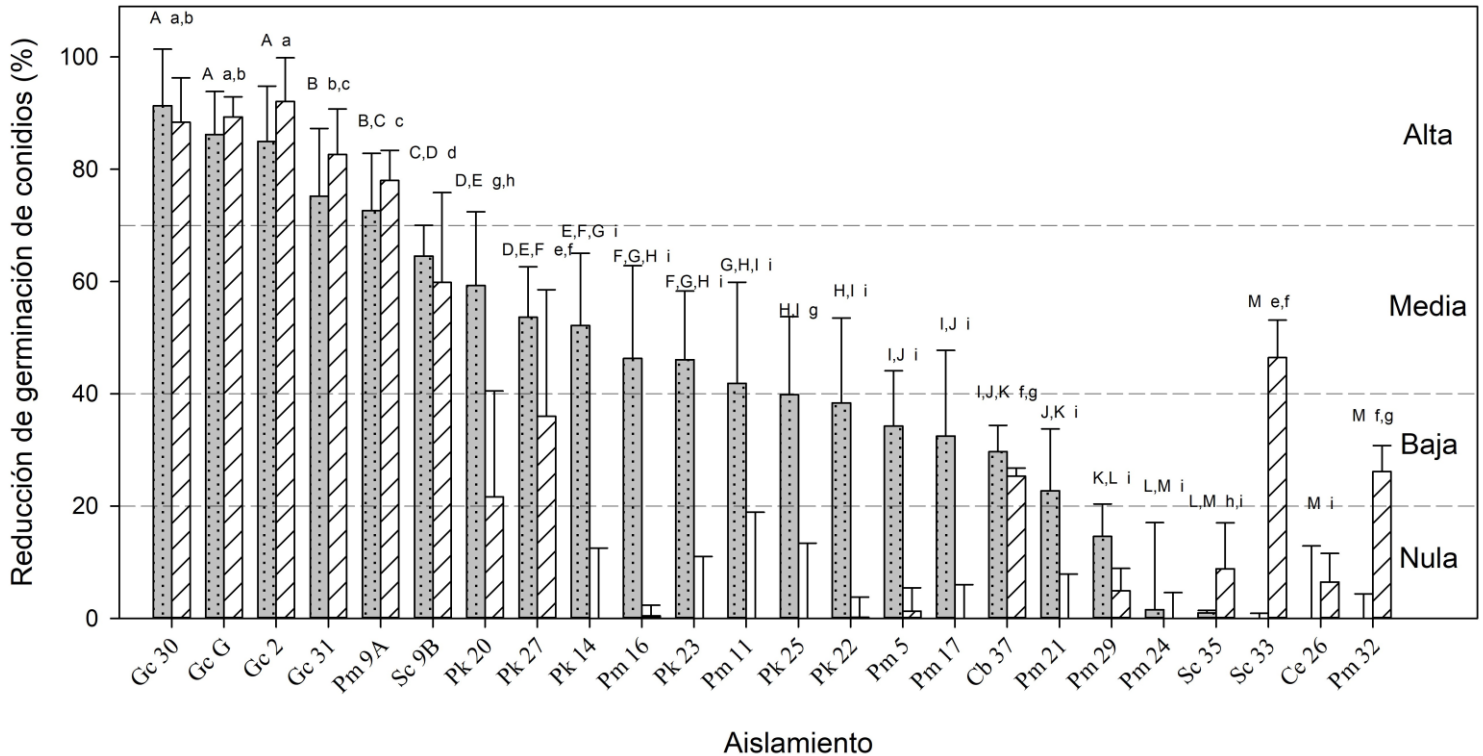


Figura 27: Reducción de la germinación de conidios de *Aspergillus flavus* y *A. parasiticus* por sobrenadantes libres de células. ■ *A. flavus*; ▨ *A. parasiticus*. Letras diferentes para cada hongo filamentoso, indican diferencias significativas determinadas por ANOVA y LSD $p < 0,05$.

En la figura 27 se observa que los SLC presentaron un efecto antifúngico contra ambas especies de *Aspergillus*, el cual varió de acuerdo a la especie y al aislamiento de levadura al cual se enfrentó. Por ejemplo, en el caso de *P. kudriavzevii* frente a *A. flavus* los valores de reducción de conidios fueron de 59,31 % y 38,38 % para Pk 20 y Pk 22, respectivamente. Es de destacar que *A. flavus* fue inhibido por un mayor número de SLC comparado con *A. parasiticus*, obteniéndose el valor máximo con *G. candidum*. A pesar de que hay diferencias entre el comportamiento de ambas especies de hongos

filamentosos, por ejemplo *A. parasiticus* presentó una inhibición media con el aislamiento Sc 33 mientras que para *A. flavus* fue nula, las mayores inhibiciones fueron coincidentes para ambos, siendo *G. candidum* el de mayor efecto. El comportamiento inhibitorio del SLC de esta especie ya ha sido registrado contra *A. parasiticus* por Kumar et al. (2017) y contra *Fusarium* spp. por Kawtharani et al. (2020).

De acuerdo a los resultados obtenidos se seleccionaron ocho aislamientos con los mayores valores de % RG para ambas especies de *Aspergillus* para los subsiguientes ensayos de caracterización, los mismos fueron Gc G, Gc 2, Gc 30, Gc 31, Sc 9B, Pm 9A, Pk 20 y Pk 27.

El efecto inhibitorio del kefir se ha relacionado en parte a la producción de ácidos orgánicos (ácido láctico, acético, propiónico, entre otros) de las BAL, que disminuyen el pH generando estrés ácido intracelular, lo cual reduce el crecimiento fúngico (Ammor et al., 2006). La producción de ácidos orgánicos por parte de las levaduras del kefir ha sido menos estudiada, a pesar de que las levaduras son capaces de producir ácidos con actividad antimicrobiana como el ácido 3-indol láctico, ácido cítrico o ácido feniláctico, entre otros (Naz et al., 2013; Yadav et al., 2022). En el presente trabajo se analizó el efecto del pH sobre la capacidad inhibitoria contra *A. flavus* de cuatro de los ocho aislamientos seleccionados (uno por especie), adicionando NaOH 1M o HCl 1M a los SLC de manera de trabajar en el rango de pH entre 4 y 9.

Los controles positivos de *A. flavus* y negativos (sin inóculo), no variaron su absorbancia con el pH, por lo tanto las variaciones en la absorbancia reflejaron sólo los cambios en el crecimiento del hongo filamentoso. Los resultados se presentan en la figura 28.

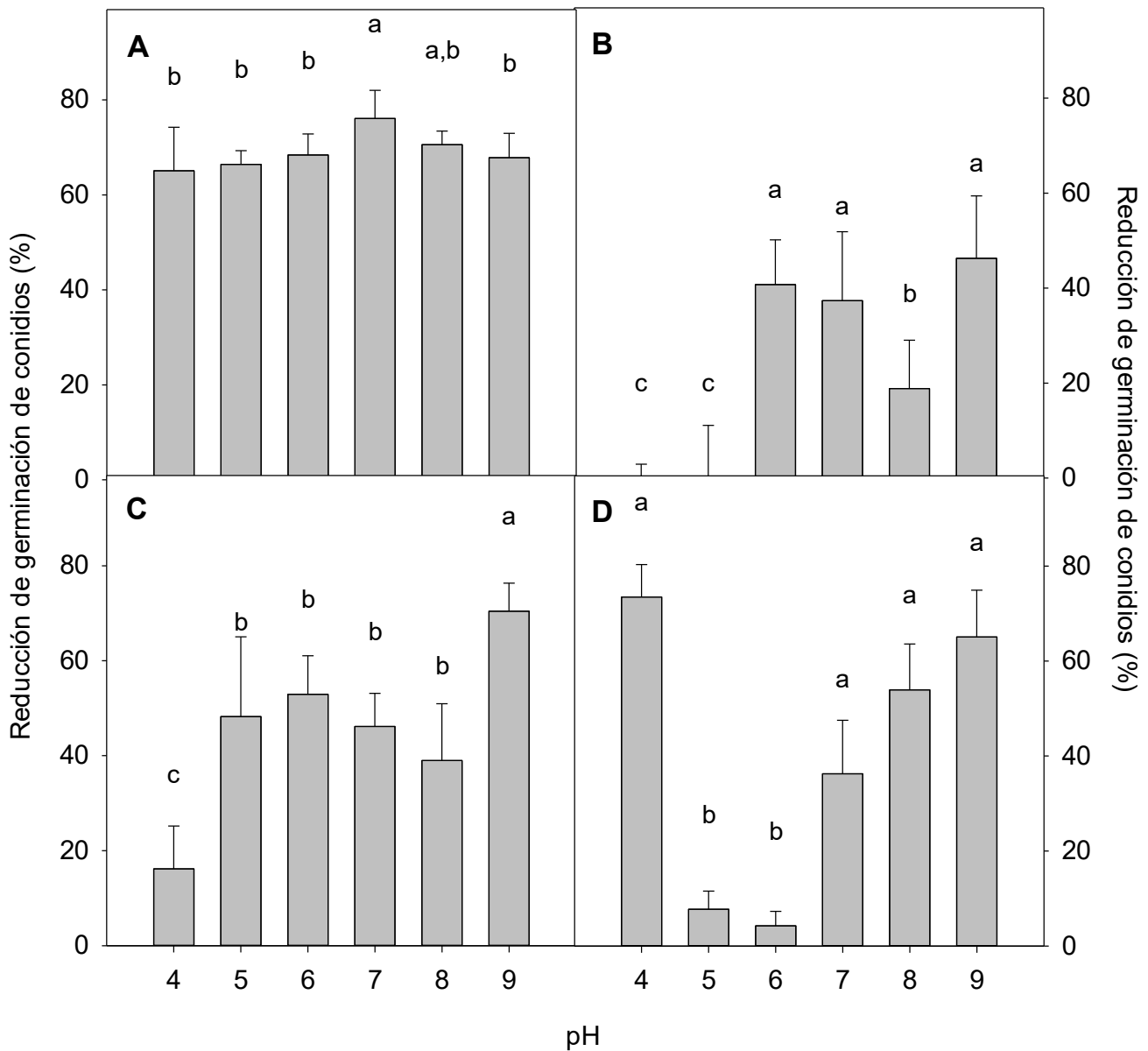


Figura 28: Efecto del pH sobre la reducción de germinación de conidios de *A. flavus* frente a los sobrenadantes libres de células de los aislamientos. A: Gc 30; B: Sc 9B; C: Pm 9A, D: Pk 20. Letras diferentes para cada levadura, indican diferencias significativas determinadas por ANOVA y LSD $p < 0,05$ para Gc 30, Pm 9A y Sc 9B; y por ANOVA on ranks y Dunn $p < 0,05$ para Pk 20.

Como se observa en la figura el pH tuvo efecto sobre los valores de % RG, encontrándose marcadas diferencias para los aislamientos, con la excepción de Gc 30. En particular, el aislamiento Pk 20 cambió de una inhibición alta a pH 4 a una nula a los

pH 5 y 6. Por otro lado, el aislamiento Gc 30 si bien presentó diferencias significativas en los % RG con el pH, la inhibición se mantuvo entre 65 y 76 % (inhibición media/alta).

Adicionalmente, para estudiar el comportamiento de los metabolitos productores de la inhibición con la temperatura, se seleccionó del ensayo anterior el SLC que generó el mayor % RG para cada aislamiento y se lo incubó 10 min a 100 °C en baño termostático, para luego evaluar su % RG. Los resultados se encuentran en la Tabla 11, donde se observa que los SLC de Gc 30 y Pm 9A no sufrieron cambios significativos en su inhibición, mientras que Sc 9B y Pk 20 fueron fuertemente afectados por el tratamiento térmico. El comportamiento diferencial de los SLC al cambio de pH y tratamiento térmico, evidencian que los metabolitos generados por las cuatro especies son diferentes y que específicamente para Gc 30 no se trataría únicamente de ácidos, ya que el efecto inhibitorio se mantuvo en un amplio rango de pH.

Tabla 11: Efecto del tratamiento térmico sobre los sobrenadantes libres de células seleccionados

SLC **	Sin tratamiento térmico		Con tratamiento térmico	
	% RG	Inhibición*	% RG	Inhibición*
Gc 30 pH 7	76,1 ^a	Alta	70,8 ^a	Alta
Sc 9B pH 9	46,3 ^a	Media	19,6 ^b	Nula
Pm 9A pH 9	70,5 ^a	Alta	67,2 ^a	Alta/Media
Pk 20 pH 4	73,5 ^a	Alta	16,7 ^b	Nula

Letras diferentes para cada aislamiento, indican diferencias significativas en la fila determinadas por t-Student $p < 0,05$. *Según Lavermicocca et al. (2003) detallado en el punto III.4.3. **Se emplearon los SLC de los aislamientos con mayores inhibiciones observados en la figura 28.

IV.2.2. Cultivos duales

Para evaluar el comportamiento inhibitorio de las levaduras en crecimiento simultáneo con los hongos filamentosos, se realizó el ensayo de cultivos duales en donde ambos microorganismos fueron inoculados en PDA en la misma placa de Petri. Al analizar los ocho aislamientos seleccionados de acuerdo a su % RG, se observó que ninguna levadura inhibió completamente al hongo. Si bien no se detectó una inhibición

a distancia, sí se observó inhibición fúngica en la proximidad de la levadura, evidenciado por el debilitamiento del micelio en el espacio entre las colonias, tanto para las especies de *Aspergillus* como para *F. graminearum* (marcadas con flechas rojas en la figura 29).

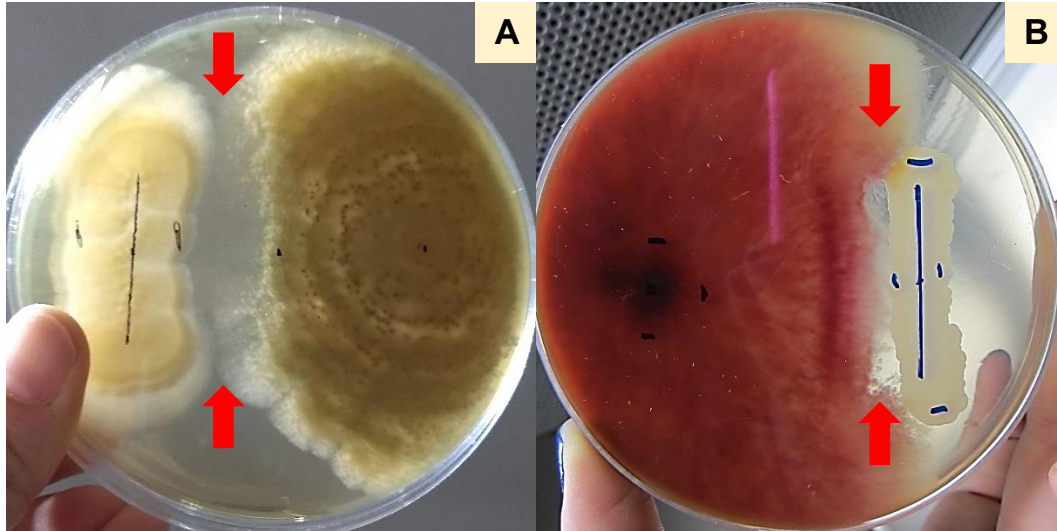


Figura 29: Ensayos duales. Debilitamiento micelial observado en el reverso de las placas. A: *A. flavus*; B: *F. graminearum*. Las flechas rojas señalan la región de debilitamiento del micelio.

Además, las especies de *Aspergillus*, mostraron una disminución considerable en la formación de conidios, detectado por la ausencia de coloración verde en la cercanía de la colonia de la levadura. Similar comportamiento fue descrito para *A. tubigensis* enfrentado a *Candida zeylanoides*, *C. sake*, *Cryptococcus magnus* y *Aureobasidium pullulans*, y para *Botrytis cinerea* con *P. membranifaciens* (Masih & Paul, 2002; Pantelides et al., 2015). Los resultados obtenidos se muestran en las figuras 30 y 31.

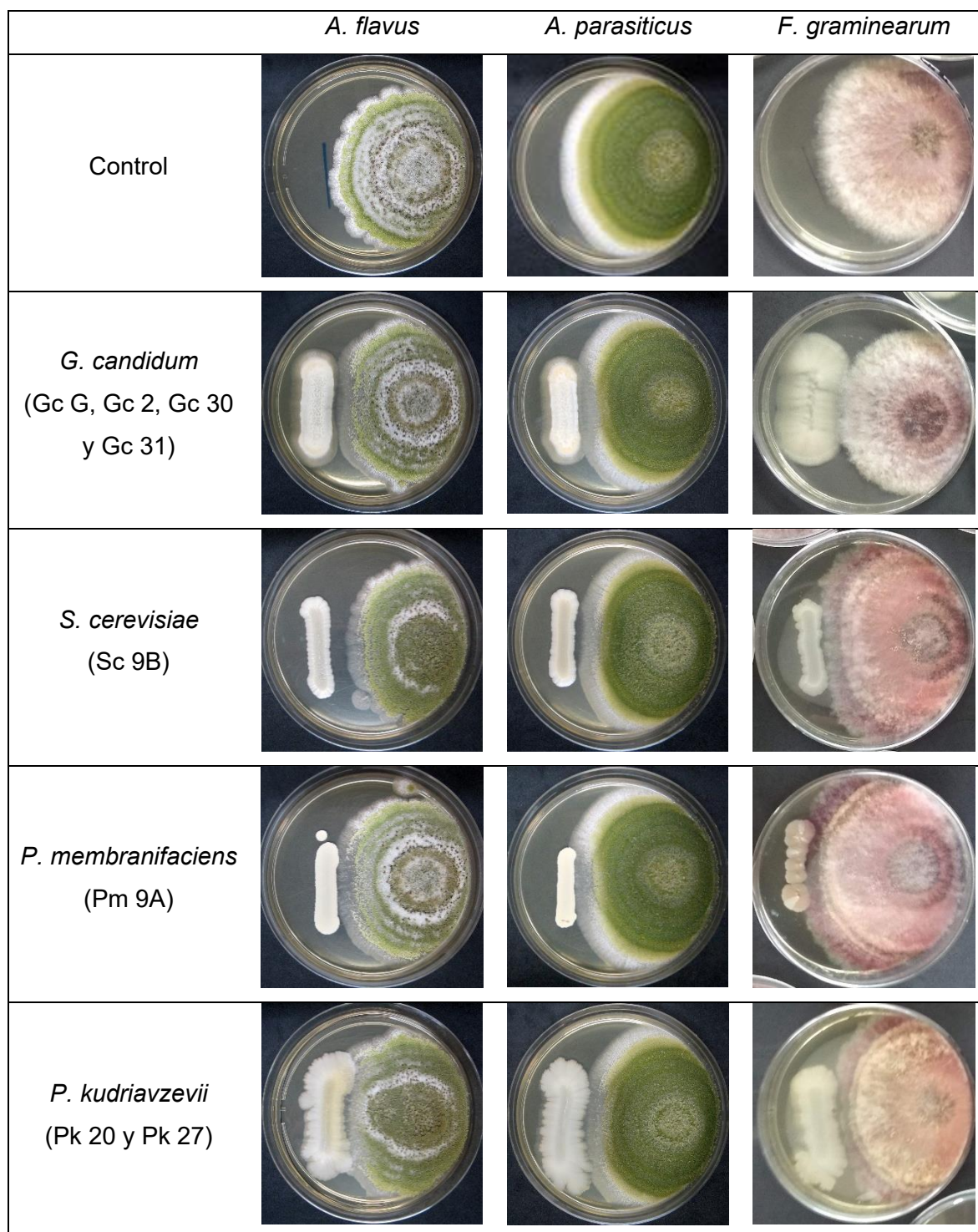


Figura 30: Ensayos duales. Evaluación del crecimiento simultáneo de los aislamientos frente a los hongos filamentosos al día 7 de incubación.

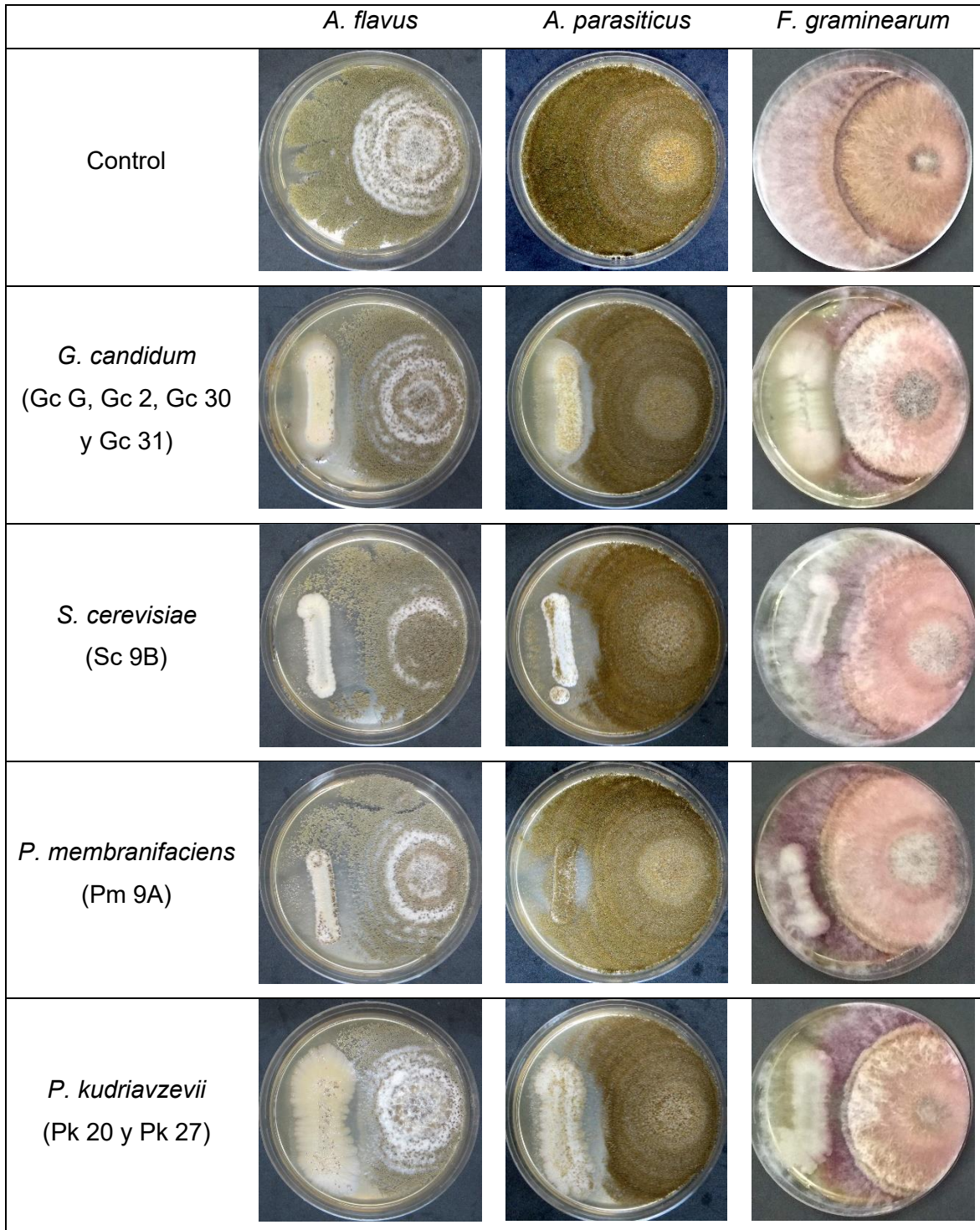


Figura 31: Ensayos duales. Evaluación del crecimiento simultáneo de los aislamientos frente a los hongos filamentosos al día 14 de incubación.

La inhibición fue evaluada diariamente durante los 14 días del ensayo, observándose hacia el final de éste que todos los aislamientos mantuvieron la inhibición,

con la excepción del Pm 9A, el cual fue completamente cubierto por los hongos filamentosos al día 12 (Figura 31). La capacidad antifúngica de los aislamientos de *G. candidum* y *P. kudriavzevii* ha sido reportada previamente. Kumar et al. (2017) detectaron una zona de inhibición clara en *A. parasiticus* NRRL299 cuando se cultivaba con *G. candidum* aislado de cereales, mientras que Choińska et al. (2020) encontraron que un aislamiento *P. kudriavzevii* aislado de granos de centeno podía inhibir el crecimiento de *Fusarium* sp., *Mucor* sp., *Botrytis cinerea*, *Penicillium* sp. y *A. fumigatus*. De acuerdo a los resultados obtenidos en el ensayo, todos los aislamientos presentaron una capacidad inhibitoria similar. En contraposición a lo obtenido en el ensayo de %RG donde los aislamientos de *G. candidum* se destacaban por su alta inhibición. El distinto comportamiento entre ambos ensayos, puede deberse a que la generación de metabolitos antifúngicos depende del medio y las condiciones de cultivo en las que crecen los microorganismos (Lipinska-Zubrycka et al., 2018; Liu et al., 2017; Wang et al., 2010).

IV.2.3. Compuestos orgánicos volátiles

Entre los mecanismos de inhibición fúngica se encuentra la generación de compuestos orgánicos volátiles antifúngicos. Su producción se evaluó coincubando los microorganismos (sin contacto directo) en PDA en placas de Petri enfrentadas de manera de generar una cámara de aire para la difusión de los compuestos (Figura 32 A, descrito en el punto III.4.5). A lo largo de los 14 días de incubación se tomaron medidas del diámetro del hongo filamentoso, para el cálculo de la tasa de crecimiento y el tiempo de latencia. Como se observa en la tabla 12, hubo diferencias significativas entre las tasas de crecimiento de los tratamientos frente al control para los tres hongos ensayados, *A. flavus*, *A. parasiticus* y *F. graminearum*. En el caso de *A. flavus* y *F. graminearum* se encontraron diferencias significativas entre los efectos generados por las levaduras para cada hongo filamentoso, no así para *A. parasiticus*. En cuanto a los tiempos de latencia, se observó un marcado efecto en ambas especies de *Aspergillus*, generado por los VOC de tres de los aislamientos. El mayor efecto fue obtenido con los aislamientos Pk 20 y Pk 27, los cuales aumentaron a más del doble y quintuple los tiempos de latencia para *A. flavus* y *A. parasiticus* respectivamente. En el caso de *A. flavus* el aislamiento Sc 9B también presentó un efecto significativo en el tiempo de latencia, pero no tan pronunciado como para los aislamientos anteriores. Este comportamiento no fue detectado en *F. graminearum*.

Tabla 12: Efecto de VOC generados por los aislamientos sobre el crecimiento de *Aspergillus* spp. y *Fusarium graminearum*.

Aislamiento de levadura	<i>Aspergillus flavus</i>		<i>Aspergillus parasiticus</i>		<i>Fusarium graminearum</i>	
	Tc	t _L	Tc	t _L	Tc	t _L
	(mm/h)	(h)	(mm/h)	(h)	(mm/h)	(h)
Control	0,581 ^a	18,0 ^c	0,479 ^a	14,7 ^b	0,754 ^a	13,3 ^a
Gc G	0,463 ^{b,c}	20,5 ^c	0,207 ^b	11,2 ^b	0,482 ^{b,c}	10,0 ^{a,b}
Gc 2	0,460 ^{b,c}	19,0 ^c	0,162 ^b	10,3 ^b	0,550 ^{b,c}	7,2 ^{a,b}
Gc 30	0,412 ^{b,c}	20,7 ^c	0,200 ^b	13,5 ^b	0,568 ^b	11,0 ^{a,b}
Gc 31	0,480 ^b	22,7 ^c	0,146 ^b	12,7 ^b	0,397 ^c	3,8 ^b
Sc 9B	0,361 ^c	36,5^b	0,253 ^b	26,3 ^{a,b}	0,380 ^c	6,3 ^{a,b}
Pm 9A	0,401 ^{b,c}	18,3 ^c	0,260 ^b	15,7 ^b	0,504 ^{b,c}	8,3 ^{a,b}
Pk 20	0,397 ^{b,c}	46,1^{a,b}	0,183 ^b	97,5^a	0,380 ^c	6,3 ^{a,b}
Pk 27	0,428 ^{b,c}	46,7^b	0,183 ^b	90,8^a	0,366 ^c	8,3 ^{a,b}

Tc: tasa de crecimiento del hongo filamentoso; t_L: tiempo de latencia. Los VOC son liberados en cámaras generadas entre dos placas de Petri enfrentadas. Letras diferentes (por columna) indican diferencias significativas determinadas por ANOVA y LSD p < 0,05.

De manera similar a lo obtenido en el ensayo de cultivos duales (punto IV.2.2), en este ensayo también pudo observarse una considerable reducción en la generación de conidios por parte de ambas especies de *Aspergillus* detectado por la ausencia de coloración verde (Figura 32 B y C). Fiori et al. (2014) también detectaron la inhibición en la esporulación de *Aspergillus carbonarius* por VOC generados por especies de *Candida* spp. y *Lachancea* sp., la cual resultó reversible. Este efecto puede deberse además a la acumulación de dióxido de carbono y disminución de oxígeno (Schalchli et al., 2011). Indistintamente de cuál sea el origen de la inhibición por volátiles, las levaduras que presentan un efecto sobre el crecimiento o esporulación de los hongos filamentosos, podrían representar una buena herramienta de biocontrol postcosecha, en particular en condiciones de limitación de oxígeno como ocurre en el almacenamiento de granos (Huang et al., 2011).



Figura 32: Efecto de VOC generados por los aislamientos sobre el crecimiento de *Aspergillus flavus* en PDA al día 14 de incubación. **A:** configuración de las placas para generar la cámara de aire, **B:** Control (sin inóculo de levadura), **C:** *A. flavus* vs *P. kudriavzevii*.

En resumen, las ocho levaduras analizadas presentaron actividad antifúngica evidenciada por alguna o varias de las tres metodologías utilizadas. En particular, la técnica de % RG permitió la evaluación y diferenciación de la capacidad antifúngica de un gran número de aislamientos. Sin embargo, es una técnica para la cual se requiere una suspensión de conidios, por lo que no es útil para las especies de hongos filamentosos que presentan escasa o nula esporulación, como lo es en el caso de *F. graminearum*. Los altos valores de % RG obtenidos (especialmente para *G. candidum*) podrían indicar la liberación de metabolitos antifúngicos al medio. En otros estudios en medio líquido, se asoció la capacidad de reducción del crecimiento de *Fusarium* spp. con la liberación de ácido feniláctico (PLA) por parte de *G. candidum* (Kawtharani et al., 2020). En nuestro estudio se destaca la estabilidad de la capacidad de inhibición de los SLC de *G. candidum* sometidos a cambios de pH y tratamiento térmico. Se ha demostrado que el PLA es termoestable (hasta 121 °C por 20 min), pero su capacidad antimicrobiana se ve fuertemente afectada por el pH, siendo máxima entre los pH 4 y 4,5 (Cortés-Zavaleta et al., 2014; Sorrentino et al., 2018). Lo cual indicaría la presencia de otros posibles metabolitos en los SLC de *G. candidum*. Los ácidos orgánicos no son los únicos metabolitos antifúngicos reportados para las levaduras, en ensayos duales donde se observó la reducción del crecimiento y de esporulación de *A. flavus* cocultivado con un aislamiento de *S. cerevisiae*, se asoció la capacidad inhibitoria con los compuestos 4-hidroxifeniletanol, 4,4-dimethiloxazol y éster dioctílico del ácido 1,2-bencenodicarboxílico (Abdel-Kareem et al., 2019). Otros metabolitos posibles son las toxinas killer, las cuales pueden ejercer una acción inhibitoria contra hongos filamentosos y se encuentran ampliamente distribuidas entre las levaduras,

detectándose en más de 46 géneros (Klassen et al., 2017). Las toxinas killer más estudiadas pertenecen a las especies *S. cerevisiae*, *Kluyveromyces lactis*, *Pichia membranifaciens*, *Wickerhamomyces anomalus*, *Cyberlindnera mrakii* y *Tetrapisispora phaffii* (Mannazzu et al., 2019). En relación a los VOC Choinska et al. (2020) estudiaron los compuestos liberados por un aislamiento de *P. kudriavzevii* con capacidad de inhibir a los géneros *Penicillium*, *Fusarium*, *Aspergillus* y *Mucor*, y entre los compuestos detectados encontraron 2-feniletanol y sus acetatos, los cuales tienen capacidad antifúngica de acuerdo a otras investigaciones (Hua et al., 2014; Huang et al., 2020; P. Liu et al., 2014). En otro estudio, los volátiles generados por un aislamiento de *G. candidum* inhibieron en un 54 % al hongo fitopatogénico *Rhizoctonia solani*, donde los volátiles predominantes fueron 2-feniletanol, acetato de isoamilo y isovalerato de etilo (Mookherjee et al., 2017). Adicionalmente, se encontró que este efecto inhibitorio era de amplio espectro contra hongos fitopatógenos y que al ser utilizados en un formulado para granos de arroz y trigo en condiciones herméticas, la inhibición contra *R. solani* y *Curvularia oryzae* se mantenía (Mitra et al., 2023). Entre los microorganismos, las levaduras se destacan en la producción natural de 2-feniletanol (Naz et al., 2013), el cual ha sido identificado como una molécula de *quorum sensing* para las levaduras *S. cerevisiae*, *Debaryomyces hansenii* y *Candida albicans* (Chen & Fink, 2006; Gori et al., 2011; Huang et al., 2020) y su producción ha sido reportada en las especies *Kloeckera apiculata*, *Pichia anomala*, *Kluyveromyces marxianus* y *Yarrowia lipolytica* (Celińska et al., 2013; Fabre et al., 1998; Hua et al., 2014; Liu et al., 2014). Además, generalmente se encuentra en bajas concentraciones en alimentos fermentados aportando al aroma (Majcher et al., 2014; Naz et al., 2013).

IV.2.4. Efecto sobre la producción de deoxinivalenol

El efecto de las levaduras sobre la producción de la micotoxina DON por *F. graminearum*, se analizó coincubando los microorganismos en placas de Petri con PDA durante 14 días. A partir de mediciones periódicas del diámetro de las colonias se calculó la tasa de crecimiento y tiempo de latencia, y finalizado el período de incubación se empleó el cultivo entero para la extracción de DON y su cuantificación por CG-ECD (ítem III.4.6). A continuación se muestra un cromatograma representativo, donde se señalan los picos correspondientes a la micotoxina y del estándar interno (Figura 33).

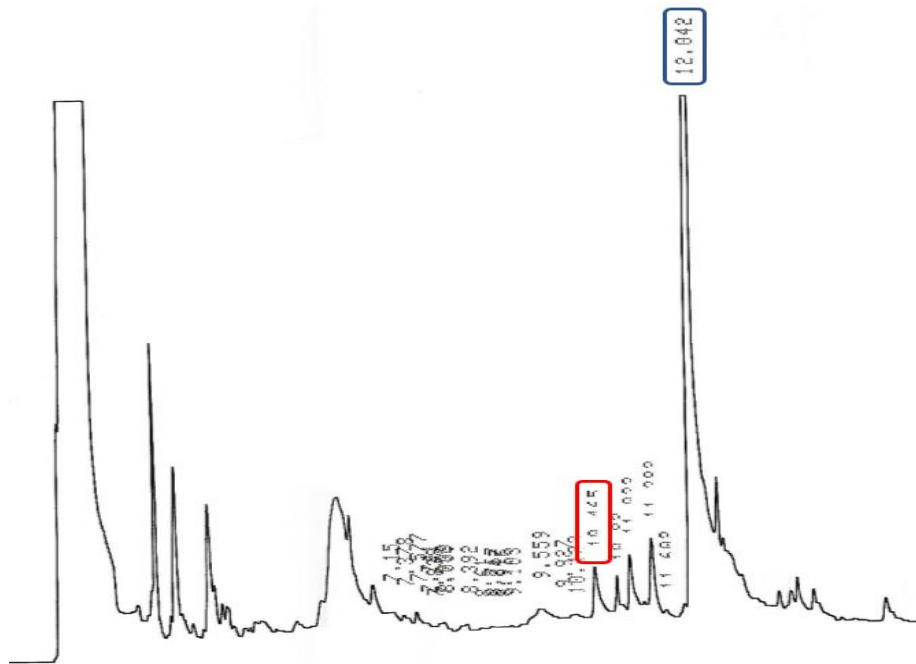


Figura 33: Cromatograma control de la producción de DON por *Fusarium graminearum*. Rojo: DON de la muestra; Azul: estándar interno, 10 µg/ml de ACBP.

La concentración de DON se obtuvo a partir de una curva de calibración:

$$Y = 0,00005X - 0,0007 (R^2 = 0,9907)$$

Siendo Y el área relativa y X la concentración de DON. Además en el cálculo, se tomó en consideración el factor de extracción que fue de 234,4. En la tabla 13 se detallan las concentraciones obtenidas de seis de los ocho aislamientos, así como también la tasa de crecimiento y tiempo de latencia del hongo filamentoso. Los aislamientos Gc G y Gc 2 no crecieron en el ensayo.

Tabla 13: Contenido de DON medido por CG-ECD de los enfrentamientos *in vitro* de *F. graminearum* frente a los aislamientos.

Tratamiento	DON (µg/g)	Tasa de crecimiento (mm/h)	Tiempo de latencia (h)
Control Fg44	0,8715 ^a	0,892 ^a	17,0 ^b
Gc 30	0,1163 ^c	0,587 ^d	19,9 ^b
Gc 31	1,1239 ^a	0,638 ^d	43,5 ^a
Sc 9B	0,6684 ^{a,b,c}	0,333 ^e	0 ^c
Pm 9A	0,7622 ^{a,b}	0,748 ^b	4 ^c
Pk 27	0,0939 ^c	0,343 ^e	13,7 ^b
Pk 20	0,1017 ^{b,c}	0,463 ^c	10,9 ^b

Letras diferentes (por columna) indican diferencias significativas, determinadas por ANOVA y LSD $p < 0,05$. Producción de DON durante el crecimiento simultáneo en placas de Petri de los aislamientos frente a *F. graminearum* por 14 días.

En los ensayos los aislamientos Gc 30, Pk 20 y Pk 27 redujeron significativamente el contenido de DON en relación al control, por lo que se puede señalar que las levaduras ejercen un efecto inhibitor sobre la producción de la toxina; este comportamiento se correlaciona con la menor tasa de crecimiento del hongo filamentoso. Para el resto de los aislamientos (Sc 9B, Pm 9A y Gc 31) no hubo diferencias significativas en los ensayos con respecto al control, aun cuando la tasa de crecimiento del hongo filamentoso se redujo. Armando et al. (2013) determinaron que la producción de DON por *F. graminearum* disminuía al ser cocultivado con *S. cerevisiae* en medio de cultivo en placa de Petri. Sin embargo, el efecto era dependiente del aislamiento ensayado, ya que con otro aislamiento de la misma especie la producción de DON se incrementó. Otros trabajos mostraron que *G. candidum* además de tener la capacidad de reducir el crecimiento de *Fusarium* spp., podía reducir la producción de las toxinas asociadas, lo cual se relacionó con la producción de PLA (ácido feniláctico) por parte de la levadura (Kawtharani et al., 2020).

IV.2.5. Captura de aflatoxina B1

Las levaduras tienen la capacidad de reducir la biodisponibilidad de varias micotoxinas en alimentos humanos y animales (Luo et al., 2020). Por dicho motivo se procedió a la evaluación de la capacidad de captura de aflatoxina de los aislamientos, tomándose un aislamiento por especie. Los resultados se muestran en la tabla 14.

Tabla 14: Capacidad de captura de AFB1 de los aislamientos

Aislamiento	Especie	% Captura AFB1
Gc 30	<i>G. candidum</i>	17,6 ^b
Sc 9B	<i>S. cerevisiae</i>	21,4 ^{a,b}
Pm 9A	<i>P. membranifaciens</i>	30,9 ^a
Pk 20	<i>P. kudriavzevii</i>	12,5 ^b

Letras diferentes indican diferencias significativas, determinadas por ANOVA y LSD $p < 0,05$.

El aislamiento con la mayor capacidad de adsorción de AFB1 fue Pm 9A, correspondiente a la especie *P. membranifaciens*. El resto de los aislamientos presentaron capacidades de adsorción de la micotoxina entre 12,5 y 21,4 %, pero no presentaron diferencias significativas entre ellos. Los resultados obtenidos son similares a los reportados para *S. cerevisiae* por Armando et al. (2011) con valores de captura de 20,6-48,7 %, y para la misma especie y *P. kudriavzevii* por Sampaolesi (2020) con valores 7,7-14,7 %. La adsorción de micotoxinas es un fenómeno de superficie que ocurre entre la pared celular de las levaduras y las micotoxinas (Luo et al., 2020; McCormick, 2013; Pfliegler et al., 2015). La pared celular de las levaduras está compuesta por β -glucano (29-64 %), mananos (31 %), proteínas (13 %), lípidos (9 %) y quitina (1-2 %), encontrándose los β -glucanos en la parte interna de la pared y los mananos en la capa más externa celular (Liu et al., 2021). Todos los componentes de la pared celular presentarían capacidad de adsorber micotoxinas, sin embargo los más estudiados son los dos mayoritarios (β -glucanos y mananos) (Liu et al., 2021; Magnoli et al., 2016; Oztekin et al., 2023; Vila-Donat et al., 2018). Dado que la composición de la pared celular de las levaduras es muy variable, existe una diversa capacidad de

adsorción entre las especies. Por lo que a continuación se determinó el contenido de mananos de pared en relación a la capacidad de adsorción de los aislamientos.

IV.2.6. Estimación de los mananos de pared

Los mananos (o manoproteínas), son proteínas unidas a manosa por uniones O- o N-glucosídicas (10 % proteína, 90 % manosa) (Liu et al., 2021). Su determinación se realizó a partir de una hidrólisis ácida, midiendo el contenido de glucosa y manosa por HPLC. El contenido de mananos se determinó a través de una curva de calibración con manano comercial (detallado en III.4.8).

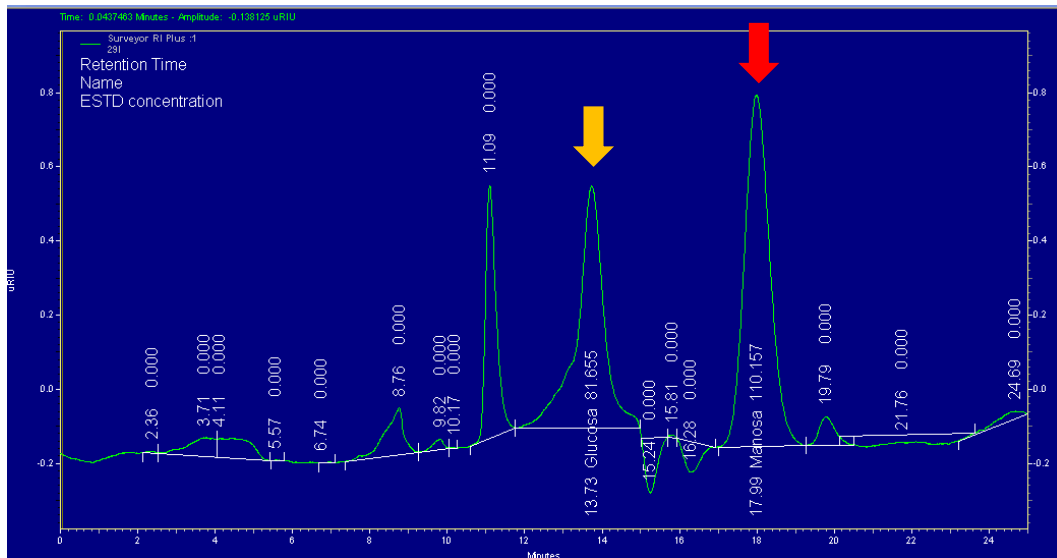


Figura 34: Cromatograma modelo obtenido en la determinación de mananos de pared. Amarillo: pico para la glucosa; Rojo: pico para la manosa.

La tabla 15 presenta los resultados del contenido de mananos para los ocho aislamientos, expresados por gramo de peso seco.

Tabla 15: Contenido de manano de pared de los aislamientos por HPLC-RI

Aislamiento	Especie	mg manano/g peso seco
Gc G		53,54 ^{c,d}
Gc 2	<i>G. candidum</i>	61,11 ^c
Gc 30		48,35 ^d
Gc 31		50,63 ^{c,d}
Sc 9B	<i>S. cerevisiae</i>	72,43 ^b
Pm 9A	<i>P. membranifaciens</i>	44,93 ^d
Pk 20		104,42 ^a
Pk 27	<i>P. kudriavzevii</i>	94,18 ^a

Letras diferentes indican diferencias significativas determinadas por ANOVA y LSD $p < 0,05$.

Los aislamientos dentro de una misma especie presentaron contenidos de mananos similares, mientras que entre las distintas especies se encontraron marcadas diferencias. Los dos aislamientos de la especie *P. kudriavzevii* (Pk 20 y Pk 27) exhibieron el mayor contenido de mananos, mientras que *P. membranifaciens* (Pm 9A) y *G. candidum* (Gc G, Gc 30 y Gc 31) presentaron valores más bajos. Las diferencias en el contenido de manano no se relacionarían con la capacidad de captura de AFB1 de acuerdo al ensayo anterior. Similar comportamiento fue reportado por otros autores quienes no detectaron una correlación entre la capacidad de captura de micotoxinas (AFB1, ZEA, OTA) y la composición de la pared celular (Faucet-Marquis et al., 2014; Fruhauf et al., 2012; Joannis-Cassan et al., 2011). Si bien en otras investigaciones, sí se ha observado una relación entre la capacidad de adsorción de las micotoxinas y los componentes de la pared celular (Abdolshahi et al., 2018; Cavret et al., 2010; Luo et al., 2015; Vila-Donat et al., 2018; Yiannikouris et al., 2004). Cabe destacar que la estructura de la pared celular es altamente dinámica y varía entre las cepas de levadura, las fases del ciclo celular y las condiciones del medio, mientras que el proceso de adsorción también es multifactorial, dependiendo del tipo de micotoxina, el microorganismo usado, la concentración de ambos, la temperatura, el pH, entre otros (Jouany et al., 2005; Luo et al., 2020). En consecuencia, se han observado aumentos en la capacidad de captura de AFB1 cuando levaduras eran cultivadas en medios estresantes en contraposición con medios más nutritivos como el YPD (Fochesato et al., 2020; Sampaolesi, 2020). En la tabla 16 se resumen los resultados obtenidos para cada especie:

Tabla 16: Resumen de la caracterización antifúngica de los aislamientos

Especie	<i>G. candidum</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>P. membranifaciens</i>	<i>P. kudriavzevii</i>
Aislamientos	Gc 2			
	Gc G			Pk 20
	Gc 30	Sc 9B	Pm 9A	Pk 27
	Gc 31			
% RG	Inhibición alta para <i>Aspergillus</i> spp. No varía por pH y tratamiento térmico	Inhibición media/alta para <i>Aspergillus</i> spp. Varía por pH y tratamiento térmico	Inhibición media/alta para <i>Aspergillus</i> spp. Varía por pH y tratamiento térmico	Inhibición media/baja para <i>Aspergillus</i> spp. Varía por pH y tratamiento térmico
Cultivos duales	Inhibición por contacto para los tres hongos filamentosos. Debilitamiento del micelio y reducción de la formación de conidios de <i>Aspergillus</i> spp. Duración de la inhibición:			
	14 días	14 días	Menor a 14 días	14 días
VOC	Disminución de Tc de <i>Aspergillus</i> spp. y <i>F. graminearum</i> . No afectó significativamente t _L	Disminución de Tc de <i>Aspergillus</i> spp. y <i>F. graminearum</i> . Aumentó t _L para <i>A. flavus</i>	Disminución de Tc de <i>Aspergillus</i> spp. y <i>F. graminearum</i> . No afectó significativamente t _L	Disminución de Tc de <i>Aspergillus</i> spp. y <i>F. graminearum</i> . Aumentó t _L para <i>Aspergillus</i> spp.
Producción DON	Varía con el aislamiento	Sin efecto	Sin efecto	Disminución
Adsorción AFB1	17,6 %	21,4 %	30,9 %	12,5 %

Tc: tasa de crecimiento del hongo filamentosos; t_L: tiempo de latencia.

IV.2.7. Conclusiones

El estudio del comportamiento antifúngico contra *A. flavus* y *A. parasiticus* por medio de la técnica de reducción de conidios, nos permitió seleccionar ocho aislamientos con los mayores valores de inhibición para ambas especies. Lo observado se relaciona con la capacidad de las levaduras de producir y liberar al medio metabolitos solubles antifúngicos. Los aislamientos de *G. candidum* fueron los de mayor inhibición para ambas especies de *Aspergillus*, el cual no se vio significativamente afectado por el

pH, ni el tratamiento térmico. La capacidad inhibitoria de los SLC de los aislamientos de *P. membranifaciens*, *P. kudriavzevii* y *S. cerevisiae*, se vio afectada por el cambio de pH y en los últimos dos casos también por el tratamiento térmico.

La profundización de los estudios de inhibición sobre los aislamientos seleccionados, por medio de cultivos duales en placa, arrojaron una inhibición de ambos *Aspergillus* y *F. graminearum* por contacto. Los hongos presentaron micelio debilitado y para las especies de *Aspergillus* una reducción de conidios en la cercanía de la levadura.

En la evaluación de los VOC de los aislamientos seleccionados, se determinó una disminución en el crecimiento de los hongos filamentosos en relación al control para las tres especies de hongos ensayadas. En particular, los aislamientos de *P. kudriavzevii* y *S. cerevisiae* presentaron un aumento sobre el tiempo de latencia para ambas especies de *Aspergillus*. La producción de conidios de ambos hongos filamentosos disminuyó por los VOC generados.

Los estudios realizados se relacionan con mecanismos de competencia por nutrientes y espacio y de liberación de metabolitos (solubles en el medio y volátiles) con un efecto inhibitorio sobre el crecimiento y la producción de conidios.

El estudio del efecto de las levaduras sobre la producción de DON por *F. graminearum*, arrojó una disminución en la producción de la micotoxina correlacionado con una reducción en el crecimiento del hongo, a excepción de un aislamiento de *G. candidum*.

Las cuatro especies de los aislamientos tuvieron la capacidad de capturar AFB1, siendo *P. membranifaciens* la de mayor capacidad.

Los aislamientos presentaron diferencias en el contenido de mananos de pared, siendo uniformes para cada especie. Las capacidades de captura de AFB1 no se correlacionaron con el contenido de mananos determinado.

IV.3. Rasgos fenotípicos asociados a virulencia

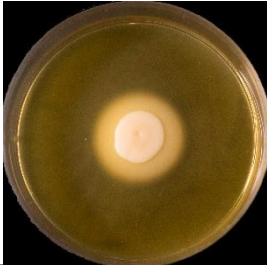
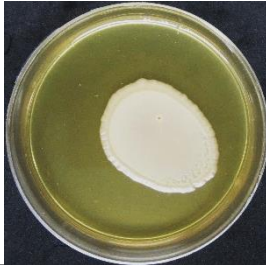


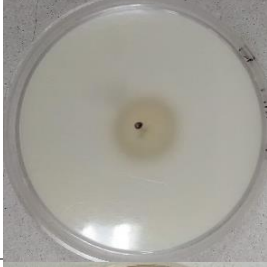

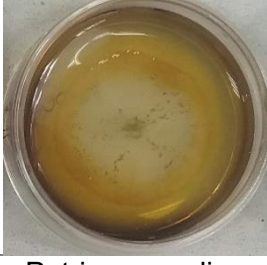
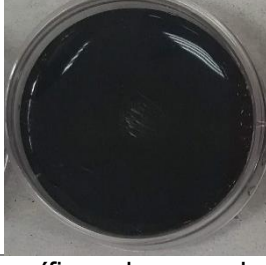
La virulencia es un proceso multifactorial por lo cual su estudio integral resulta complejo de abordar. El desarrollo de la infección no sólo depende de los factores de virulencia de la levadura sino también de la respuesta del huésped (Brunke et al., 2016; Van Burik & Magee, 2001). Se han relacionado rasgos fenotípicos con la virulencia de las levaduras, principalmente a través de estudios *in vitro* comparando aislamientos clínicos frente a cepas industriales no virulentas (Llopis Pla, 2012; McCusker et al., 1994; Murphy & Kavanagh, 1999). En levaduras patógenas como *Candida albicans* y *Cryptococcus neoformans*, se han descrito diferentes rasgos fenotípicos los cuales se relacionan con su virulencia (Ciurea et al., 2020; Karkowska-Kuleta et al., 2009; Yang, 2003).

Entre los rasgos asociados a la virulencia, en el presente estudio se caracterizaron el crecimiento a 37 y 42 °C por relacionarse con la capacidad de crecer a la temperatura corporal, la adhesión a células y tejidos, y la capacidad de liberar enzimas hidrolíticas que permiten degradar tejidos y nutrirse (Clemons et al., 1994; Karkowska-Kuleta et al., 2009; Murphy & Kavanagh, 1999; Pérez-Través et al., 2021). Entre las barreras existentes en el cuerpo humano se encuentra el pasaje gastrointestinal. En particular en el estómago, el ácido gástrico y las enzimas generan una acción inhibitoria sobre los microorganismos (Lara-Hidalgo et al., 2017). Para ejercer la virulencia, la tolerancia a estas condiciones es decisiva para la supervivencia de las levaduras.

IV.3.1. Actividades enzimáticas

En primer lugar, se analizó en placas de Petri con medios inductores específicos (punto III.5.1) la presencia de las actividades enzimáticas proteasa, lipasa y fosfolipasa por estar relacionadas con rasgos de virulencia y la amilasa por poder generar deterioro en el maíz donde se aplicará.

Tabla 17: Modo de detección de actividades enzimáticas de los aislamientos

Actividad*	Método de detección	Controles**	
		Positivo	Negativo
Fosfolipasa	Formación de halo de precipitación alrededor de la colonia		
Lipasa	Viraje del indicador al amarillo***		
Proteasa	Formación de halo traslúcido de hidrólisis alrededor de la colonia		
Amilasa	Ausencia de color violeta al revelar con Lugol		

*Actividades enzimáticas detectadas en Placas de Petri con medios específicos de acuerdo al ítem III.5.1. **Los aislamientos control fueron cedidos por las Cátedras de Microbiología General y Microbiología Clínica, UNLP. ***Indicador Rojo fenol

Como se observa en la tabla 18, sólo hubo producción de actividades lipasa y fosfolipasa para los aislamientos de la especie *G. candidum*. Las restantes actividades enzimáticas no fueron detectadas. A continuación, se cuantificó la actividad enzimática lipasa producida por *G. candidum* en un medio de cultivo líquido inductor con una emulsión de aceite de oliva (ítem III.5.1.3). De los cuatro aislamientos de la especie analizados, tres tuvieron actividad lipasa alta (entre 83 y 97 $\mu\text{mol/h.ml}$) de acuerdo a los

valores registrados por Sacristán et al. (2012). En la tabla 18 se resumen los resultados obtenidos de las actividades enzimáticas.

Tabla 18: Detección de las actividades enzimáticas de los aislamientos

Aislamiento	Actividad enzimática			
	Proteasa	Lipasa ($\mu\text{mol/h.ml}$)*	Fosfolipasa	Amilasa
Gc G	-	32,5 ^c	+	-
Gc 2	-	83,75 ^{b,a}	+	-
Gc 30	-	73,75 ^b	+	-
Gc 31	-	96,25 ^a	+	-
Sc 9B	-	-	-	-
Pm 9A	-	-	-	-
Pk 20	-	-	-	-
Pk 27	-	-	-	-

“ + ” positiva; “ - ” negativa. *Letras diferentes marcan diferencias significativas determinadas por ANOVA y LSD $p < 0,05$.

El estudio de las actividades enzimáticas proteasa, lipasa y fosfolipasa, toma importancia por ser factores de virulencia necesarios para iniciar la invasión por la destrucción de lípidos y proteínas de las membranas. En *C. albicans* y *Cryptococcus neoformans* se relacionaron estas actividades con el proceso de patogénesis (Kantarciolu & Yücel, 2002; Park et al., 2013; Vidotto et al., 2000). Adicionalmente, se ha observado que la actividad proteasa de *C. albicans* está involucrada en contrarrestar el sistema inmunológico del huésped al degradar las cadenas pesadas de IgG, proteínas C3, colágeno y fibronectina (Ciurea et al., 2020). Por otro lado, la actividad lipasa detectada en cepas de *G. candidum* es utilizada con fines industriales en la producción de quesos (Boutrou & Guéguen, 2005).

IV.3.2. Crecimiento a diferentes temperaturas

La capacidad de crecer a altas temperaturas por parte de las levaduras se evaluó inoculando cultivos jóvenes en placas con medio de cultivo YPD e incubando a 28 °C

(temperatura control), 37 °C y 42 °C durante 7 días. Los resultados se detallan en la siguiente tabla:

Tabla 19: Crecimiento de los aislamientos a diferentes temperaturas

Levadura	Temperatura		
	28 °C	37 °C	42 °C
Gc G	+	-	-
Gc 2	+	-	-
Gc 30	+	-	-
Gc 31	+	-	-
Sc 9B	+	+	-
Pm 9A	+	-	-
Pk 20	+	+	+
Pk 27	+	+	+

Los aislamientos fueron capaces de crecer a la temperatura control (28 °C) demostrando su viabilidad, mientras que a 37 °C sólo crecieron el aislamiento de *S. cerevisiae* (Sc 9B) y los dos de *P. kudriavzevii* (Pk 20 y Pk 27). A su vez, los aislamientos de *P. kudriavzevii* crecieron a 42 °C (Tabla 19). Distintos autores han reportado la capacidad de crecimiento de aislamientos clínicos de *S. cerevisiae* a 42 °C, lo cual se relaciona en ciertos casos con la virulencia *in vivo* (de Llanos et al., 2011, 2006; McCusker et al., 1994). De Llanos et al. (2006) propusieron a modo preventivo analizar la capacidad de crecimiento a 42 °C, además de la formación de pseudohifas y altos niveles de actividad fosfolipasa, como criterio de selección de cepas industriales.

IV.3.3. Resistencia al pasaje gastrointestinal

Se determinó la viabilidad de los aislamientos luego ser sometidos a condiciones simuladas del pasaje gastrointestinal, para luego continuar con los ensayos de capacidad de adhesión a un modelo de células intestinales. Inicialmente, se analizó la resistencia a los diferentes valores de pH del pasaje gastrointestinal, siendo 2,5 para la fase gástrica y 8 para la intestinal.

Tabla 20: Viabilidad de los aislamientos a las condiciones de pH del pasaje gastrointestinal en buffer PBS.

Aislamiento	Recuento (UFC/ml)		
	Inicial	Postgástrico	Postintestinal
Gc G	1,94.10 ⁵ a	5.10 ⁵ b	8,75.10 ⁵ c
Gc 2	9,38.10 ⁴ a	1,35.10 ⁵ a	9,38.10 ⁵ b
Gc 30	5,01.10 ⁴ a	4,88.10 ⁴ a,b	7.10 ⁴ b
Gc 31	4,13.10 ⁴ a	2,53.10 ⁵ b	7,75.10 ⁵ c
Sc 9B	3,75.10 ⁶ a	2,64.10 ⁶ a	2,38.10 ⁶ a
Pm 9A	6,25.10 ⁶ a	2,21.10 ⁶ a	3,11.10 ⁵ b
Pk 20	8,75.10 ⁶ a	5,63.10 ⁶ a	3,66.10 ⁶ a
Pk 27	5,75.10 ⁶ a	2,08.10 ⁶ b	1,76.10 ⁶ b

Letras diferentes (por fila) corresponden a diferencias significativas determinadas por RM ANOVA y Holm-Sidak $p < 0,05$.

El comportamiento de los aislamientos frente a los diferentes pH del pasaje gastrointestinal fue variado (Tabla 20). Para Sc 9B y Pk 27 no hubo cambios significativos en los recuentos luego del pH gástrico e intestinal, a diferencia del aislamiento Pk 20. El aislamiento Pm 9A fue el más afectado por los pH, disminuyendo en más de un orden de magnitud luego de la fase intestinal. Los aislamientos de *G. candidum* presentaron variabilidad en los resultados, si bien no se observaron disminuciones en los recuentos con respecto al valor inicial.

De acuerdo con los datos observados si bien los aislamientos presentaron diferencias en el comportamiento a los pH del pasaje gastrointestinal, demostraron resistir las diferentes etapas y mantener un recuento microbiano final considerable. A continuación, se repitió el ensayo con las soluciones gástrica e intestinal detalladas en III.5.2. Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 21: Viabilidad de los aislamientos a las condiciones del pasaje gastrointestinal simulado

Aislamiento	Recuento (UFC/ml)		
	Inicial	Postgástrico	Postintestinal
Gc G	1,26.10 ⁵ a	1,21.10 ⁵ a	1,90.10 ⁵ b
Gc 2	4,50.10 ⁴ a	1,15.10 ⁵ b	9,63.10 ⁴ b
Gc 30	7,50.10 ⁴ a	1,28.10 ⁵ a,b	4,79.10 ⁵ b
Gc 31	5,50.10 ⁵ a	2,91.10 ⁵ a	2,16.10 ⁵ a
Sc 9B	2,43.10 ⁷ a	2,64.10 ⁷ a	2,20.10 ⁷ a
Pm 9A	5,63.10 ⁶ a	5,88.10 ⁶ a	2,25.10 ⁶ b
Pk 20	1,39.10 ⁷ a	2,16.10 ⁷ b	1,06.10 ⁷ a
Pk 27	1,78.10 ⁷ a	2,88.10 ⁷ b	1,95.10 ⁷ a

Letras diferentes (por fila) corresponden a diferencias significativas determinadas por RM ANOVA y Holm-Sidak $p < 0,05$.

Los resultados obtenidos fueron similares entre ambos ensayos (Tablas 20 y 21). Como se observa en los resultados el aislamiento *P. membranifaciens* fue el más afectado, aunque bajo estas condiciones el descenso en su recuento fue menor. Se ha reportado la resistencia al pasaje gastrointestinal de cepas de *P. kudriavzevii*, *Galactomyces* sp. y *Geotrichum* sp. aisladas de leche (Chen et al., 2010). Asimismo, se ha reportado la capacidad de resistir a las condiciones del pasaje gastrointestinal por parte de levaduras aisladas de kefir de leche o agua. Dentro de las especies ensayadas se encontraban *S. cerevisiae*, *S. unisporus*, *Issatchenkia occidentalis* y *Kluveromyces marxianus* (Diosma et al., 2014; Gut et al., 2019; Rajkowska & Kunicka-Styczynska, 2010). Se ha propuesto que la adaptabilidad de las levaduras aisladas de kefir de sobrevivir en estas condiciones, se relaciona a que el kefir también presenta condiciones extremas, como el ambiente ácido y la presencia de alcohol (Gut et al., 2019; Lara-Hidalgo et al., 2017).

IV.3.4. Adhesión a células Caco-2

El epitelio intestinal es la primera barrera frente a una infección. La adhesión de los patógenos a las células del hospedador es necesaria para su colonización e

invasión, siendo éste el caso de *C. albicans* (entre otras levaduras) (Ciurea et al., 2020; Höfs et al., 2016; Karkowska-Kuleta et al., 2009). La adhesión de la microbiota del kefir a células intestinales ha sido estudiada *in vitro* en líneas celulares, como Caco-2 y HT29 (González-Orozco et al., 2022). Por lo que en el presente trabajo se estudió la capacidad de adhesión de los aislamientos al modelo de células intestinales Caco-2.

Tabla 22: Capacidad de adhesión de los aislamientos a las células modelo intestinal, Caco-2

Aislamiento	Adhesión (%)*
Gc G	2,2 ^c
Gc 2	0,7 ^d
Gc 30	0,7 ^d
Gc 31	0,6 ^{d,e}
Sc 9B	0,4 ^e
Pm 9A	0,8 ^{c,d}
Pk 20	0,9 ^{c,d}
Pk 27	1,0 ^{c,d}
Control Ca SC5314	62,1^a
Control Wa 2937	13,7^b

Ca SC5314: *Candida albicans* SC5314, Wa 2937: *Wickerhamomyces anomalus* 2937 (Colección de Amparo Querol, IATA-CSIC). *Letras diferentes representan diferencias significativas determinadas por ANOVA y LSD $p < 0,05$.

La adhesión de los aislamientos a las células Caco-2 se analizó empleando como control dos aislamientos, uno de *C. albicans* y otro de *Wickerhamomyces anomalus* (Ca SC5314 y Wa 2937), que presentaban adhesiones altas y medias respectivamente según Pérez-Través et al. (2021). Como se muestra en la tabla 22, los valores de adhesión de los tratamientos, que oscilaron entre 0,4 y 2,2 % y presentaron diferencias significativas entre sí, fueron considerablemente bajos en comparación con los controles. Estos valores son similares a los obtenidos para levaduras aisladas de kefir de leche por Diosma et al. (2014), quienes también encontraron bajos valores de adhesión a las células Caco-2/TC7 para *Kluyveromyces marxianus* CIDCA 8154 ($3,0 \pm 0,9$ %) y *S. cerevisiae* CIDCA 8112 ($0,5 \pm 0,1$ %). Las bajas adhesiones obtenidas podrían relacionarse con un bajo riesgo de colonización del epitelio por parte de los

aislamientos. Sin embargo, Pérez-Torrado et al. (2012) encontraron que aislamientos clínicos y no clínicos de *S. cerevisiae* presentaban bajas adhesiones en comparación con los controles (*C. albicans* y *C. glabrata*). Los autores sugirieron que estas levaduras serían oportunistas, dado que no presentan mecanismos activos de adhesión y penetración de la barrera intestinal, por lo cual la pérdida de la integridad en la barrera sería por factores externos.

En otro ensayo, se evaluó el daño generado por los aislamientos sobre las células Caco-2 en las mismas condiciones a las previamente ensayadas, utilizando un kit comercial (BioLegend®, EEUU) que cuantificaba la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) liberada al medio (indicativa del daño celular). Como control positivo se empleó *Salmonella enterica* var. enteritidis CIDCA 101 (colección del CIDCA-CONICET) y como control negativo medio DMEM sin inocular. Finalizado el ensayo, se realizó la lectura de absorbancia a 490 nm, observándose valores sin diferencias significativas con el control negativo, por lo que no generarían daño celular. Sin embargo, se debe profundizar en este ensayo para cuantificar las unidades enzimáticas.

En la siguiente tabla se resumen los resultados de los rasgos fenotípicos estudiados para cada especie.

Tabla 23: Rasgos fenotípicos relacionados con la virulencia de los aislamientos

Especie	Aislamientos	Resultados
<i>G. candidum</i>	Gc G	Actividades lipasa y fosfolipasa positivas.
	Gc 2	Actividades amilasa y proteasa negativas.
	Gc 30	Sin crecimiento a 37 y 42 °C.
	Gc 31	Resistencia al pasaje gastrointestinal (PGI). Baja adhesión a células intestinales.
<i>S. cerevisiae</i>	Sc 9B	Actividades enzimáticas negativas.
		Crecimiento a 37 °C. Sin crecimiento a 42 °C Resistencia al PGI. Baja adhesión a células intestinales.
<i>P. membranifaciens</i>	Pm 9A	Actividades enzimáticas negativas.
		Sin crecimiento a 37 y 42 °C. Resistencia al PGI (disminución de un orden de magnitud). Baja adhesión a células intestinales.
<i>P. kudriavzevii</i>	Pk 20	Actividades enzimáticas negativas.
	Pk 27	Crecimiento a 37 y 42 °C.
		Resistencia al PGI. Baja adhesión a células intestinales.

La ausencia de actividad amilasa observada en los aislamientos, es un rasgo positivo para su aplicación y estudio sobre el maíz. Además, ninguna de las especies presentó más de un rasgo fenotípico de virulencia en simultáneo, lo cual es citado como recomendable para su aplicación en alimentos (Pérez-Través et al., 2021). Por otro lado, de Llanos et al. (2006) propusieron como criterio de selección de cepas para su uso en la industria alimentaria, que no tuvieran capacidad de crecimiento a 42 °C, de formación de pseudohifas y altos valores de actividad fosfolipasa.

Es de destacar que los factores de virulencia estudiados en este capítulo pueden tener una doble interpretación de acuerdo al enfoque del estudio. Por ejemplo para biocontrol, la actividad proteasa es deseable ya que podría representar un mecanismo de acción contra el hongo patógeno (Zajc et al., 2019). Mientras que en el estudio de probióticos, una adhesión alta a células intestinales es deseable, ya que en muchos casos es necesaria para poder ejercer su acción (Monteagudo-Mera et al., 2019).

Asimismo, en el caso de *G. candidum* la actividad lipasa (que puede estar relacionada con la virulencia), es una característica buscada por la industria quesera (Boutrou & Guéguen, 2005).

Si bien no existen reportes científicos que adscriban un efecto negativo por el consumo de kefir, el aislamiento de los microorganismos del consorcio hace necesario su estudio de manera individual en relación al riesgo sobre la salud. Existen estudios acerca de la patogenicidad de especies aisladas. Entre 1842 y 2006 las infecciones confirmadas de *G. candidum* fueron escasas y el origen no era alimentario, lo que representa un riesgo de infección prácticamente nulo (Pottier et al., 2008). Es así que actualmente la especie se encuentra entre los microorganismos con un historial reconocido de administración segura en alimentos fermentados de acuerdo a la EFFCA (del inglés “European Food and Feed Cultures Association”) y a la IDF (del inglés “International Dairy Federation”) (Kamilari et al., 2023). La especie *S. cerevisiae*, si bien es considerada una especie GRAS (del inglés “Generally Recognized As Safe”) por la FDA, en las últimas dos décadas, han aumentado los casos de infecciones por la misma, por lo cual se propone considerarla como un patógeno oportunista emergente (Pérez-Torrado & Querol, 2016; Pitt & Hocking, 2022). La virulencia de cada cepa debe ser analizada en cada sistema bajo estudio, dado que se desconoce si puede llevar a cabo la colonización en el hospedador al encontrar condiciones favorables (Llopis Pla, 2012). De acuerdo a de Llanos et al. (2006) estos rasgos asociados a la virulencia son orientativos, debiéndose reforzar los análisis de la patogenicidad con otros estudios, como las pruebas en modelos animales (Koh, 2013).

IV.3.5. Conclusiones

Los aislamientos no presentaron actividad amilasa, por lo que no habría riesgo de degradación del almidón en el maíz.

La actividad proteasa estuvo ausente en todos los aislamientos. En cuanto a las actividades enzimáticas lipasa y fosfolipasa sólo los aislamientos de *G. candidum* la presentaron.

Tres de los aislamientos, dos de *P. kudriavzevii* y uno de *S. cerevisiae*, tuvieron la capacidad de crecer a las temperaturas 37 y 42 °C, lo que permitiría su crecimiento a la temperatura corporal y una posible infección.

La supervivencia a las condiciones gastrointestinales simuladas obtenida para la mayoría de los aislamientos, les permitiría alcanzar el intestino de manera viable y ejercer su posible efecto infeccioso.

Los aislamientos no presentaron valores de adhesión altos al modelo de células intestinales, lo que disminuiría el riesgo de colonización por parte de los mismos. Además, de acuerdo a los resultados preliminares de LDH, los aislamientos no generarían daños sobre las células intestinales.

De los ocho aislamientos seleccionados, ninguno presentó más de un rasgo de virulencia en simultáneo y especialmente los valores de adhesión fueron bajos, por lo que no hay indicios de que puedan generar daños en la salud. En consecuencia, se prosiguió con los ensayos en el maíz con los aislamientos.

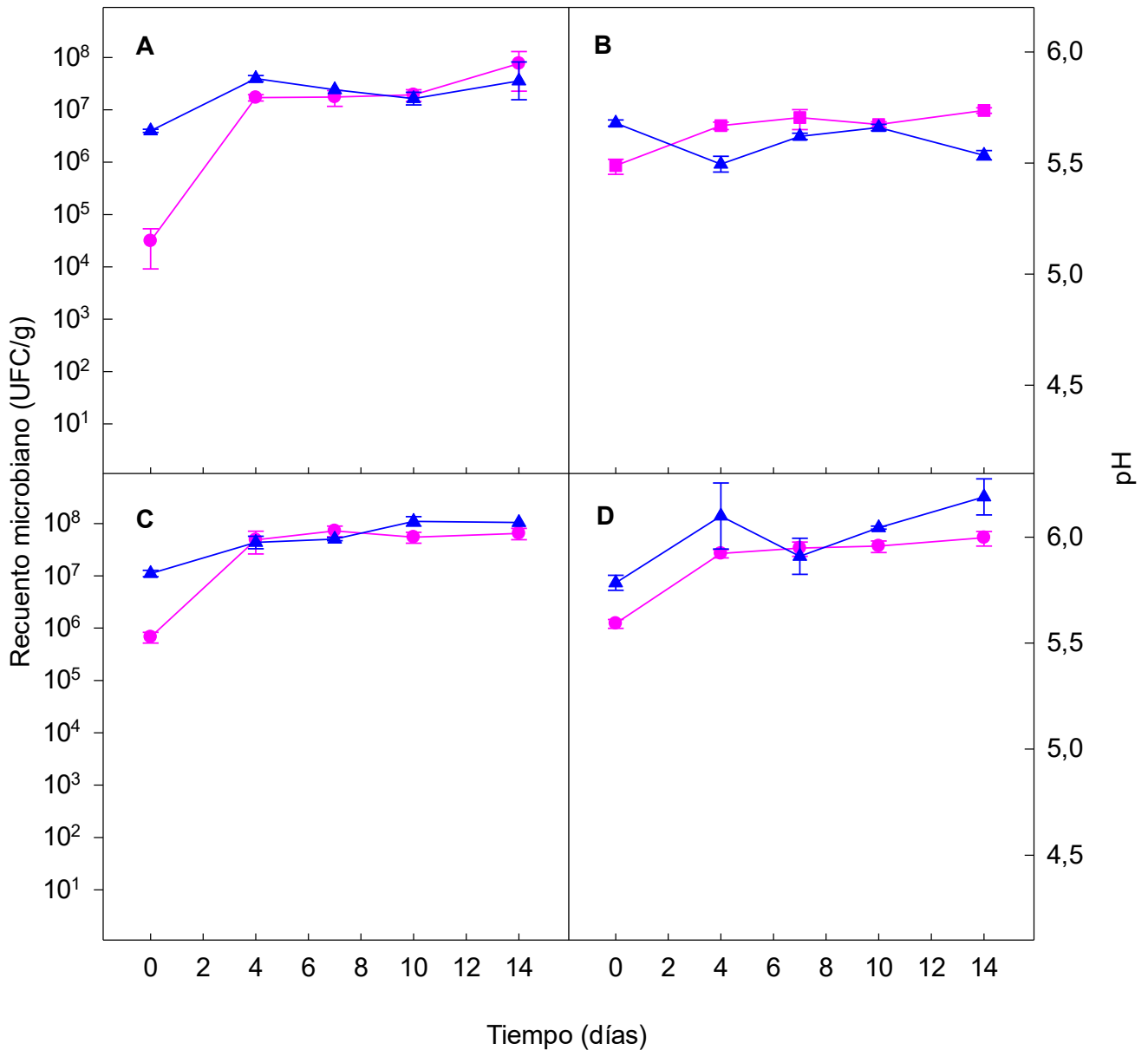
IV.4. Capacidad antifúngica en maíz molido en condiciones de minisilo

Debido a que el comportamiento de las levaduras cambia de acuerdo a las condiciones del cultivo y factores ambientales (actividad acuosa, pH, temperatura, aireación, etc.), es importante ensayar la capacidad antifúngica en la matriz en la que se van a aplicar. Se han observado levaduras con efecto antifúngico muy marcado en placas de Petri, pero que disminuía significativamente o se anulaba al aplicarse a una matriz (Fiori et al., 2014; Piasecka-Jozwiak & Chablowska, 2017). En este trabajo, la capacidad antifúngica de los aislamientos aplicados al maíz fue evaluada en minisilos, los cuales consisten generalmente en recipientes pequeños cerrados y limitados en oxígeno, en donde se coloca la matriz a estudiar. Para nuestros ensayos los minisilos consistieron en tubos de plástico de 15 ml rellenos de maíz molido inoculado, tapados y con un orificio pequeño para simular una entrada limitada de oxígeno de acuerdo a Gonda et al. (2019). La técnica de minisilos ha sido ampliamente utilizada para estudiar efectos sobre granos a escala de laboratorio (incluyendo los estudios de biocontrol) ya que son de bajo costo y permiten evaluar respuestas en tiempos más acotados (Gonda et al., 2019; Olstorpe et al., 2012; Petersson & Schnurer, 1995; Sariçiçek et al., 2016). La capacidad antifúngica de los aislamientos fue determinada evaluando el crecimiento de *A. flavus* por métodos convencionales (recuento en placa) y moleculares (qPCR). Entre ambas metodologías, qPCR se destaca por su confiabilidad, sensibilidad y especificidad para la cuantificación de hongos y sus esporas (Arquiza & Hunter, 2014).

IV.4.1. Crecimiento de los aislamientos

Para el análisis de la capacidad antifúngica de los aislamientos contra *A. flavus* en maíz molido en minisilos, se emplearon cuatro aislamientos, uno por cada especie de los ocho aislamientos seleccionados previamente (aislamientos Gc 30, Pm 9A, Pk 20 y Sc 9B). Tanto los aislamientos como *A. flavus* fueron inoculados en los minisilos individualmente para constatar su crecimiento y las variaciones de pH a distintos intervalos de tiempo, previo a los enfrentamientos (procediendo como se detalla en el ítem III.6.1).

Como se observa en la figura 35 los aislamientos fueron capaces de crecer y mantener la viabilidad en el maíz bajo las condiciones del ensayo durante los 14 días de incubación, detectándose el máximo crecimiento al día 4. En los sucesivos días hasta la finalización del ensayo los recuentos se mantuvieron aproximadamente constantes. En cuanto al pH, en ninguno de los casos se registró un cambio muy marcado, siendo la máxima variación de 0,4 unidades de pH para Pk 20.



En cuanto *A. flavus*, su crecimiento exponencial duró hasta el día 7, llegando a un recuento máximo del orden de 10^7 UFC/g que se mantuvo hasta el día 14. La medición de pH mostró un marcado descenso durante el crecimiento del hongo (Figura 36).

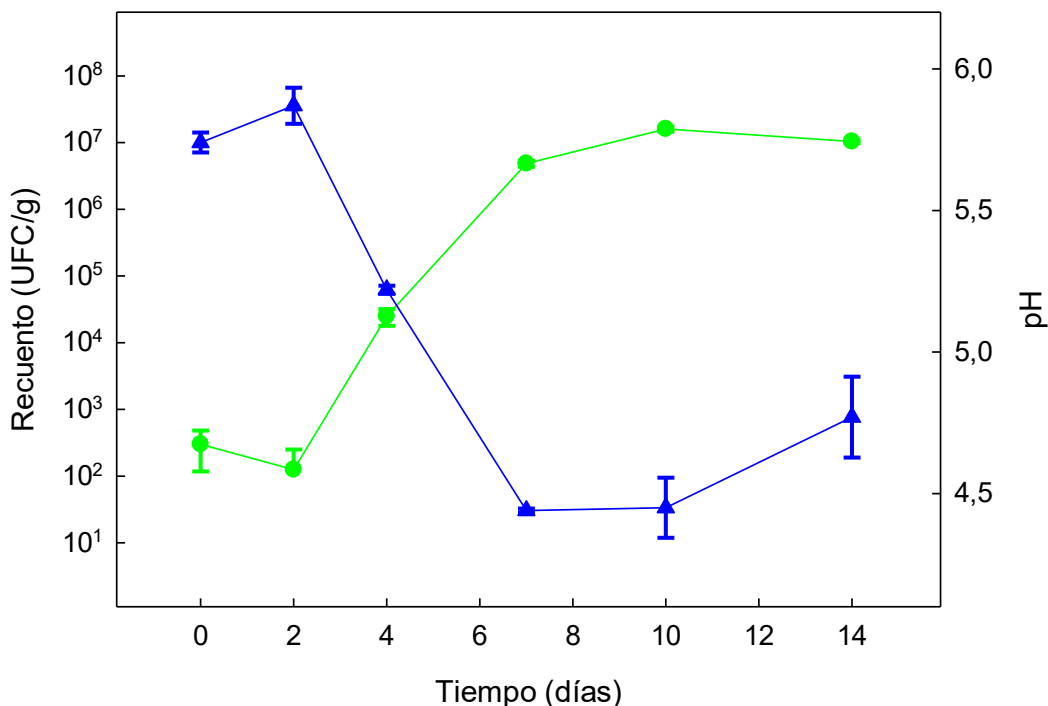


Figura 36: Curva de crecimiento y pH de *Aspergillus flavus* en condiciones de minisilo.
● *A. flavus*; ▲ pH.

IV.4.2. Enfrentamientos de los aislamientos contra *Aspergillus flavus*

Al enfrentar *A. flavus* con los aislamientos, se observó un efecto inhibitorio dada la disminución en el crecimiento con respecto al control. La mayor inhibición se detectó con los aislamientos Gc 30 y Sc 9B, siendo máxima al día 4 de acuerdo a la diferencia entre los recuentos. Las curvas de crecimiento de los aislamientos tuvieron ligeras diferencias en relación a sus respectivos controles, observándose leves disminuciones para Gc 30 y Pm 9A (Figura 37). En paralelo al crecimiento microbiano, se registró un cambio de pH en todos los casos (variación entre 0,9 y 1,2 unidades de pH), el cual puede relacionarse con el crecimiento de *A. flavus* considerando los resultados obtenidos en los controles.

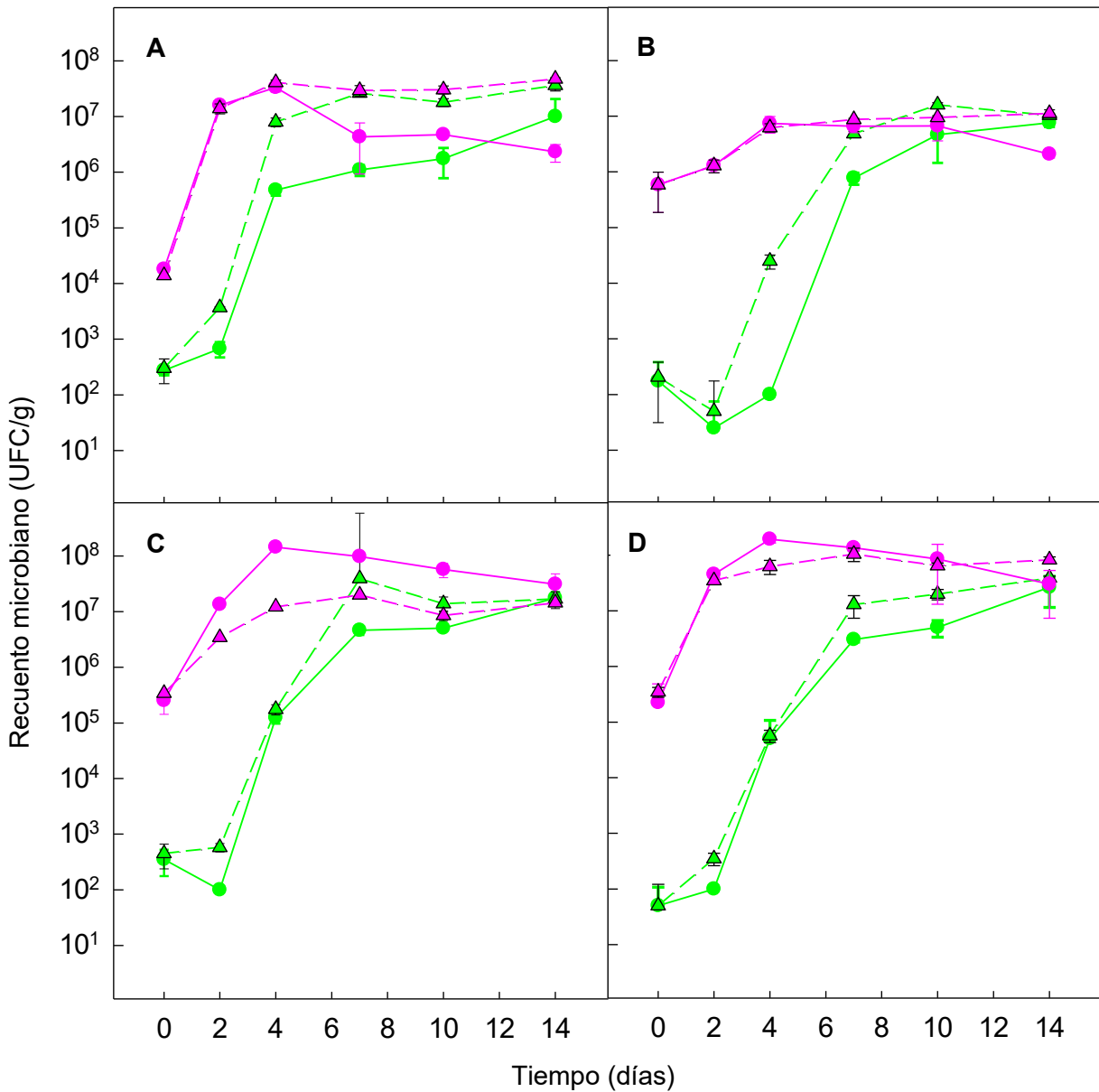


Figura 37: Curvas de crecimiento microbiano de enfrentamientos en minisilos. A. *flavus* frente a los aislamientos A: Gc 30; B: Sc 9B; C: Pm 9A; D: Pk 20. ● *A. flavus* en el enfrentamiento; ▲ *A. flavus* en el control; ● levadura en el enfrentamiento; ▲ levadura en el control.

A partir de los resultados obtenidos, se seleccionaron para los posteriores ensayos en minisilos, los aislamientos Gc 30 y Sc 9B por sus inhibiciones fúngicas significativas.

Como el aislamiento Gc 30 fue uno de los que presentó el mayor valor de porcentaje de reducción de conidios, lo cual podría indicar presencia de metabolitos antifúngicos liberados al medio (como fue discutido en IV.2.1), se probó agregar al maíz el aislamiento Gc 30 junto con su sobrenadante de fermentación.

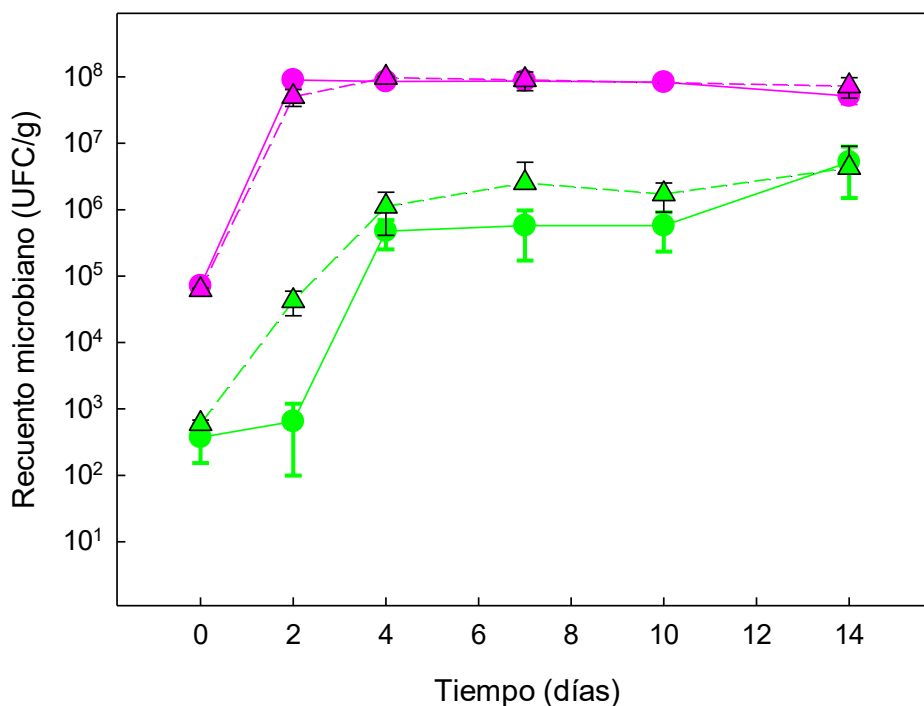


Figura 38: Curvas de crecimiento en minisilos del aislamiento Gc 30 con su sobrenadante frente a *Aspergillus flavus*. —▲— *A. flavus* en el control; —●— *A. flavus* en el enfrentamiento; —▲— Gc 30 en el control; —●— Gc 30 en el enfrentamiento.

De acuerdo a los datos obtenidos (Figura 38), no se produjo un efecto inhibitorio adicional hacia *A. flavus* que justifique añadir el sobrenadante.

A fin de determinar el efecto de la concentración empleada de levadura, se realizaron ensayos de minisilos variando la concentración de los inóculos de los aislamientos Gc 30 y Sc 9B (sin sus sobrenadantes). Las muestras fueron tomadas en el día de mayor inhibición (día 4) y en el de finalización del ensayo (día 14). Las concentraciones se ajustaron de acuerdo a los recuentos máximos obtenidos para cada especie en caldo MEA con 48 h de incubación y a partir de ellos se realizaron tres diluciones sucesivas.

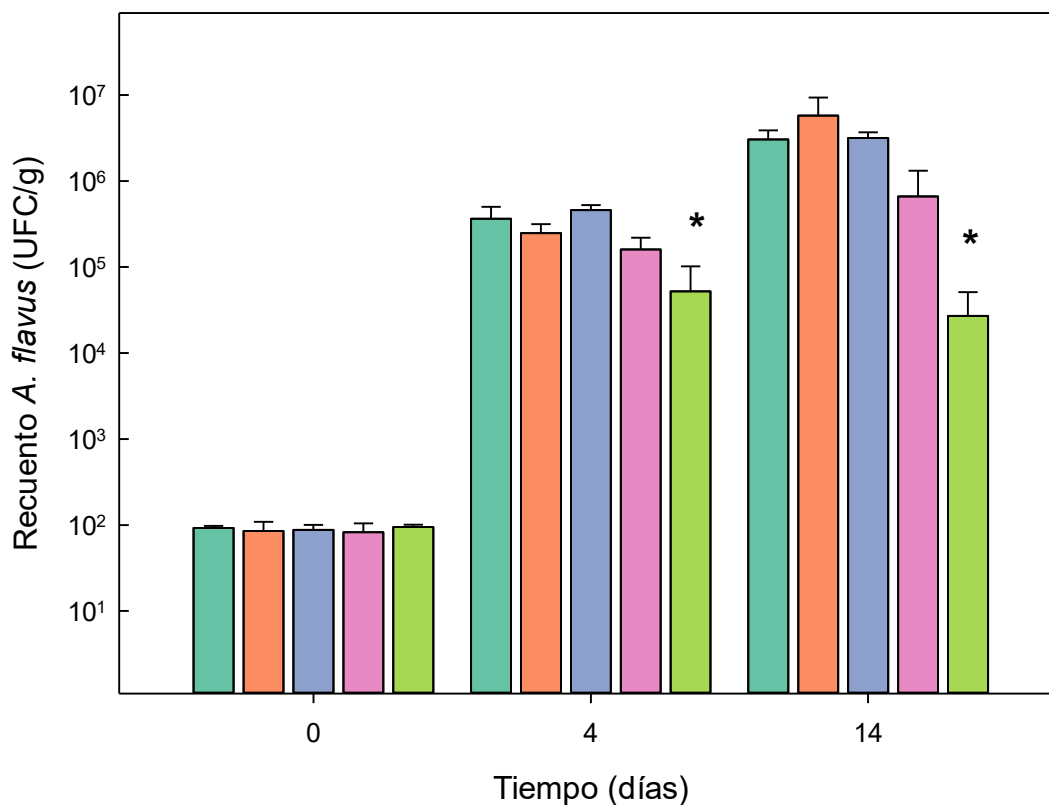


Figura 39: Crecimiento de *Aspergillus flavus* en minisilo frente al aislamiento Gc 30 a distintas concentraciones. — Control *A. flavus*; — 10¹ UFC/g; — 10² UFC/g; — 10³ UFC/g; — 10⁴ UFC/g. (*) diferencias significativas con el control determinadas por Kruskal-Wallis y el test de Dunnett $p < 0,05$.

Las concentraciones máximas obtenidas para los inóculos de *G. candidum* fueron del orden 10⁵ UFC/ml, por lo que para estos ensayos las concentraciones iniciales en el maíz molido fueron 10-10⁴ UFC/g. Al día 14 estas concentraciones se encontraron en el orden de 10³-10⁷ UFC/g. Para las concentraciones iniciales más bajas (10, 10² y 10³ UFC/g) no se observaron diferencias significativas en el crecimiento de *A. flavus* con respecto al control, mientras que para la concentración inicial más alta (10⁴ UFC/g), se obtuvo una diferencia significativa con el control para los días 4 y 14 (Figura 39). Cabe destacar que en este último caso, el recuento final de la levadura fue del orden de 10⁷ UFC/g.

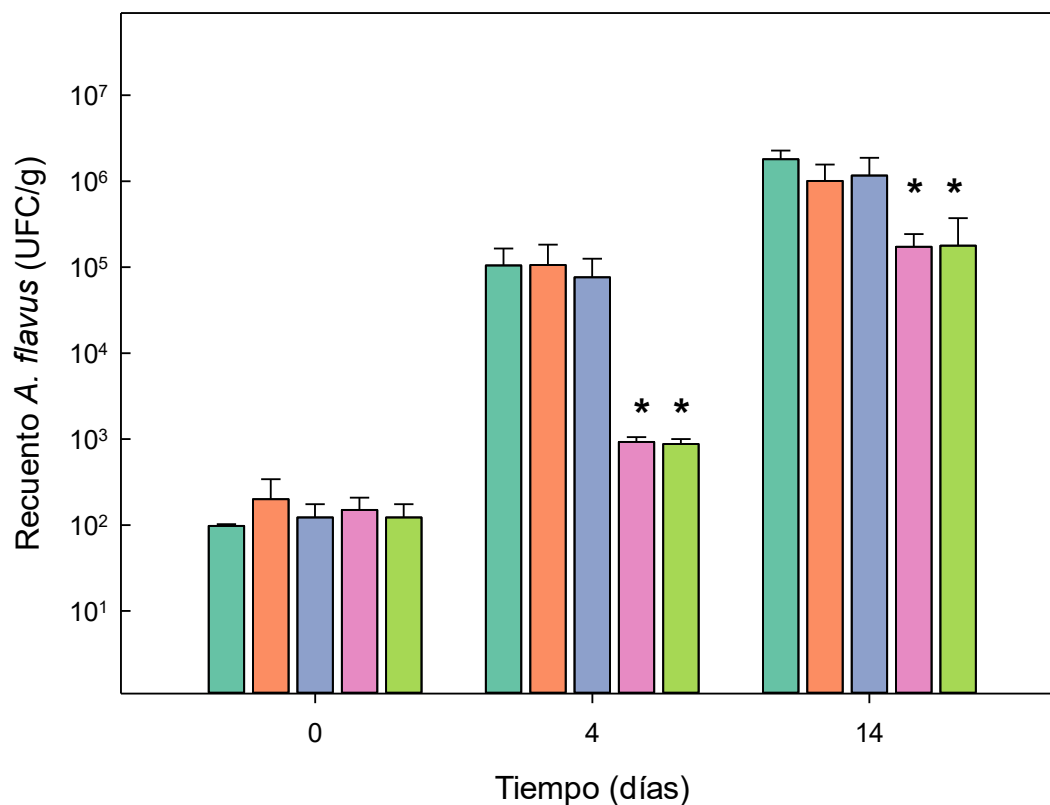


Figura 40: Crecimiento de *Aspergillus flavus* en minisilo frente al aislamiento Sc 9B a distintas concentraciones. ■ Control *A. flavus*; ■ 10³ UFC/g; ■ 10⁴ UFC/g; ■ 10⁵ UFC/g; ■ 10⁶ UFC/g. (*) diferencias significativas con el control determinadas por Kruskal-Wallis y el test de Dunnett $p < 0,05$.

En el caso de Sc 9B las concentraciones iniciales logradas estuvieron en el rango del orden de 10³ a 10⁶ UFC/g. Los resultados son similares a los obtenidos para el aislamiento anterior, en cuanto a que para las dos concentraciones menores (10³ y 10⁴ UFC/g) no hubo diferencias significativas en el recuento de *A. flavus* con el control, mientras que para las dos más altas (10⁵ y 10⁶ UFC/g) hubo una marcada diferencia, siendo máxima al día 4 (Figura 40). A partir de este momento el recuento de la levadura se mantuvo en el orden de 10⁷-10⁸ UFC/g hasta el final del ensayo.

Piasecka-Jozwiak et al. (2017) analizaron el efecto antifúngico a diferentes concentraciones de levaduras (*Candida* spp.) en el rango de 10³ a 10⁷ UFC/ml *in vitro*, y registraron que a partir de la concentración más baja ya había un efecto inhibitorio, pero el máximo efecto contra las especies *Aspergillus* sp. y *Fusarium* spp. ocurría en las concentraciones de 10⁶ y 10⁷ UFC/ml. Sin embargo, el efecto no sólo dependía de la

concentración de la levadura sino también de las especies de levaduras y hongos ensayadas. Similares resultados fueron encontrados por Petersson et al. (1995) cuando analizaron el efecto antifúngico de aislamientos de levaduras para biocontrol contra *Penicillium roquefortii*, el cual variaba de acuerdo a la especie, su concentración y si era estudiado en placas de Petri o en trigo húmedo (21 % humedad) en minisilo.

IV.4.3. Efecto antifúngico del kefir de agua en relación a los aislamientos

Adicionalmente al estudio del efecto antifúngico de los aislamientos individuales, se analizó la actividad del kefir de agua CMUNLP 1 entero (sobrenadante con los microorganismos presentes) agregado al maíz en la misma relación que los aislamientos en los ensayos anteriores (ver III.6.1). Existen antecedentes sobre el efecto inhibitor del kefir de agua seleccionado, siendo la inhibición ejercida por el kefir entero (sobrenadante y microorganismos) y no así por el sobrenadante libre de células (Gonda et al., 2019; León Peláez et al., datos no publicados).

IV.4.3.1. Determinación del crecimiento fúngico por recuento en placa

Los resultados de la determinación del crecimiento de *A. flavus* durante el enfrentamiento por medio de recuento en placa de Petri, se observan en la siguiente figura:

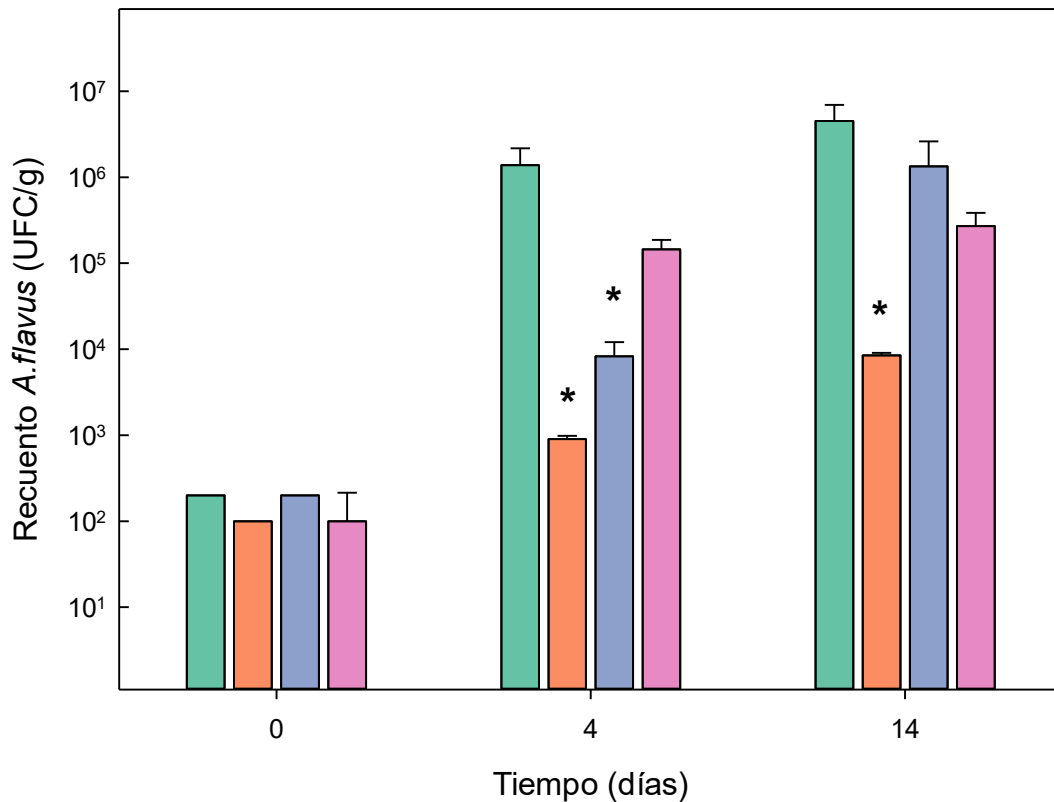


Figura 41: Crecimiento de *Aspergillus flavus* en enfrentamientos en minisilos. ■ Control *A. flavus*; ■ KA; ■ Sc 9B; ■ Gc 30. (*) diferencias significativas con el control determinadas por Kruskal-Wallis y el test de Dunnett $p < 0,05$.

Se observó que el efecto inhibitor del kefir de agua contra *A. flavus* era mayor que el generado por los aislamientos Gc 30 y Sc 9B en ambos días de incubación (4 y 14). La mayor inhibición se obtuvo al día 4, comportamiento que también presentó Sc 9B (Figura 41). Para ambos días de incubación, el recuento de las levaduras del tratamiento con KA fue del mismo orden que su respectivo control y que del tratamiento con Sc 9B. Al tratarse del kefir entero también se cuantificaron las bacterias ácido lácticas, las cuales tuvieron un recuento inicial de 10^7 UFC/g y para el día 4 aumentaron a 10^8 UFC/g (en el enfrentamiento y su control), valor que se mantuvo constante hasta el día 14 (Figura 42).

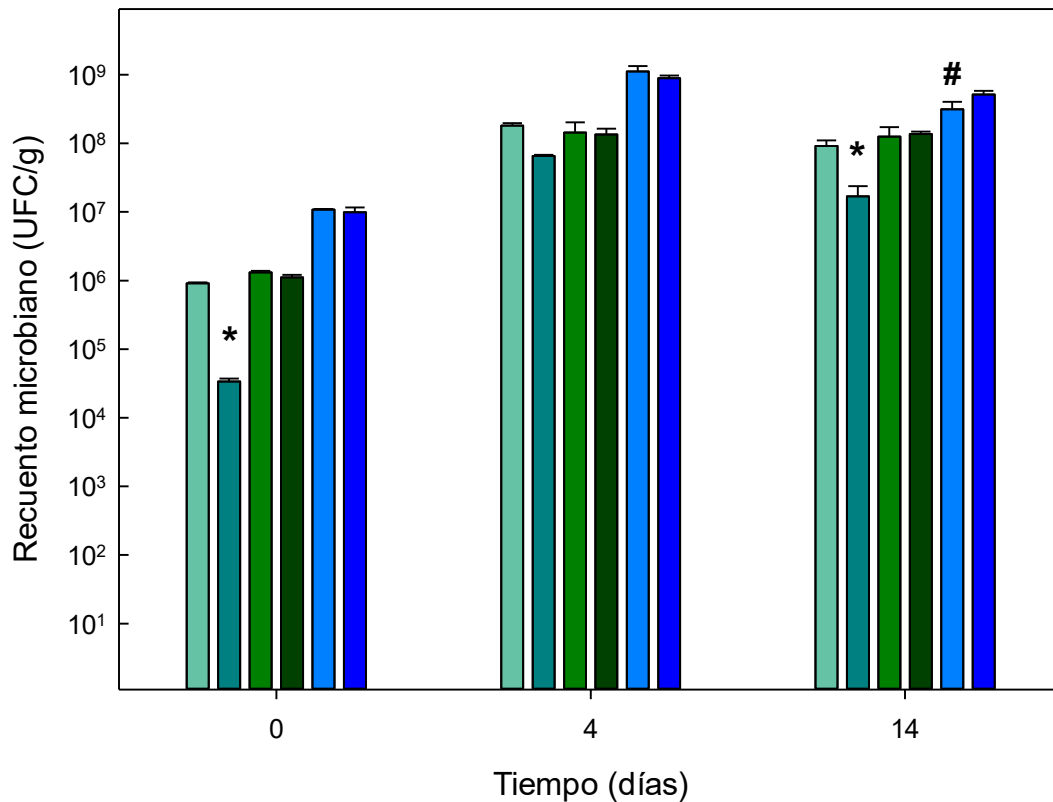


Figura 42: Crecimiento de levaduras y BAL en enfrentamientos en minisilos. ■ Sc 9B; ■ Gc 30; ■ levaduras totales KA; ■ levaduras totales control KA; ■ BAL KA; ■ BAL Control KA. (#) (*) diferencias significativas con el control correspondiente determinadas por t-Student y Kruskal-Wallis con el test de Dunnett $p < 0,05$, respectivamente.

A continuación, se realizó el mismo ensayo modificando la relación entre el kefir de agua entero adicionado y el maíz molido, la cual se aumentó a 1:1. En este caso se agregó un paso de secado en estufa a 60 °C durante 7 h antes de la inoculación de *A. flavus*, para llegar a la humedad deseada en el rango de 20-25 %. El paso de secado no generó un cambio significativo en los recuentos de BAL y levaduras del kefir, los cuales se encontraban en el orden de 10⁷ y 10⁶ UFC/g respectivamente. Las muestras tomadas al día 4, presentaron recuentos de *A. flavus* del orden 10⁶ UFC/g para el control y <10³ UFC/g para el enfrentamiento con kefir. El crecimiento de *A. flavus* en las muestras también fue evaluado por qPCR (detallado en el siguiente ítem, IV.4.3.2).

En todos los ensayos realizados se midió la humedad de las muestras por secado en estufa (como se detalla en III.6.1.3) para asegurarse que estuviera en el rango 20-25 %.

IV.4.3.2. Determinación de la biomasa fúngica por qPCR

A las muestras de los minisilos se les determinó la biomasa fúngica por medio de qPCR utilizando los primers *omt* que amplifican el gen que codifica para la O-metiltransferasa (*omt-A*), una enzima involucrada en la biosíntesis de aflatoxina B1 en *A. flavus* (Shweta et al., 2013). Para la determinación del rango dinámico se realizó una curva de calibración (Figura 43), utilizando un rango de concentraciones entre 6,81 y 0,00681 ng ADN *A. flavus*/μl. Se descartó una amplificación inespecífica no deseada por medio de las curvas de melting que presentaron un solo pico a 86 °C.

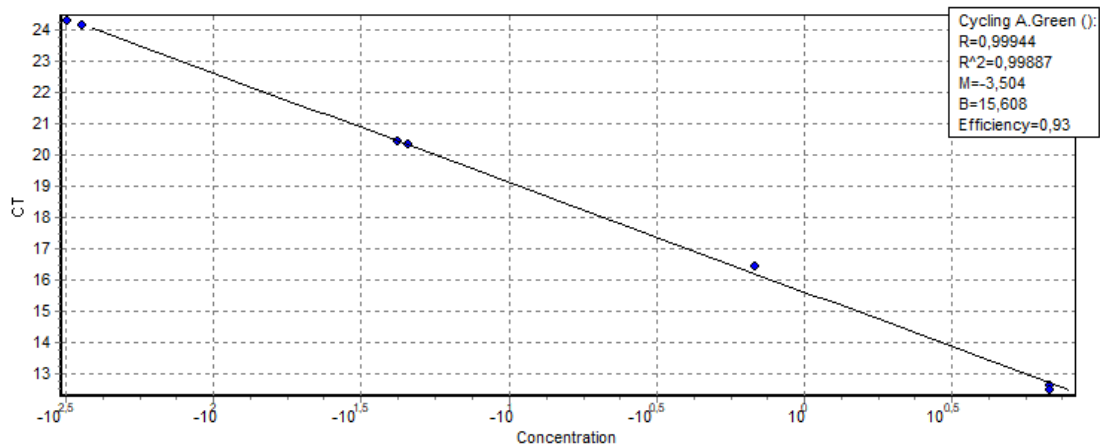


Figura 43: Determinación del rango dinámico. Curva estándar entre Ct y concentración de ADN de *Aspergillus flavus*. Ct: ciclo umbral (“threshold cycle”).

Por otro lado, se determinó el efecto matriz (maíz molido) agregando a diferentes diluciones de la matriz una cantidad conocida de ADN de *A. flavus* y cuantificándolo por qPCR para detectar posibles diferencias con respecto al control (cantidad conocida agregada en agua). Las diluciones de la matriz ensayadas fueron la directa, 1/2, 1/5, 1/10 y 1/15, a partir de la dilución 1/5 no se presentó efecto matriz (Tabla 24), por lo que fue la dilución elegida para el análisis.

Tabla 24: Determinación del efecto matriz

Dilución de la matriz	Ct
Matriz directa	20,21*
Matriz 1/2	20,04*
Matriz 1/5	19,35
Matriz 1/10	19,37
Matriz 1/15	19,32
Control <i>A. flavus</i>	19,31

(*) diferencias significativas respecto al control (en agua, sin matriz) determinadas por ANOVA y Dunnett $p < 0,05$.
Ct: ciclo umbral (“threshold cycle”).

En la extracción del ADN de las muestras de maíz se incorporó un paso de liofilización por 48 h y una posterior molienda, para disminuir las desviaciones que se obtenían al realizar la extracción directamente del maíz.

Al cuantificar el ADN de las muestras de minisilo diluidas 1/5, se observó que para los tratamientos de KA en las curvas de melting aparecían dos picos. El primer pico tuvo una temperatura de melting (T_m) de 81 °C y el segundo de 86,5 °C; la T_m del fragmento deseado fue de 86 °C (Figura 44). Estos picos no fueron observados en las muestras de los controles y los tratamientos con los aislamientos individuales, en donde sólo se detectó el pico a los 86 °C.

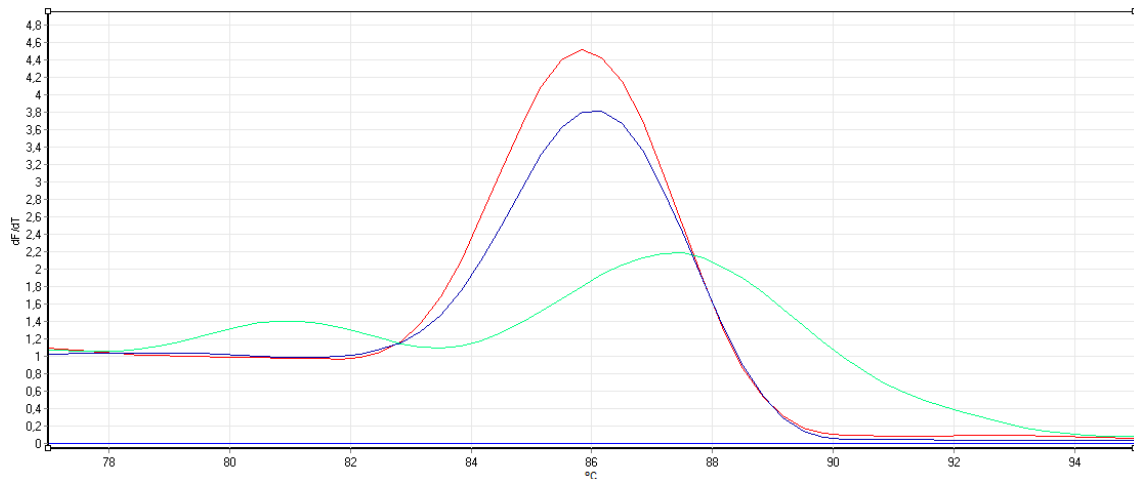


Figura 44: Curvas de melting. Punto del rango dinámico 6,81 ng ADN/ μ l (—); muestra control de *A. flavus* (—); muestra con KA adicionado (—).

Se incorporó un paso (5 s a 81 °C, antes de la detección de la fluorescencia) para la eliminación del primer pico, el cual no resultó efectivo. Asimismo, se realizaron corridas de las amplificaciones en un gel de agarosa al 1,5 % p/v, obteniéndose bandas nítidas para los controles de *A. flavus* y ninguna banda para las muestras de KA (Figura 45), lo que indicaría que en las muestras no se amplificó el fragmento del hongo.

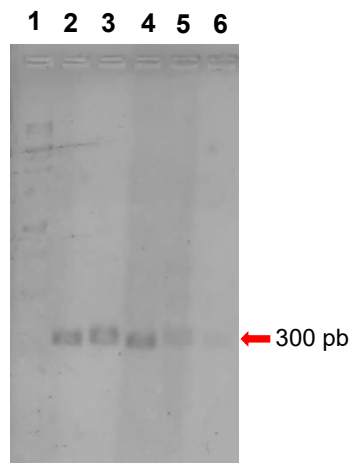


Figura 45: Amplificados de qPCR en gel de agarosa al 1,5 % p/v. Calle 1: Marcador de peso molecular de 1 kb; 2: primer punto del rango dinámico, 3 y 4: duplicados control de *A. flavus*; 5 y 6: duplicados muestras con KA adicionado.

Adicionalmente, se evaluó la fluorescencia agregando a las muestras de KA cantidades conocidas de *A. flavus*, utilizando las mismas concentraciones que en el rango dinámico (6,81-0,00681 ng/ μ l ADN). Se observó que a concentraciones elevadas del hongo sólo se obtenía un pico en la curva de melting y a concentraciones pequeñas (0,00681 ng/ μ l ADN) se evidenciaban los dos picos descritos anteriormente, siendo el segundo el correspondiente a *A. flavus* (Figura 46).

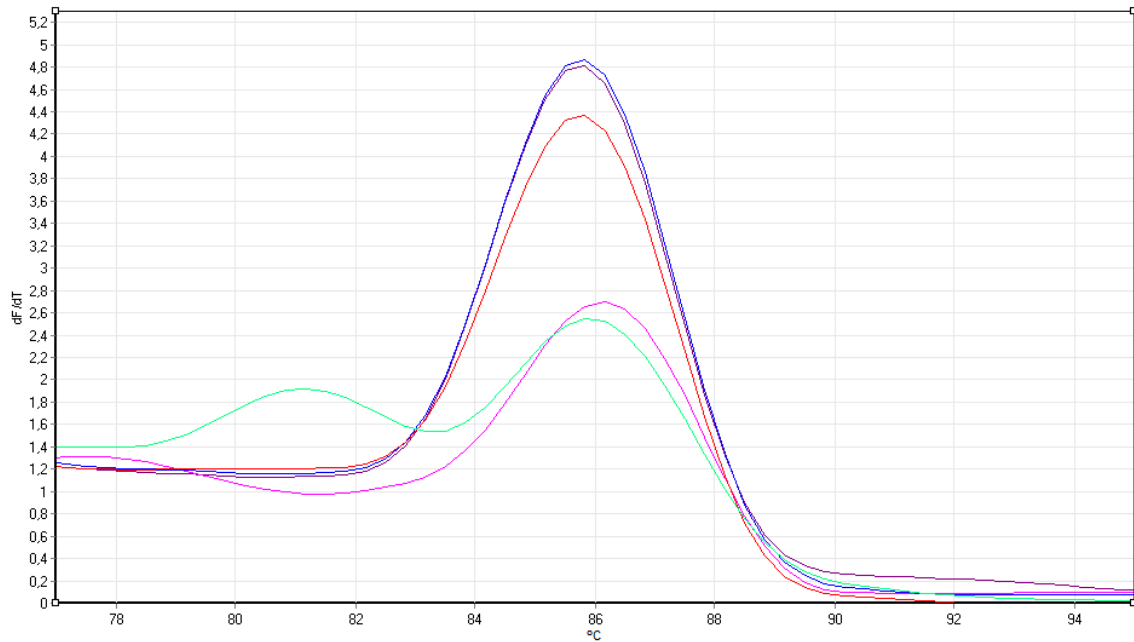


Figura 46: Curvas de melting para muestras de KA con cantidades conocidas de *Aspergillus flavus*. (—) punto del rango dinámico 0,681 ng ADN/ μ l; (—) punto del rango dinámico 0,00681 ng ADN/ μ l; (—) muestra con KA adicionado y 0,681 ng ADN/ μ l; (—) muestra con KA adicionado y 0,0681 ng ADN/ μ l; (—) muestra con KA adicionado y 0,00681 ng ADN/ μ l.

La cuantificación del ADN de los tratamientos se presenta en la siguiente figura, expresados en ng ADN por gramo de muestra liofilizada:

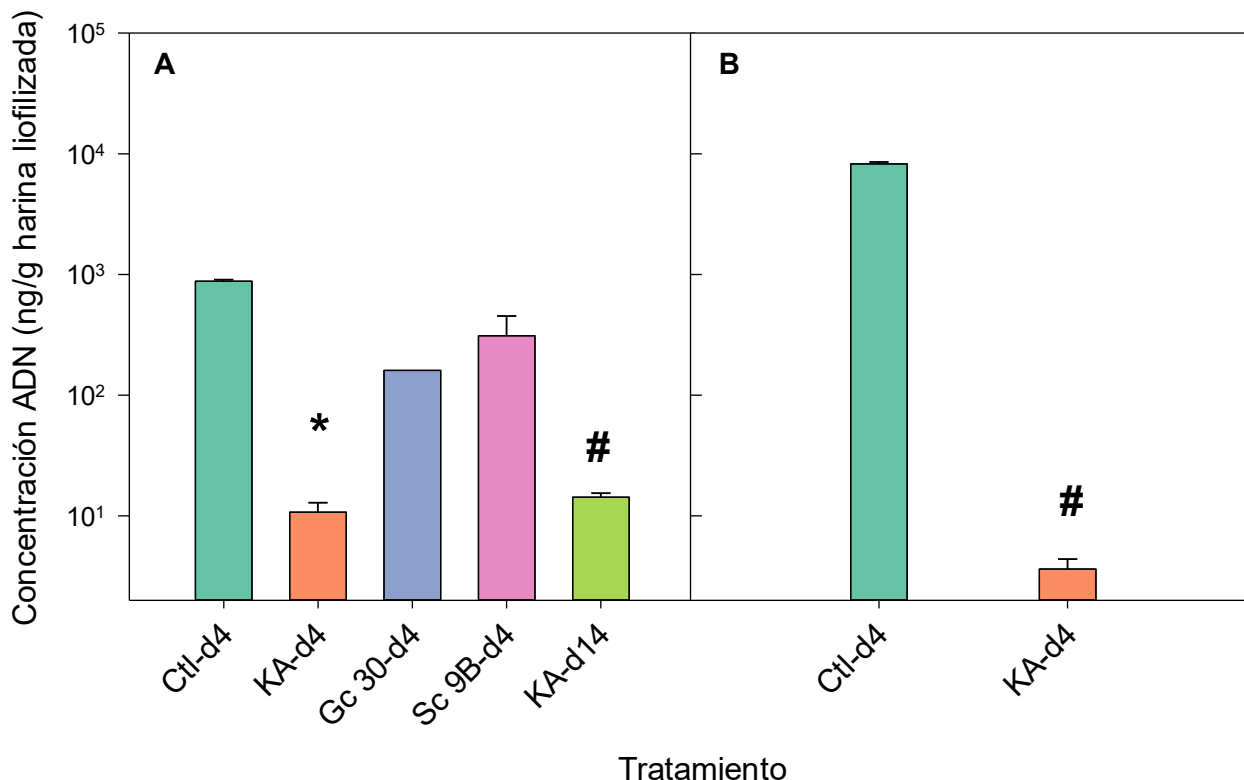


Figura 47: Concentración de ADN de *Aspergillus flavus* en los enfrentamientos en minisilo. A: los aislamientos y KA adicionados en la relación 1:6, B: KA adicionado en la relación 1:1. (#) (*) diferencias significativas con el control correspondiente determinadas por A: Kruskal-Wallis con el test de Dunn $p < 0,05$ y B: el test t de Welch $p < 0,05$.

En la figura 47 se observa que la concentración de ADN en las muestras de KA fue considerablemente menor que en los controles de *A. flavus*. La adición del KA en una relación 1:6 generó una disminución del crecimiento de *A. flavus* de dos órdenes de magnitud en comparación al control para el día 4. Al día 14 el efecto seguía siendo significativo en relación al control. El efecto inhibitorio del KA fue mayor que el obtenido para Gc 30 y Sc 9B en las mismas condiciones, de hecho para este ensayo no se obtuvieron diferencias significativas para estos tratamientos respecto al control. En la relación 1:1 el efecto inhibitorio se hizo más marcado, con una diferencia al día 4 de tres órdenes de magnitud entre la concentración de ADN del KA y del control. Al día 14 el efecto inhibitorio se mantuvo. Los resultados obtenidos por qPCR correlacionaron con los obtenidos por recuento en placa para KA y Gc 30, mientras que para Sc 9B por qPCR no se vieron diferencias significativas con el control y por recuento en placa sí. La correlación entre metodologías ya había sido reportada para hongos micotoxigénicos en

diferentes matrices alimentarias, lo que corrobora la capacidad de la técnica de qPCR utilizando los primers omt para la cuantificación de *A. flavus* en maíz (Rodríguez et al., 2012).

El comportamiento antifúngico del KA CMUNLP 1 ya ha sido reportado en sorgo molido húmedo (35 % humedad) en donde al adicionarse en una relación 1:1 se obtuvo una disminución de 100 veces en la biomasa de *A. flavus* comparado con el control al séptimo día de incubación (determinado por qPCR). Este efecto inhibitorio se lo atribuyeron a los microorganismos vivos del kefir y no a los metabolitos liberados al medio durante la fermentación del sustrato, ya que el sobrenadante libre de células no presentó diferencias con el control (Gonda et al., 2019). De igual manera, se observó una marcada disminución en el crecimiento de *A. flavus* en alimento de pollos adicionado con KA CMUNLP 1 (1:1), en donde la concentración del ADN fúngico disminuyó entre 10 y 100 veces en los días 5 y 10, en comparación con el control (León Peláez, A. datos sin publicar).

El kefir de agua además de presentar una variada composición de levaduras dentro de su consorcio, contiene BAL que son ampliamente reconocidas por su capacidad antifúngica y utilizadas en el almacenamiento de granos por ensilado. Su capacidad antifúngica en el ensilado se debe principalmente al rápido descenso del pH, aunque se han reportado otros metabolitos responsables (Kim et al., 2021; Muck et al., 2018; Sadiq et al., 2019). El uso de un consorcio que contenga tanto levaduras como BAL con capacidad antifúngica, sería muy beneficioso ya que combinaría el efecto de ambos (Gonda et al., 2019). Sin embargo, la principal desventaja de este tipo de inóculo radica en la variabilidad propia de un consorcio.

IV.4.3.3. Efecto sobre la producción de aflatoxinas

Se determinó la presencia de aflatoxinas B1, B2, G1 y G2 en las muestras de maíz adicionado con KA y los aislamientos Gc 30 y Sc 9B en la misma proporción (1:6).

Tabla 25: Contenido de aflatoxinas medido por HPLC-FLD en el enfrentamiento en maíz de *A. flavus* frente al KA y los aislamientos Gc 30 y Sc 9B

Día	Aflatoxinas*	Gc 30	Sc 9B	KA	Control <i>A. flavus</i>
		(ng/g maíz)			
4	B1	14,38±0,81 ^b	ND	ND	232,10±7,80 ^a
	B2	1,98±0,06 ^b	ND	ND	19,05±2,56 ^a
14	B1	48,38±17,13 ^b	40,92±25,18 ^b	**	392,83±26,60 ^a
	B2	6,32±1,37 ^b	3,57±1,40 ^b	**	63,88±2,58 ^a

Letras diferentes (por fila) indican diferencias significativas, determinadas por t-Student para el día 4 y ANOVA para el día 14, y LSD $p < 0,05$. Los aislamientos (Gc 30, Sc 9B) y KA fueron adicionados al maíz molido en una proporción 1:6. *Las aflatoxinas G1 y G2 no detectadas (ND) en el ensayo. **No se muestran los valores por presentar una alta dispersión

En las condiciones ensayadas, *A. flavus* produjo en el control aflatoxinas B1 y B2 en los días 4 y 14, encontrándose en ambos casos fuera de los límites regulatorios establecidos (20 ng/g para AF totales y 5 ng/g para AFB1). En ninguno de los casos se observó la producción de las aflatoxinas G1 y G2. Al día 4 el aislamiento Sc 9B y KA fueron capaces de inhibir la producción de AFB1 y AFB2 a niveles no detectables, mientras que Gc 30 inhibió la producción en relación al control en más de un 89 % para ambas micotoxinas, pero el valor detectado de AFB1 fue superior al aceptable para un producto comercial. La inhibición por parte de KA se produjo de manera simultánea con la disminución marcada del crecimiento fúngico al día 4, detectado por recuento en placa y qPCR (Fig. 41 y 47A, respectivamente). Al día 14, en el enfrentamiento con ambos aislamientos de levaduras, se detectaron ambas aflatoxinas, las cuales fueron considerablemente menores al control obteniéndose porcentajes de reducción entre 84 y 96 %. Natarajan et al. (2022) observaron un comportamiento similar para *A. flavus* expuesto a VOC de *S. cerevisiae*, en donde el porcentaje de reducción de AFB1 disminuían al día 14 en comparación con el día 7 (Natarajan et al., 2022). El enfrentamiento con KA al día 14 no se muestra en la tabla debido a su alta dispersión. La reducción en la producción de aflatoxinas por parte del kefir ha sido detectada por otros autores, obteniéndose valores inferiores a 2 ppb o no detectables en tiempos de incubación entre 7 y 14 días (Taheur et al., 2020; León Peláez, A. datos sin publicar).

En diversos estudios en donde se documenta el efecto inhibitorio de levaduras y BAL sobre la producción de micotoxinas, sin embargo también existen casos en donde el hongo micotoxigénico al encontrarse estresado incrementa la producción de las mismas (Dikmetas et al., 2023; Dogi et al., 2013; Medina, Mohale, et al., 2017; Mwakinyali et al., 2019). Dentro de los factores abióticos que pueden afectar su producción, se encuentra la generación de dióxido de carbono y el consumo de oxígeno, fenómeno que puede ser potenciado por el agregado de microorganismos (Pettersson & Schnurer, 1995). Se ha indicado que valores mayores a 30 % de CO₂ inhiben totalmente la producción de OTA por *A. ochraceus*, independientemente de la concentración de oxígeno (Paster et al., 1983). Mientras que Giorni et al (2008) reportaron que *A. flavus* en maíz húmedo era inhibido con 25 % de CO₂, pero que se requería por lo menos 50 % para inhibir la producción de aflatoxinas. La producción de micotoxinas es multifactorial y se ha indicado que la combinación de factores (concentraciones de CO₂, O₂, actividad acuosa, temperatura, pH, entre otras) presenta una mayor relevancia que los factores individuales (Gilbert et al., 2018; Magan & Medina, 2016). En la última década, se ha dirigido la investigación hacia el efecto sobre la expresión de los genes relacionados a su biosíntesis, encontrándose cambios debidos a los factores mencionados (Abdel-Hadi et al., 2012; Magan & Medina, 2016; Schmidt-Heydt et al., 2008). De la misma manera, se observó que el 2-feniletanol producido por *Pichia anomala* que inhibía la germinación de conidios y la producción de AFB1 de una cepa de *A. flavus*, reducía en unas 10000 veces la expresión de genes involucrados en la síntesis de aflatoxinas (*aflC*, *aflR*, *aflS*, *aflO* y *aflK*) (Hua et al., 2014). En un estudio posterior de los mismos autores, encontraron que un aislamiento de *Wickerhamomyces anomalus* en cocultivo con *A. flavus* generaba el mismo efecto sobre otros ocho genes relacionados a la síntesis de aflatoxinas (*aflR*, *aflJ*, *norA*, *omtA*, *omtB*, *pksA*, *vbs* y *ver-1*), además de reducir la expresión de los genes *brlA*, *abaA* y *wetA* relacionados con la formación de conidios (Hua et al., 2019). Asimismo, se ha observado que las BAL generan un efecto similar sobre estos genes (Ghanbari et al., 2018; Gomaa et al., 2018).

En el presente trabajo, el kefir de agua entero presentó mayor efecto antifúngico que las levaduras individuales estudiadas, sin embargo la variabilidad inherente de los consorcios de microorganismos debe ser considerado.

IV.4.4. Conclusiones

Los aislamientos bajo estudio fueron capaces de crecer y mantenerse viables en el maíz molido en las condiciones de minisilo. Por tanto, resultaron adecuados para la evaluación del efecto inhibitorio sobre *A. flavus* en minisilo.

Los cuatro aislamientos presentaron inhibiciones frente a *A. flavus*. En particular dos pertenecientes a *G. candidum* y *S. cerevisiae*, presentaron las mayores inhibiciones.

La capacidad antifúngica determinada para los aislamientos se relacionó con la concentración del inóculo, siendo las concentraciones mayores las que generaron las mayores inhibiciones de *A. flavus*.

Aplicados en las mismas condiciones al maíz molido se observó que el kefir de agua presentó una mayor capacidad inhibitoria en comparación con los aislamientos de *G. candidum* y *S. cerevisiae*.

Si bien qPCR es un método eficiente para el seguimiento de la inhibición de *A. flavus* en las condiciones de minisilo, el recuento en placa resultó un método más accesible y menos costoso que arrojó resultados comparables.

Se detectó un efecto sobre la producción de aflatoxinas en relación al control, el cual dependió del día de incubación. Al día 4 la inhibición de las aflatoxinas fue total para el kefir de agua y el aislamiento de *S. cerevisiae*. Al día 14 se detectaron AFB1 y AFB2 para los aislamientos, pero con una concentración significativamente menor que el control.

V. CONCLUSIONES GENERALES

La presente investigación permitió identificar a partir de gránulos de kefir de diferente origen, los géneros de levaduras *Geotrichum*, *Pichia*, *Saccharomyces* y *Candida*, de los cuales los primeros tres mostraron tener actividad antifúngica.

Los métodos empleados para la identificación polifásica de las levaduras, presentaron distinta complejidad de acuerdo a la especie en cuestión, siendo más compleja para la especie *G. candidum* por el alto polimorfismo intraespecífico.

A partir de los ensayos de reducción de la germinación de conidios, ensayos duales y determinación de volátiles en placas de Petri realizados, nos permitieron seleccionar los aislamientos con mayor capacidad inhibitoria contra *Aspergillus* spp. y *Fusarium graminearum*. A su vez se detectó *in vitro* que los aislamientos generaban una disminución en la producción de DON por parte de *F. graminearum* y presentaban capacidad de captura de AFB1.

Los aislamientos no presentaron en simultáneo los rasgos de virulencia estudiados, lo cual refuerza la selección de los mismos para su posible aplicación para biocontrol.

Los aislamientos al ser incorporados en maíz molido en minisilos frente a la contaminación fúngica ejercida por *Aspergillus flavus*, mantuvieron su viabilidad y ejercieron efecto antifúngico, el cual se correlacionó con la concentración de levadura inicial. Si bien el kefir de agua entero presentó un mayor efecto antifúngico, debe considerarse la variabilidad inherente a un consorcio de microorganismos puede complejizar su uso. Además, se detectó un efecto inhibitor sobre la producción de aflatoxinas de *A. flavus*, total frente al kefir de agua y *S. cerevisiae*, y elevado para *G. candidum* al día 4 de incubación.

VI. BIBLOGRAFÍA

- Abdel-Hadi, A., Schmidt-Heydt, M., Parra, R., Geisen, R., & Magan, N. (2012). A systems approach to model the relationship between aflatoxin gene cluster expression, environmental factors, growth and toxin production by *Aspergillus flavus*. *Journal of the Royal Society Interface*, 9(69), 757–767.
<https://doi.org/10.1098/rsif.2011.0482>
- Abdel-Kareem, M. M., Rasmey, A. M., & Zohri, A. A. (2019). The action mechanism and biocontrol potentiality of novel isolates of *Saccharomyces cerevisiae* against the aflatoxigenic *Aspergillus flavus*. *Letters in Applied Microbiology*, 68(2), 104–111. <https://doi.org/10.1111/lam.13105>
- Abdolshahi, A., Tabatabaie yazdi, F., Shabani, A. A., Mortazavi, S. A., & Marvdashti, L. M. (2018). Aflatoxin binding efficiency of *Saccharomyces cerevisiae* mannoprotein in contaminated pistachio nuts. *Food Control*, 87, 17–21.
<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.12.008>
- Agriopoulou, S., Stamatelopoulou, E., & Varzakas, T. (2020). Control Strategies : Prevention and Detoxification in Foods. *Foods*, 9, 137.
<https://doi.org/10.3390/foods9020137>
- Aguilera, P., Ruiz Tachiquín, M., Rocha Munive, M. G., Pineda Olvera, B., & Cháñez Cárdenas, M. E. (2014). PCR en tiempo real. Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos. *Ibt-Unam*.
- Akbari, P., Braber, S., Varasteh, S., Alizadeh, A., Garssen, J., & Fink-Gremmels, J. (2017). The intestinal barrier as an emerging target in the toxicological assessment of mycotoxins. *Archives of Toxicology*, 91(3), 1007–1029.
<https://doi.org/10.1007/s00204-016-1794-8>
- Al-Mohammadi, A. R., Ibrahim, R. A., Moustafa, A. H., Ismaiel, A. A., Abou Zeid, A., & Enan, G. (2021). Chemical constitution and antimicrobial activity of kefir fermented beverage. *Molecules*, 26(9). <https://doi.org/10.3390/molecules26092635>
- Alaniz Zanon, M. S., Bossa, M., Chiotta, M. L., Oddino, C., Giovanini, D., Cardoso, M. L., Bartosik, R. E., & Chulze, S. N. (2022). Pre-harvest strategy for reducing aflatoxin accumulation during storage of maize in Argentina. *International Journal of Food Microbiology*, 380, 109887.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2022.109887>
- Alassane-Kpembé, I., Schatzmayr, G., Taranu, I., Marin, D., Puel, O., & Oswald, I. P. (2017). Mycotoxins co-contamination: Methodological aspects and biological relevance of combined toxicity studies. *Critical Reviews in Food Science and*

- Nutrition*, 57(16), 3489–3507. <https://doi.org/10.1080/10408398.2016.1140632>
- Alper, I., Frenette, M., & Labrie, S. (2011). Ribosomal DNA polymorphisms in the yeast *Geotrichum candidum*. *Fungal Biology*, 115(12), 1259–1269. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2011.09.002>
- Alshannaq, A., & Yu, J.-H. (2017). Occurrence, Toxicity, and Analysis of Major Mycotoxins in Food. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 14(6), 632. <https://doi.org/10.3390/ijerph14060632>
- Ammor, S., Tauveron, G., Dufour, E., & Chevallier, I. (2006). Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility: 2—Behaviour of pathogenic and spoilage bacteria in dual species biofilms including a bacteriocin-like-producing lacti. *Food Control*, 17(6), 462–468. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2005.02.007>
- Ansari, F., Khodaiyan, F., Rezaei, K., & Rahmani, A. (2015). Modelling of aflatoxin G1 reduction by kefir grain using response surface methodology. *Journal of Environmental Health Science and Engineering*, 13(1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/s40201-015-0190-2>
- AOAC (1999). Moisture air oven method, drying at 130°C. Method 930.15. *Official Methods of Analysis*. AOAC International.
- Arbefeville, S., Harris, A., & Ferrieri, P. (2017). Comparison of sequencing the D2 region of the large subunit ribosomal RNA gene (MicroSEQ®) versus the internal transcribed spacer (ITS) regions using two public databases for identification of common and uncommon clinically relevant fungal species. *Journal of Microbiological Methods*, 140, 40–46. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2017.06.015>
- Arena, M., Russo, P., Spano, G., & Capozzi, V. (2019). Exploration of the Microbial Biodiversity Associated with North Apulian Sourdoughs and the Effect of the Increasing Number of Inoculated Lactic Acid Bacteria Strains on the Biocontrol against Fungal Spoilage. *Fermentation*, 5, 2–21. <https://doi.org/10.3390/fermentation5040097>
- Arias-agudelo, R. S., Valenzuela-paguay, N. A., Janery, S., Torres-gutiérrez, S., & Valencia-garcía, F. E. (2022). *Revisión sistemática : Efecto antimicrobiano y usos benéficos de gránulos de kefir de agua y de leche en el campo de la industria alimentaria, sector industrial y área de la salud*. Universidad de Antioquía. <https://hdl.handle.net/10495/32910>
- Armando, M., Dogi, C., Pizzolitto, R., Escobar, F., Peirano, M., Salvano, M., Sabini, L., Combina, M., Dalcerro, A., & Cavaglieri, L. (2011). *Saccharomyces cerevisiae* strains from animal environment with *in vitro* aflatoxin B1 binding ability and anti-pathogenic bacterial influence. *World Mycotoxin Journal*, 4(1), 59–68.

- <https://doi.org/10.3920/WMJ2010.1208>
- Armando, M. R., Dogi, C. A., Poloni, V., Rosa, C. A. R., Dalcerro, A. M., & Cavaglieri, L. R. (2013). *In vitro* study on the effect of *Saccharomyces cerevisiae* strains on growth and mycotoxin production by *Aspergillus carbonarius* and *Fusarium graminearum*. *International Journal of Food Microbiology*, 161(3), 182–188. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.11.016>
- Armando, M. R., Pizzolitto, R. P., Dogi, C. A., Cristofolini, A., Merkis, C., Poloni, V., Dalcerro, A. M., & Cavaglieri, L. R. (2012). Adsorption of ochratoxin A and zearalenone by potential probiotic *Saccharomyces cerevisiae* strains and its relation with cell wall thickness. *Journal of Applied Microbiology*, 113(2), 256–264. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05331.x>
- Arquiza, J. M. R. A., & Hunter, J. (2014). The use of real-time PCR to study *Penicillium chrysogenum* growth kinetics on solid food at different water activities. *International Journal of Food Microbiology*, 187, 50–56. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.06.002>
- Awad, W., Ghareeb, K., Böhm, J., & Zentek, J. (2010). Decontamination and detoxification strategies for the *Fusarium* mycotoxin deoxynivalenol in animal feed and the effectiveness of microbial biodegradation. *Food Additives & Contaminants. Part A, Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment*, 27, 510–520. <https://doi.org/10.1080/19440040903571747>
- Azi, F., Tu, C., Rasheed, H. A., & Dong, M. (2020). Comparative study of the phenolics, antioxidant and metagenomic composition of novel soy whey-based beverages produced using three different water kefir microbiota. *International Journal of Food Science and Technology*, 55(4), 1689–1697. <https://doi.org/10.1111/ijfs.14439>
- Bahati, P., Zeng, X., Uzizerimana, F., Tsoggerel, A., Awais, M., Qi, G., Cai, R., Yue, T., & Yuan, Y. (2021). Adsorption Mechanism of Patulin from Apple Juice by Inactivated Lactic Acid Bacteria Isolated from Kefir Grains. *Toxins*, 13(434), 1–18. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/toxins13070434>
- Basavaiah, R., Nagesh, M., Harishchandra Sripathy, M., & Vardhan Batra, H. (2019). *In vitro* Screening and Characterization of Kefir Yeast for Probiotic Attributes. *International Journal of Nutritional Science and Food Technology*, 5(1), 1–11. <http://biocoreopen.org/articles/In-Vitro-Screening-and-Characterization-of-Kefir-Yeast-for-Probiotic-Attributes.pdf>
- Battilani, P., Costa, L. G., Dossena, A., Gullino, M. L., Marchelli, R., Galaverna, G., Pietri, A., Dall'Asta, C., Giorni, P., Spadaro, D., & Gualla, A. (2009). Scientific information on mycotoxins and natural plant toxicants. *EFSA Supporting Publications*, 6(9), 24E. <https://doi.org/https://doi.org/10.2903/sp.efsa.2009.EN-24>

- Battilani, P., Toscano, P., Van der Fels-Klerx, H. J., Moretti, A., Camardo Leggieri, M., Brera, C., Rortais, A., Goumperis, T., & Robinson, T. (2016). Aflatoxin B1 contamination in maize in Europe increases due to climate change. *Scientific Reports*, 6(1), 24328. <https://doi.org/10.1038/srep24328>
- BCBA, Bolsa de Cereales de Buenos Aires (2021). Informe cierre de Campaña N°13 – Maíz 2020/2021. <https://www.bolsadecereales.com/imagenes/informes/2021-09/169-informecierremaiz202021.pdf>
- Bengoa, A. A., Iraporda, C., Garrote, G. L., & Abraham, A. G. (2019). Kefir microorganisms: their role in grain assembly and health properties of fermented milk. *Journal of Applied Microbiology*, 126(3), 686–700. <https://doi.org/10.1111/jam.14107>
- BLAST-NCBI, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
- Boekhout, T., Aime, M. C., Begerow, D., Gabaldón, T., Heitman, J., Kemler, M., Khayhan, K., Lachance, M. A., Louis, E. J., Sun, S., Vu, D., & Yurkov, A. (2021). The evolving species concepts used for yeasts: from phenotypes and genomes to speciation networks. *Fungal Diversity*, 109(1), 27–55. <https://doi.org/10.1007/s13225-021-00475-9>
- Boekhout, T., Amend, A. S., El Baidouri, F., Gabaldón, T., Geml, J., Mittelbach, M., Robert, V., Tan, C. S., Turchetti, B., Vu, D., Wang, Q. M., & Yurkov, A. (2022). Trends in yeast diversity discovery. En *Fungal Diversity*. Springer. <https://doi.org/10.1007/s13225-021-00494-6>
- Bogdan, C., Röllinghoff, M., & Diefenbach, A. (2000). Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. *Current Opinion in Immunology*, 12(1), 64–76. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0952-7915\(99\)00052-7](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0952-7915(99)00052-7)
- Bottazzi, V., & Bianchi, F. (1980). A Note on Scanning Electron Microscopy of Microorganisms associated with the Kefir Granule. *Journal of Applied Microbiology*, 48, 265–268. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1980.tb01225.x>
- Boutrou, R., & Guéguen, M. (2005). Interests in *Geotrichum candidum* for cheese technology. *International Journal of Food Microbiology*, 102(1), 1–20. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.12.028>
- Brunke, S., Mogavero, S., Kasper, L., & Hube, B. (2016). Virulence factors in fungal pathogens of man. *Current Opinion in Microbiology*, 32, 89–95. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2016.05.010>
- Bryden, W. L. (2012). Mycotoxin contamination of the feed supply chain: Implications for animal productivity and feed security. *Animal Feed Science and Technology*, 173(1), 134–158. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2011.12.014>

- Bueno, D. J., Casale, C. H., Pizzolitto, R. P., Salvano, M. A., & Oliver, G. (2007). Physical adsorption of aflatoxin B1 by lactic acid bacteria and *Saccharomyces cerevisiae*: A theoretical model. *Journal of Food Protection*, 70(9), 2148–2154. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-70.9.2148>
- Bueno, D., Salvano, M., Silva, J. O., González, S. N., & Oliver, G. (2001). Mycotoxins: Diagnosis and prevention in poultry. *Boletín Micológico*, 16, 23–36.
- Burgess, L. W., Dodmal, R. L., Pont, W., & Mayers, P. (1981). *Fusarium* diseases of wheat, maize and grain sorghum in Eastern Australia. En *Fusarium: Diseases, biology, and taxonomy*. Pennsylvania State University Press.
- CAA, Código Alimentario Argentino. Capítulo III, de los productos alimenticios. https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/capitulo_iii_prod_alimenticiosactual_iz_2023-05_1.pdf
- Camiolo, S., Porru, C., Benítez-Cabello, A., Rodríguez-Gómez, F., Calero-Delgado, B., Porceddu, A., Budroni, M., Mannazzu, I., Jiménez-Díaz, R., & Arroyo-López, F. N. (2017). Genome overview of eight *Candida boidinii* strains isolated from human activities and wild environments. *Standards in Genomic Sciences*, 12(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s40793-017-0281-z>
- Caro Velez, C. A., & León Peláez, Á. M. (2015). Capacidad antifúngica de sobrenadantes libres de células obtenidos de la fermentación de un sustrato de “panela” con gránulos de kefir de agua. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 17(2), 22–32. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v17n2.42758>
- Caro Vélez, C. A., & León Peláez, Á. M. (2014). Inhibición del crecimiento de *Aspergillus ochraceus* mediante “panela” fermentada con gránulos de kefir de agua. *Vitae*, 21(3), 191–200.
- CAST, Council for Agricultural Science and Technology (2003). Mycotoxins: risks in plant, animal and human systems, Task Force Report No. 139. Ames, IA: Council of Agricultural Science and Technology. <https://www.cast-science.org/publication/mycotoxins-risks-in-plant-animal-and-human-systems/>
- Castañares, E., Martínez, M., Cristos, D., Rojas, D., Lara, B., Stenglein, S., & Dinolfo, M. I. (2019). *Fusarium* species and mycotoxin contamination in maize in Buenos Aires province, Argentina. *European Journal of Plant Pathology*, 155(4), 1265–1275. <https://doi.org/10.1007/s10658-019-01853-5>
- Castoria, R., Curtis, F. De, Lima, G., & Cicco, V. De. (1997). β -1,3-glucanase activity of two saprophytic yeasts and possible mode of action as biocontrol agents against postharvest diseases. *Postharvest Biology and Technology*, 12, 293–300. <https://api.semanticscholar.org/CorpusID:84972986>
- Castoria, R., De Curtis, F., Lima, G., Caputo, L., Pacifico, S., & De Cicco, V. (2001).

- Aureobasidium pullulans* (LS-30) an antagonist of postharvest pathogens of fruits: Study on its modes of action. *Postharvest Biology and Technology*, 22, 7–17.
[https://doi.org/10.1016/S0925-5214\(00\)00186-1](https://doi.org/10.1016/S0925-5214(00)00186-1)
- Cavret, S., Laurent, N., Videmann, B., Mazallon, M., & Lecoeur, S. (2010). Assessment of deoxynivalenol (DON) adsorbents and characterisation of their efficacy using complementary *in vitro* tests. *Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment*, 27(1), 43–53.
<https://doi.org/10.1080/02652030903013252>
- Celińska, E., Kubiak, P., Bialas, W., Dziadas, M., & Grajek, W. (2013). *Yarrowia lipolytica*: The novel and promising 2-phenylethanol producer. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 40(3), 389–392. <https://doi.org/10.1007/s10295-013-1240-3>
- Chakraborty, D. S., & Newton, A. (2011). Climate change, plant diseases and food security: an overview. *Plant Pathol Spec Issue: Clim Chang Plant Dis* 1:2-14. *Plant Pathology*, 60, 2–14. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2010.02411.x>
- Chanchaichaovivat, A., Ruenwongsa, P., & Panijpan, B. (2007). Screening and identification of yeast strains from fruits and vegetables: Potential for biological control of postharvest chilli anthracnose (*Colletotrichum capsici*). *Biological Control*, 42(3), 326–335. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2007.05.016>
- Chen, Z. (2015). Characterization of exopolysaccharide produced by Tibetan Kefir and microbiological basis of the formation of Tibetan kefir grains. Northwest A & F University, Yangling, China.
- Chen, H., & Fink, G. (2006). Feedback control of morphogenesis in fungi by aromatic alcohols. *Genes & Development*, 20(9), 1150–1161.
<https://doi.org/10.1101/gad.1411806>
- Chen, H., Ju, H., Wang, Y., Du, G., Yan, X., Cui, Y., Yuan, Y., & Yue, T. (2021). Antifungal activity and mode of action of lactic acid bacteria isolated from kefir against *Penicillium expansum*. *Food Control*, 130, 108274.
<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108274>
- Chen, L. S., Ma, Y., Maubois, J. L., He, S. H., Chen, L. J., & Li, H. M. (2010). Screening for the potential probiotic yeast strains from raw milk to assimilate cholesterol. *Dairy Science and Technology*, 90(5), 537–548.
<https://doi.org/10.1051/dst/2010001>
- Chernin, L., & Chet, I. (2002). Microbial enzymes in the biocontrol of plant pathogens and pests. En *Enzymes in the environment: activity, ecology, and applications*. Marcel Dekker, Inc.
- Chiotta, M. L., Fumero, M. V., Cendoya, E., Palazzini, J. M., Alaniz-Zanon, M. S.,

- Ramirez, M. L., & Chulze, S. N. (2020). Toxigenic fungal species and natural occurrence of mycotoxins in crops harvested in Argentina. *Revista Argentina de Microbiología*, 52(4), 339–347. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2020.06.002>
- Choińska, R., Piasecka-Jóźwiak, K., Chabłowska, B., Dumka, J., & Łukaszewicz, A. (2020). Biocontrol ability and volatile organic compounds production as a putative mode of action of yeast strains isolated from organic grapes and rye grains. *Antonie van Leeuwenhoek*, 113(8), 1135–1146. <https://doi.org/10.1007/s10482-020-01420-7>
- Christensen, C. M., & Kaufmann, H. H. (1969). Grain Storage: The Role of Fungi in Quality Loss. *University of Minnesota Press*.
<http://www.jstor.org/stable/10.5749/j.cttt0jg>
- Chulze, S. N. (2010). Strategies to reduce mycotoxin levels in maize during storage: A review. *Food Additives and Contaminants - Part A*, 27(5), 651–657.
<https://doi.org/10.1080/19440040903573032>
- Chulze, S. N., Torres, A. M., Torres, O., & Mallmann, C. (2021). Foreword - special issue mycotoxins in Latin America. *World Mycotoxin Journal*, 14(3), 241–245.
<https://doi.org/10.3920/WMJ2021.X003>
- Ciurea, C. N., Kosovski, I. B., Mare, A. D., Toma, F., Pinteá-Simon, I. A., & Man, A. (2020). *Candida* and candidiasis—opportunism versus pathogenicity: A review of the virulence traits. *Microorganisms*, 8(6), 1–17.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms8060857>
- Clemons, K. V, McCusker, J. H., Davis, R. W., & Stevens, D. A. (1994). Comparative Pathogenesis of Clinical and Nonclinical Isolates of *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Infectious Diseases*, 169(4), 859–867.
<https://doi.org/10.1093/infdis/169.4.859>
- Corbu, V., & Portocalelor, A. (2020). Biodiversity Studies on *Pichia kudriavzevii* from Romanian spontaneous fermented products. *AgroLife Scientific Journal*, 9(1), 104–114.
- Cortés-Zavaleta, O., López-Malo, A., Hernández-Mendoza, A., & García, H. S. (2014). Antifungal activity of lactobacilli and its relationship with 3-phenyllactic acid production. *International Journal of Food Microbiology*, 173, 30–35.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.12.016>
- Cotty, P. J. (1988). Aflatoxin and sclerotial production by *Aspergillus flavus*: influence of pH. *Phytopathology*, 78, 1250–1253.
- Cox, J., Mbareche, H., Lindsley, W. G., & Duchaine, C. (2020). Field sampling of indoor bioaerosols. *Aerosol Science and Technology*, 54(5), 572–584.
<https://doi.org/10.1080/02786826.2019.1688759>

- Croteau, S. M., Prelusky, D. B., & Trenholm, H. L. (1994). Analysis of trichothecene mycotoxins by gas chromatography with electron capture detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42(4), 928—933.
<https://doi.org/10.1021/jf00040a018>
- de la Torre, D., Cardoso, M. L., Depetris, G., & Bartosik, R. E. (2015). Maíz húmedo , Manejo en Poscosecha de Acuerdo a su Destino Final. *INTA*, 7620.
- de la Torre, D., Cardoso, M. L., Depetris, G., & Bartosik, R. E. (2018). Almacenamiento de maíz en silo bolsa para alimentación animal. *INTA*, 7620.
- de Llanos, R. De, Llopis, S., Molero, G., Querol, A., Gil, C., & Fernández-espinar, M. T. (2011). *In vivo* virulence of commercial *Saccharomyces cerevisiae* strains with pathogenicity-associated phenotypical traits. *International Journal of Food Microbiology*, 144(3), 393–399. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.10.025>
- de Llanos, R., Fernández-Espinar, M. T., & Querol, A. (2006). A comparison of clinical and food *Saccharomyces cerevisiae* isolates on the basis of potential virulence factors. *Antonie van Leeuwenhoek*, 90(3), 221–231.
<https://doi.org/10.1007/s10482-006-9077-7>
- de Melo Pereira, G. V., Maske, B. L., de Carvalho Neto, D. P., Karp, S. G., De Dea Lindner, J., Martin, J. G. P., de Oliveira Hosken, B., & Soccol, C. R. (2022). What Is *Candida* Doing in My Food? A Review and Safety Alert on Its Use as Starter Cultures in Fermented Foods. *Microorganisms*, 10(9), 1–18.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms10091855>
- de Miccolis Angelini, R. M., Rotolo, C., Gerin, D., Abate, D., Pollastro, S., & Faretra, F. (2019). Global transcriptome analysis and differentially expressed genes in grapevine after application of the yeast-derived defense inducer cerevisane. *Pest Management Science*, 75(7), 2020–2033.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1002/ps.5317>
- Desjardins, A. E. (2006). *Fusarium Mycotoxins: Chemistry, Genetics and Biology*. American Phytopathological Society (APS Press).
- Dikmetas, D. N., Özer, H., & Karbancioglu-Guler, F. (2023). Biocontrol Potential of Antagonistic Yeasts on *In Vitro* and *In Vivo* *Aspergillus* Growth and Its AFB1 Production. *Toxins*, 15(6), 402. <https://doi.org/10.3390/toxins15060402>
- Diosma, G., Romanin, D. E., Rey-Burusco, M. F., Londero, A., & Garrote, G. L. (2014). Yeasts from kefir grains: Isolation, identification, and probiotic characterization. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 30(1), 43–53.
<https://doi.org/10.1007/s11274-013-1419-9>
- Dogi, C. A., Fochesato, A., Armando, R., Pribull, B., de Souza, M. M. S., da Silva Coelho, I., de Melo, D., Dalcerro, A., & Cavaglieri, L. (2013). Selection of lactic acid

- bacteria to promote an efficient silage fermentation capable of inhibiting the activity of *Aspergillus parasiticus* and *Fusarium graminearum* and mycotoxin production. *Journal of Applied Microbiology*, 114(6), 1650–1660.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1111/jam.12173>
- Dorak, T. (2006). *Real-time PCR*. Taylor & Francis Group.
- Droby, S., Vinokur, V., Weiss, B., Cohen, L., Daus, A., Goldschmidt, E., & Porat, R. (2002). Induction of Resistance to *Penicillium digitatum* in Grapefruit by the Yeast Biocontrol Agent *Candida oleophila*. *Phytopathology*, 92, 393–399.
<https://doi.org/10.1094/PHTO.2002.92.4.393>
- Droby, S., Wilson, C., Wisniewski, M., & Ghaouth, A. (2000). Biologically Based Technology for the Control of Postharvest Diseases of Fruits and Vegetables. En *Microbial Food Contamination* (1° ed.). CRC Press.
<https://doi.org/10.1201/9781420039030>
- Droby, S., Wisniewski, M., Macarasin, D., & Wilson, C. (2009). Twenty years of postharvest biocontrol research: Is it time for a new paradigm? *Postharvest Biology and Technology*, 52(2), 137–145.
<https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2008.11.009>
- Du, G., Liu, L., Guo, Q., Cui, Y., Chen, H., Yuan, Y., Wang, Z., Gao, Z., Sheng, Q., & Yue, T. (2021). Microbial community diversity associated with Tibetan kefir grains and its detoxification of Ochratoxin A during fermentation. *Food Microbiology*, 99, 103803. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2021.103803>
- Dumitru, O. M., Iorga, S., Vlăduț, N. V., & Brăcăcescu, C. (2020). Food Losses in Primary Cereal Production. A Review. *INMATEH - Agricultural Engineering*, 62(3), 133–146. <https://doi.org/10.35633/INMATEH-62-14>
- EC, European Commission (2009). Commission regulation (EC) No. 386/2009 of 12 May 2009 amending Regulation (EC) No. 1831/2003 of the European Parliament and of the Council as regards the establishment of a new functional group of feed additives. Off. J. EU. L 118, 66. <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2009:118:0066:0066:EN:PDF>
- EC, European Commission (2023). Commission regulation (EC) No. 2023/915 of 25 April 2023 amending Regulation (EC) No. 1881/2006 of the European Parliament and of the Council as regards maximum levels for certain contaminants in food and repealing Regulation. Off. J. EU. L 119/103. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/en/TXT/?uri=CELEX%3A32023R0915>
- Echeverría, E. S., & Chicagui Larrotta, J. S. (2015). *Estado de la investigación a nivel mundial sobre la micotoxina DON durante 2010 a 2015*. Universidad Distrital Francisco José de Caldas.

- Eskola, M., Kos, G., Elliott, C. T., Hajšlová, J., Mayar, S., & Krska, R. (2020). Worldwide contamination of food-crops with mycotoxins: Validity of the widely cited 'FAO estimate' of 25%. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60(16), 2773–2789. <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1658570>
- Esteve-Zarzoso, B., Belloch, C., Uruburu, F., & Querol, A. (1999). Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49(1), 329–337. <https://doi.org/10.1099/00207713-49-1-329>
- Fabre, C. E., Blanc, P. J., & Goma, G. (1998). Production of 2-Phenylethyl Alcohol by *Kluyveromyces marxianus*. *Biotechnology Progress*, 14(2), 270–274. <https://doi.org/https://doi.org/10.1021/bp9701022>
- FADA, Fundación Agropecuaria para el Desarrollo de Argentina (2019). Maíz 360°: Análisis de Argentina y el mundo. <https://fundacionfada.org/informes/%20maiz-360-analisis-de-argentina-y-el-mundo/>
- FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations (2001). Manual on the Application of the HACCP System in Mycotoxin Prevention and Control. *FAO Food and Nutrition Paper 73*. FAO, Rome, Italy. <https://www.fao.org/3/Y1390E/y1390e00.htm>
- Faucet-Marquis, V., Joannis-Cassan, C., Hadjeba-Medjdoub, K., Ballet, N., & Pfohl-Leszkowicz, A. (2014). Development of an *in vitro* method for the prediction of mycotoxin binding on yeast-based products: case of aflatoxin B1, zearalenone and ochratoxin A. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(17), 7583–7596. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5917-y>
- FDA, Food and Drug Administration (2000). Guidance for Industry: Action Levels for Poisonous or Deleterious Substances in Human Food and Animal Feed. <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/guidance-industry-action-levels-poisonous-or-deleterious-substances-human-food-and-animal-feed>
- FDA, Food and Drug Administration (2010). Guidance for Industry and FDA: Advisory Levels for Deoxynivalenol (DON) in Finished Wheat Products for Human Consumption and Grains and Grain By-Products used for Animal Feed. <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/guidance-industry-and-fda-advisory-levels-deoxynivalenol-don-finished-wheat-products-human>
- Fernández-Espinar, M. T., Martorell, P., de Llanos, R., & Querol, A. (2006). Molecular Methods to Identify and Characterize Yeasts in Foods and Beverages. En *The Yeast Handbook Volume 2: Yeasts in Food and Beverages*. Springer.

- https://doi.org/10.1007/978-3-540-28398-0_3
- Fialho, M., Toffano, L., Pedroso, M., Augusto, F., & Pascholati, S. (2010). Volatile organic compounds produced by *Saccharomyces cerevisiae* inhibit the *in vitro* development of *Guignardia citricarpa*, the causal agent of citrus black spot. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26, 925–932.
<https://doi.org/10.1007/s11274-009-0255-4>
- Fiorda, F. A., de Melo Pereira, G. V., Thomaz-Soccol, V., Medeiros, A. P., Rakshit, S. K., & Soccol, C. R. (2016). Development of kefir-based probiotic beverages with DNA protection and antioxidant activities using soybean hydrolyzed extract, colostrum and honey. *LWT - Food Science and Technology*, 68, 690–697.
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.01.003>
- Fiorda, F. A., de Melo Pereira, G. V., Thomaz-Soccol, V., Rakshit, S. K., Pagnoncelli, M. G. B., Vandenberghe, L. P. de S., & Soccol, C. R. (2017). Microbiological, biochemical, and functional aspects of sugary kefir fermentation - A review. *Food Microbiology*, 66, 86–95. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.04.004>
- Fiori, S., Urgeghe, P. P., Hammami, W., Razzu, S., Jaoua, S., & Migheli, Q. (2014). Biocontrol activity of four non- and low-fermenting yeast strains against *Aspergillus carbonarius* and their ability to remove ochratoxin A from grape juice. *International Journal of Food Microbiology*, 189, 45–50.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.07.020>
- Fochesato, A. S., Cristofolini, A., Poloni, V. L., Magnoli, A., Merkis, C. I., Dogi, C. A., & Cavaglieri, L. R. (2020). Culture medium and gastrointestinal environment positively influence the *Saccharomyces cerevisiae* RC016 cell wall polysaccharide profile and aflatoxin B1 bioadsorption. *Lwt*, 126.
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109306>
- Franco, M. C., Golowczyc, M. A., Antoni, G. L. De, & Pe, P. F. (2013). Administration of kefir-fermented milk protects mice against *Giardia intestinalis* infection Printed in Great Britain. *Journal of Medical Microbiology*, 62, 1815–1822.
<https://doi.org/10.1099/jmm.0.068064-0>
- Freimoser, F. M., Rueda-Mejia, M. P., Tilocca, B., & Migheli, Q. (2019). Biocontrol yeasts: mechanisms and applications. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 35(10), 1–19. <https://doi.org/10.1007/s11274-019-2728-4>
- Fruhauf, S., Schwartz, H., Ottner, F., Krska, R., & Vekiru, E. (2012). Yeast cell based feed additives: studies on aflatoxin B1 and zearalenone. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 29(2), 217–231.
<https://doi.org/10.1080/19440049.2011.630679>
- Fusilier, K., Chilvers, M. I., Limay-Rios, V., & Singh, M. P. (2022). Mycotoxin Co-

- Occurrence in Michigan Harvested Maize Grain. *Toxins*, 14(7), 1–15.
<https://doi.org/10.3390/toxins14070431>
- Gamba, R. R. (2015). *Estudio del potencial del kefir como agente antifúngico*.
Universidad Nacional de La Plata.
- Gamba, R. R., Caro, C. A., Martínez, O. L., Moretti, A. F., Giannuzzi, L., De Antoni, G. L., & León Peláez, A. (2016). Antifungal effect of kefir fermented milk and shelf life improvement of corn arepas. *International Journal of Food Microbiology*, 235, 85–92. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.06.038>
- Gamba, R. R., Koyanagi, T., Peláez, A. L., De Antoni, G., & Enomoto, T. (2021). Changes in Microbiota During Multiple Fermentation of Kefir in Different Sugar Solutions Revealed by High-Throughput Sequencing. *Current Microbiology*, 78(6), 2406–2413. <https://doi.org/10.1007/s00284-021-02501-0>
- Gamba, R. R., Moure, M. C., Diosma, G., Giannuzzi, L., De Antoni, G. L., & León Peláez, Á. M. (2016). Application of Whey Permeate Fermented with Kefir Grains for the Shelf-Life Improvement of Food and Feed. *Advances in Microbiology*, 6, 650–661. <https://doi.org/10.4236/aim.2016.69064>
- Gamba, R. R., Yamamoto, S., Sasaki, T., Michihata, T., Mahmoud, A. H., Koyanagi, T., & Enomoto, T. (2019). Microbiological and functional characterization of kefir grown in different sugar solutions. *Food Science and Technology Research*, 25(2), 303–312. <https://doi.org/10.3136/fstr.25.303>
- Gao, J., Gu, F., Abdella, N. H., Ruan, H., & He, G. (2012). Investigation on Culturable Microflora in Tibetan Kefir Grains from Different Areas of China. *Journal of Food Science*, 77(8), M425–M433. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2012.02805.x>
- Garrote, G. (1999). *Bacterias lácticas y levaduras para la industria alimentaria: kefir*.
Univerdad Nacional de La Plata.
- Garrote, G. L., Abraham, a G., & DeAntoni, G. L. (1997). Preservation of kefir grains, a comparative study. *Food Science and Technology-Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, 30(1), 77–84. <https://doi.org/10.1006/fstl.1996.0135>
- Garrote, G. L., Abraham, A. G., & De Antoni, G. L. (1998). Characteristics of kefir prepared with different grain:milk ratios. *Journal of Dairy Research*, 65(1), 149–154. <https://doi.org/10.1017/S0022029997002677>
- Gente, S., Sohier, D., Coton, E., Duhamel, C., & Gueguen, M. (2006). Identification of *Geotrichum candidum* at the species and strain level: Proposal for a standardized protocol. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 33(12), 1019–1031. <https://doi.org/10.1007/s10295-006-0130-3>
- Gerez, C. L., Torino, M. I., Rollán, G., & Font de Valdez, G. (2009). Prevention of bread mould spoilage by using lactic acid bacteria with antifungal properties. *Food*

- Control*, 20(2), 144–148. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2008.03.005>
- Ghanbari, R., Molaee Aghaee, E., Rezaie, S., Jahed Khaniki, G., Alimohammadi, M., Soleimani, M., & Noorbakhsh, F. (2018). The inhibitory effect of lactic acid bacteria on aflatoxin production and expression of aflR gene in *Aspergillus parasiticus*. *Journal of Food Safety*, 38(1), 2–7. <https://doi.org/10.1111/jfs.12413>
- Gilbert, M. K., Medina, A., Mack, B. M., Lebar, M. D., Rodríguez, A., Bhatnagar, D., Magan, N., Obrian, G., & Payne, G. (2018). Carbon dioxide mediates the response to temperature and water activity levels in *Aspergillus flavus* during infection of Maize Kernels. *Toxins*, 10(1), 5. <https://doi.org/10.3390/toxins10010005>
- Giorni, P., Battilani, P., Pietri, A., & Magan, N. (2008). Effect of aw and CO₂ level on *Aspergillus flavus* growth and aflatoxin production in high moisture maize post-harvest. *International Journal of Food Microbiology*, 122(1–2), 109–113. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.11.051>
- Gökirmaklı, Ç., & Güzel-Seydim, Z. B. (2022). Water kefir grains vs . milk kefir grains : Physical , microbial and chemical comparison. *Journal of Applied Microbiology*, 1–10. <https://doi.org/10.1111/jam.15532>
- Gomaa, E. Z., Abdelall, M. F., & El-Mahdy, O. M. (2018). Detoxification of Aflatoxin B1 by Antifungal Compounds from *Lactobacillus brevis* and *Lactobacillus paracasei*, Isolated from Dairy Products. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 10(2), 201–209. <https://doi.org/10.1007/s12602-017-9350-2>
- Gonda, M., Garmendia, G., Rufo, C., León Peláez, Á., Wisniewski, M., Droby, S., & Vero, S. (2019). Biocontrol of *Aspergillus flavus* in Ensiled Sorghum by Water Kefir Microorganisms. *Microorganisms*, 7(8), 253. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7080253>
- González-Orozco, B. D., García-Cano, I., Jiménez-Flores, R., & Álvarez, V. B. (2022). Invited review: Milk kefir microbiota—Direct and indirect antimicrobial effects. *Journal of Dairy Science*, 105(5), 3703–3715. <https://doi.org/10.3168/jds.2021-21382>
- Gopinath, S. C. B., Anbu, P., & Hilda, A. (2002). Extracellular enzymatic activity profiles in fungi isolated from oil-rich environments. *Mycoscience*, 46(2), 119–126. <https://doi.org/10.1007/s10267-004-0221-9>
- Gori, K., Knudsen, P. B., Nielsen, K. F., Arneborg, N., & Jespersen, L. (2011). Alcohol-based quorum sensing plays a role in adhesion and sliding motility of the yeast *Debaryomyces hansenii*. *FEMS Yeast Research*, 11(8), 643–652. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2011.00755.x>
- Grenier, B., & Oswald, I. (2011). Mycotoxin co-contamination of food and feed: Meta-

- Analysis of publications describing toxicological interactions. *World Mycotoxin Journal*, 4, 285–313. <https://doi.org/10.3920/wmj2011.1281>
- Groenewald, M., Coutinho, T., Smith, M. T., & van der Walt, J. P. (2012). Species reassessment of *Geotrichum bryndzae*, *Geotrichum phurueaensis*, *Geotrichum silvicola* and *Geotrichum vulgare* based on phylogenetic analyses and mating compatibility. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62(12), 3072–3080. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.038984-0>
- Guimarães Ferreira, R., Cardoso, M.V., de Souza Furtado, K.M., Espíndola KMM, Amorim RP, & Monteiro, M.C (2019). Epigenetic alterations caused by aflatoxin b1: a public health risk in the induction of hepatocellular carcinoma. *Translational research : the journal of laboratory and clinical medicine*, 204, 51-71. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2018.09.001>
- Gulitz, A., Stadie, J., Wenning, M., Ehrmann, M. A., & Vogel, R. F. (2011). The microbial diversity of water kefir. *International Journal of Food Microbiology*, 151(3), 284–288. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.09.016>
- Guo, C., Yuan, Y., Yue, T., Hatab, S., & Wang, Z. (2012). Binding mechanism of patulin to heat-treated yeast cell. *Letters in Applied Microbiology*, 55(6), 453–459. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765x.2012.03314.x>
- Gut, A. M., Vasiljevic, T., Yeager, T., & Donkor, O. N. (2019). Characterization of yeasts isolated from traditional kefir grains for potential probiotic properties. *Journal of Functional Foods*, 58, 56–66. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.04.046>
- Güzel-Seydim, Z. B., Gökırmaklı, Ç., & Greene, A. K. (2021). A comparison of milk kefir and water kefir: Physical, chemical, microbiological and functional properties. *Trends in Food Science & Technology*, 113, 42-53. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.04.041>
- Habschied, K., Krstanović, V., Zdunić, Z., Babić, J., Mastanjević, K., & Šarić, G. K. (2021). Mycotoxins biocontrol methods for healthier crops and stored products. *Journal of Fungi*, 7(5). <https://doi.org/10.3390/jof7050348>
- Haugland, R., Varma, M., Wymer, L., & Vesper, S. (2004). Quantitative PCR Analysis of Selected *Aspergillus*, *Penicillium* and *Paecilomyces* Species. *Systematic and Applied Microbiology*, 27, 198–210. <https://doi.org/10.1078/072320204322881826>
- Hernandez-Montiel, L. G., Droby, S., Preciado-Rangel, P., Rivas-García, T., González-Estrada, R. R., Gutiérrez-Martínez, P., & Ávila-Quezada, G. D. (2021). A sustainable alternative for postharvest disease management and phytopathogens biocontrol in fruit: Antagonistic yeasts. *Plants*, 10(12), 2641. <https://doi.org/10.3390/PLANTS10122641>
- Hernández Haro, C. T. (2014). *Estudio de rasgos de virulencia y análisis proteómico*

- de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* aisladas de suplementos dietéticos y probióticos. Universidad Complutense de Madrid.
- Höfs, S., Mogavero, S., & Hube, B. (2016). Interaction of *Candida albicans* with host cells: virulence factors, host defense, escape strategies, and the microbiota. *Journal of Microbiology*, 54(3), 149–169. <https://doi.org/10.1007/s12275-016-5514-0>
- Hsieh, H. H., Wang, S. Y., Chen, T. L., Huang, Y. L., & Chen, M. J. (2012). Effects of cow's and goat's milk as fermentation media on the microbial ecology of sugary kefir grains. *International Journal of Food Microbiology*, 157(1), 73–81. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.04.014>
- Hua, S. S. T., Beck, J. J., Sarreal, S. B. L., & Gee, W. (2014). The major volatile compound 2-phenylethanol from the biocontrol yeast, *Pichia anomala*, inhibits growth and expression of aflatoxin biosynthetic genes of *Aspergillus flavus*. *Mycotoxin Research*, 30(2), 71–78. <https://doi.org/10.1007/s12550-014-0189-z>
- Hua, S. S. T., Sarreal, S. B. L., Chang, P. K., & Yu, J. (2019). Transcriptional regulation of aflatoxin biosynthesis and conidiation in *Aspergillus flavus* by *Wickerhamomyces anomalus* WRL-076 for reduction of aflatoxin contamination. *Toxins*, 11(2). <https://doi.org/10.3390/toxins11020081>
- Huang, C., Qian, Y., Viana, T., Siegumfeldt, H., Arneborg, N., Larsen, N., & Jespersen, L. (2020). The quorum-sensing molecule 2-phenylethanol impaired conidial germination, hyphal membrane integrity and growth of *Penicillium expansum* and *Penicillium nordicum*. *Journal of Applied Microbiology*, 129(2), 278–286. <https://doi.org/10.1111/jam.14621>
- Huang, R., Li, G. Q., Zhang, J., Yang, L., Che, H. J., Jiang, D. H., & Huang, H. C. (2011). Control of postharvest botrytis fruit rot of strawberry by volatile organic compounds of *Candida intermedia*. *Phytopathology*, 101(7), 859–869. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-09-10-0255>
- IARC, International Agency for Research on Cancer (1993). Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic amines and mycotoxins. En *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, No. 56*. IARC, Lyon, France. <https://publications.iarc.fr/Book-And-Report-Series/Iarc-Monographs-On-The-Identification-Of-Carcinogenic-Hazards-To-Humans/Some-Naturally-Occurring-Substances-Food-Items-And-Constituents-Heterocyclic-Aromatic-Amines-And-Mycotoxins-1993>
- IARC, International Agency for Research on Cancer (2015). Control De Las Micotoxinas En Los Países De Ingresos Bajos Y Medios. En *IARC. Informes de grupos de trabajo N°9*. <https://publications.iarc.fr/Book-And-Report-Series/Iarc->

[Working-Group-Reports/Control-De-Las-Micotoxinas-En-Los-Pa%C3%ADses-De-
Ingresos-Bajos-Y-Medios-2015](#)

- Ismaiel, A. A., Ghaly, M. F., & El-Naggar, A. K. (2011). Milk kefir: Ultrastructure, antimicrobial activity and efficacy on aflatoxin b1 production by *Aspergillus flavus*. *Current Microbiology*, 62(5), 1602–1609. <https://doi.org/10.1007/s00284-011-9901-9>
- Jallow, A., Xie, H., Tang, X., Qi, Z., & Li, P. (2021). Worldwide aflatoxin contamination of agricultural products and foods: From occurrence to control. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 20(3), 2332–2381. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12734>
- Janhager, J. (2018). Mycotoxins—An Increasing Problem?—The Effect of Climate Changes on *Fusarium* Mould Populations and the Occurrence of Fusarotoxins in Swedish Cereals. Universidad Sueca de Ciencias Agrícolas: Uppsala, Suecia. https://stud.epsilon.slu.se/13677/12/janhager_j-180821.pdf
- Janisiewicz, W., Tworkoski, T., & Sharer, C. (2000). Characterizing the Mechanism of Biological Control of Postharvest Diseases on Fruits with a Simple Method to Study Competition for Nutrients. *Phytopathology*, 90, 1196–1200. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2000.90.11.1196>
- JECFA (1999). Evaluation of certain food additives and contaminants. Forty-sixth report of Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). Food and Agriculture Organization of the United Nations, World Health Organization, WHO Technical Report Series 884, World Health Organization, Geneva.
- JECFA (2017). Evaluation of certain contaminants in food. Eighty-third report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). Food and Agriculture Organization of the United Nations, World Health Organization, WHO Technical Report Series 1002, World Health Organization, Geneva.
- Jijakli, M. H., & Lepoivre, P. (1998). Characterization of an Exo- β -1,3-Glucanase Produced by *Pichia anomala* Strain K, Antagonist of *Botrytis cinerea* on Apples. *Phytopathology*, 88(4), 335–343. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.1998.88.4.335>
- Joannis-Cassan, C., Tozlovanu, M., Hadjeba-Medjdoub, K., Ballet, N., & Pfohl-Leszkowicz, A. (2011). Binding of Zearalenone, Aflatoxin B1 , and Ochratoxin A by Yeast-Based Products: A Method for Quantification of Adsorption Performance. *Journal of Food Protection*, 74(7), 1175–1185. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-11-023>
- Jouany, J. P., Yiannikouris, A., & Bertin, G. (2005). The chemical bonds between mycotoxins and cell wall components of *Saccharomyces cerevisiae* have been identified. *Archiva Zootechnica*, 8, 8–26.

- Kabak, B., Dobson, A., & Var, I. (2006). Strategies to Prevent Mycotoxin Contamination of Food and Animal Feed: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 46, 593–619. <https://doi.org/10.1080/10408390500436185>
- Kalamaki, M. S., & Angelidis, A. S. (2017). Isolation and molecular identification of yeasts in Greek kefir. *International Journal of Dairy Technology*, 70(2), 261–268. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12329>
- Kamilari, E., Stanton, C., Reen, F. J., & Ross, R. P. (2023). Uncovering the Biotechnological Importance of *Geotrichum candidum*. *Foods*, 12(6), 1124. <https://doi.org/10.3390/foods12061124>
- Kanatani, R. ; Takeda, K. (1991). A method for mass sporulation in a scab disease pathogen (*Fusarium graminearum* Schwabe). *Nogaku Kenkyu*, 62(3), 177–189.
- Kantarciolu, S. A., & Yücel, A. (2002). Phospholipase and protease activities in clinical *Candida* isolates with reference to the sources of strains. *Mycoses*, 45(5–6), 160–165. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0507.2002.00727.x>
- Karkowska-Kuleta, J., Rapala-Kozik, M., & Kozik, A. (2009). Fungi pathogenic to humans: Molecular bases of virulence of *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* and *Aspergillus fumigatus*. *Acta Biochimica Polonica*, 56(2), 211–224. https://doi.org/10.18388/abp.2009_2452
- Kawtharani, H., Snini, S. P., Heang, S., Bouajila, J., Taillandier, P., Mathieu, F., & Beaufort, S. (2020). Phenyllactic acid produced by *Geotrichum candidum* reduces *Fusarium sporotrichioides* and *F. langsethiae* growth and T-2 toxin concentration. *Toxins*, 12(4), 209. <https://doi.org/10.3390/toxins12040209>
- Khan, F. A., Munir, A., & Ghafoor, A. (2018). The design, fabrication and performance evaluation of solar sustained batch type maize dryer for valuation addition. *International Journal of Agriculture, Environment and Food Sciences*, 2(2), 50–56.
- Kim, D., Jeong, D., Kim, H., Kang, I., Chon, J., Song, K., & Seo, K. (2016). Antimicrobial Activity of Kefir against Various Food Pathogens and Spoilage Bacteria. *Korean Journal of Food Science*, 36(6), 787–790. <https://doi.org/https://doi.org/10.5851/kosfa.2016.36.6.787>
- Kim, D., Lee, K. D., & Choi, C. (2021). Role of LAB in silage fermentation: Effect on nutritional quality and organic acid production—An overview. *AIMS Agriculture and Food*, 6(1), 216–234. <https://doi.org/10.3934/AGRFOOD.2021014>
- Kirk, P. M., Cannon, P. F., Minter, D. W., & Stalpers, J. A. (2008). *Dictionary of the Fungi* (10° ed.). CAB International.
- Klassen, R., Schaffrath, R., Buzzini, P., & Ganter, P. (2017). Antagonistic Interactions and Killer Yeasts. En *Yeasts in Natural Ecosystems: Ecology* (1° ed.). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-319-61575-2_9

- Koh, A. (2013). Murine Models of *Candida* Gastrointestinal Colonization and Dissemination. *Eukaryotic Cell*, 12, 1416–1422. <https://doi.org/10.1128/EC.00196-13>
- Kubista, M., Andrade, J. M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonák, J., Lind, K., Sindelka, R., Sjöback, R., Sjögren, B., Strömbom, L., Ståhlberg, A., & Zoric, N. (2006). The real-time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine*, 27(2–3), 95–125. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2005.12.007>
- Kumar, B., Kumar, B., Bharti, S., & Kumar, J. (2017). Effect of Co-existing Filamentous Fungi on Growth Inhibition and Aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 6(8), 2789–2799. <https://doi.org/https://doi.org/10.20546/ijcmas.2017.608.332>
- Kurtzman, C. P. (2015). Identification of food and beverage spoilage yeasts from DNA sequence analyses. *International Journal of Food Microbiology*, 213, 71–78. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.05.023>
- Kurtzman, C. P., Fell, J. W., & Boekhout, T. (2011). *The yeasts, a taxonomic study* (5^o ed.). Elsevier.
- Kurtzman, C. P. (2004). Ribosomal RNA/DNA sequence comparison for assessing biodiversity of yeasts. En *Biodiversity of Fungi: Inventory and Monitoring Methods*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-509551-8.X5000-4>
- Kurtzman, C. P., & Robnett, C. J. (1998). Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie van Leeuwenhoek*, 98(183584), 331–371. <https://doi.org/10.1023/A:1001761008817>
- Kurtzman, C. P., & Robnett, C. J. (1997). Identification of clinically important ascomycetous yeasts based on nucleotide divergence in the 5' end of the large-subunit (26S) ribosomal DNA gene. *Journal of Clinical Microbiology*, 35(5), 1216–1223. <https://doi.org/10.1128/jcm.35.5.1216-1223.1997>
- Lahlali, R., Ezrari, S., Radouane, N., Kenfaoui, J., Esmael, Q., El Hamss, H., Belabess, Z., & Barka, E. A. (2022). Biological Control of Plant Pathogens: A Global Perspective. *Microorganisms*, 10(3), 596. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10030596>
- Lara-Hidalgo, C. E., Hernández-Sánchez, H., Hernández-Rodríguez C., & Dorantes-Álvarez, L. (2017). Yeasts in Fermented Foods and their Probiotic Potential. *Austin Journal of Nutrition and Metabolism*, 4(1), 1045.
- Larsen, J., Hunt, J., Perrin, I., & Ruckebauer, P. (2004). Workshop on trichothecenes with a focus on DON: Summary report. *Toxicology Letters*, 153, 1–22. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2004.04.020>

- Latorre-García, L., Del Castillo-Agudo, L., & Polaina, J. (2007). Taxonomical classification of yeasts isolated from kefir based on the sequence of their ribosomal RNA genes. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23(6), 785–791. <https://doi.org/10.1007/s11274-006-9298-y>
- Lauren, D., & Smith, W. A. (2001). Stability of the *Fusarium* mycotoxins nivalenol, deoxynivalenol and zearalenone in ground maize under typical cooking environments. *Food Additives and Contaminants*, 18, 1011–1016. <https://doi.org/10.1080/02652030110052283>
- Laureys, D., & De Vuyst, L. (2014). Microbial species diversity, community dynamics, and metabolite kinetics of water Kefir fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(8), 2564–2572. <https://doi.org/10.1128/AEM.03978-13>
- Lavermicocca, P., Valerio, F., & Visconti, A. (2003). Antifungal activity of phenyllactic acid against molds isolated from bakery products. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(1), 634–640. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.1.634-640.2003>
- Leclercq-Perlat, M.-N., Picque, D., Martin del Campo Barba, S. T., & Monnet, C. (2013). Dynamics of *Penicillium camemberti* growth quantified by real-time PCR on Camembert-type cheeses under different conditions of temperature and relative humidity. *Journal of Dairy Science*, 96(6), 4031–4040. <https://doi.org/https://doi.org/10.3168/jds.2012-6372>
- Leite, A. M. de O., Miguel, M. A. L., Peixoto, R. S., Rosado, A. S., Silva, J. T., & Paschoalin, V. M. F. (2013). Microbiological, technological and therapeutic properties of kefir: A natural probiotic beverage. *Brazilian Journal of Microbiology*, 44(2), 341–349. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822013000200001>
- León Peláez, A. M., Serna Cataño, C. A., Quintero Yepes, E. A., Gamba Villarroel, R. R., De Antoni, G. L., & Giannuzzi, L. (2012). Inhibitory activity of lactic and acetic acid on *Aspergillus flavus* growth for food preservation. *Food Control*, 24(1–2), 177–183. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.09.024>
- Li, M., Cheng, W., Zhang, Z., Zhang, Z., & Peng, B. (2018). Fermentative degradation of Patulin by *Saccharomyces cerevisiae* in aqueous solution. *LWT*, 97, 427–433. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.07.040>
- Lillehoj, E. B., Fennell, D. I., & Kwolek, W. F. (1976). *Aspergillus flavus* and Aflatoxin in Iowa Corn Before Harvest. *Science*, 193(4252), 495–496. <https://doi.org/10.1126/science.821144>
- Lillehoj, E. B., Kwolek, W. F., Peterson, R. E., Shotwell, O. L., & Hesseltine, C. W. (1976). Aflatoxin contamination, fluorescence, and insect damage in corn infected with *Aspergillus flavus* before harvest. *Cereal Chemistry*, 53(4), 505–512.
- Lin, C., Chen, H., & Liu, J. (1999). Identification and characterisation of lactic acid

- bacteria and yeasts isolated from kefir grains in Taiwan. *Australian Journal of Dairy Technology*, 54(1), 14–18.
- Lipinska-Zubrycka, L., Klewicki, R., Sójka, M., Bonikowski, R., Żyżelewicz, D., Kolodziejczyk, K., & Klewicka, E. (2018). Antifungal Activity of *Lactobacillus pentosus* LOCK 0979 in the Presence of Polyols and Galactosyl-Polyols. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 10, 186–200.
<https://doi.org/10.1007/s12602-017-9344-0>
- Liu, J., Li, G., & Sui, Y. (2017). Optimization of Culture Medium Enhances Viable Biomass Production and Biocontrol Efficacy of the Antagonistic Yeast, *Candida diversa*. *Frontiers in Microbiology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02021>
- Liu, J., Sui, Y., Wisniewski, M., Droby, S., & Liu, Y. (2013). Review: Utilization of antagonistic yeasts to manage postharvest fungal diseases of fruit. *International Journal of Food Microbiology*, 167(2), 153–160.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.09.004>
- Liu, J., Sui, Y., Wisniewski, M., Xie, Z., Liu, Y., You, Y., Zhang, X., Sun, Z., Li, W., Li, Y., & Wang, Q. (2018). The impact of the postharvest environment on the viability and virulence of decay fungi. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 58(10), 1681–1687. <https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1279122>
- Liu, P., Cheng, Y., Yang, M., Liu, Y., Chen, K., Long, C. A., & Deng, X. (2014). Mechanisms of action for 2-phenylethanol isolated from *Kloeckera apiculata* in control of *Penicillium* molds of citrus fruits. *BMC Microbiology*, 14(1), 1–14.
<https://doi.org/10.1186/s12866-014-0242-2>
- Liu, Y., Wu, Q., Wu, X., Algharib, S. A., Gong, F., Hu, J., Luo, W., Zhou, M., Pan, Y., Yan, Y. Y., & Wang, Y. (2021). Structure, preparation, modification, and bioactivities of β -glucan and mannan from yeast cell wall: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 173, 445–456.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.01.125>
- Llopis Pla, S. (2012). *Estudio del potencial patógeno de cepas de Saccharomyces cerevisiae aisladas de suplementos dietéticos y probióticos*. Universidad de Valencia.
- Londero, A., León Peláez, Á., Diosma, G., De Antoni, G., Abraham, A., & Garrote, G. (2014). Fermented whey as poultry feed additive to prevent fungal contamination. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(15), 3189–3194.
<https://doi.org/10.1002/jsfa.6669>
- Lööke, M., Kristjuhan, K., & Kristjuhan, A. (2011). Extraction of genomic DNA from yeasts for PCR-based applications. *BioTechniques*, 50(5), 325–328.
<https://doi.org/10.2144/000113672>

- Lorito, M., Harman, G. E., Hayes, C. K., Broadway, R. M., Trosomo, A., Woo, S. L., & Di- Pietro, A. (1993). Chitolytic enzymes produced by *Trichoderma harzianum*: antifungal activity of purified endochitinase and chitobiase. *Phytopathology*, 83, 302–307.
- Luo, Y., Liu, X., Yuan, L., & Li, J. (2020). Complicated interactions between bio-adsorbents and mycotoxins during mycotoxin adsorption: Current research and future prospects. *Trends in Food Science and Technology*, 96, 127–134. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.12.012>
- Luo, Y., Wang, J., Liu, B., Wang, Z., Yuan, Y., & Yue, T. (2015). Effect of Yeast Cell Morphology, Cell Wall Physical Structure and Chemical Composition on Patulin Adsorption. *PloS One*, 10, 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0136045>
- Luo, Y., Wang, Z. L., Yuan, Y. H., Zhou, Z., & Yue, T. (2016). Patulin adsorption of a superior microorganism strain with low flavour-affection of kiwi fruit juice. *World Mycotoxin Journal*, 9(2), 195–203. <https://doi.org/10.3920/WMJ2014.1874>
- Lynch, K. M., Wilkinson, S., Daenen, L., & Arendt, E. K. (2021). An update on water kefir: Microbiology, composition and production. *International Journal of Food Microbiology*, 345, 109128. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109128>
- Macedo, G. A., Park, Y. K., & Pastore, G. M. (1997). Partial purification and characterization of an extracellular lipase from a newly isolated strain of *Geotrichum* sp. *Revista de Microbiología*, 28(2), 90–95.
- Magalhães, K. T., de Melo Pereira, G. V., Campos, C. R., Dragone, G., & Schwan, R. F. (2011). Brazilian kefir: Structure, microbial communities and chemical composition. *Brazilian Journal of Microbiology*, 42(2), 693–702. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822011000200034>
- Magan, N., Aldred, D., Mylona, K., & Lambert, R. (2010). Limiting mycotoxins in stored wheat—A review. *Food Additives & Contaminants. Part A, Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment*, 27, 644–650. <https://doi.org/10.1080/19440040903514523>
- Magan, N., & Lacey, J. (1984). Effect of water activity, temperature and substrate on interactions between field and storage fungi. *Transactions - British Mycological Society*, 82(1), 83–93. [https://doi.org/10.1016/S0007-1536\(84\)80214-4](https://doi.org/10.1016/S0007-1536(84)80214-4)
- Magan, N., & Medina, A. (2016). Integrating gene expression, ecology and mycotoxin production by *Fusarium* and *Aspergillus* species in relation to interacting environmental factors. *World Mycotoxin Journal*, 9, 864–874. <https://doi.org/10.3920/WMJ2016.2076>
- Magnoli, A. P., Poloni, V. L., & Cavaglieri, L. (2019). Impact of mycotoxin contamination in the animal feed industry. *Current Opinion in Food Science*, 29, 99–108.

- <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2019.08.009>
- Magnoli, A. P., Rodriguez, M. C., Poloni, V. L., Rojo, M. C., Combina, M., Chiacchiera, S. M., Dalcero, A. M., & Cavaglieri, L. R. (2016). Novel yeast isolated from broilers' feedstuff, gut and faeces as aflatoxin B1 adsorbents. *Journal of Applied Microbiology*, 121(6), 1766–1776. <https://doi.org/10.1111/jam.13297>
- Majcher, M., Myszkka, K., Kubiak, J., & Jelen, H. (2014). Identification of key odorants of fried cottage cheese and contribution of *Galactomyces geotrichum* MK017 to the formation of 2-phenylethanol and related rose-like aroma compounds. *International Dairy Journal*, 39, 324–329. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2014.08.008>
- Malik, A., Alves, M., & Grohmann, E. (2014). Management of microbial resources in the environment. *Management of Microbial Resources in the Environment*, 1–530. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-94-007-5931-2>
- Mannazzu, I., Domizio, P., Carboni, G., Zara, S., Zara, G., Comitini, F., Budroni, M., & Ciani, M. (2019). Yeast killer toxins: from ecological significance to application. *Critical Reviews in Biotechnology*, 39(5), 603–617. <https://doi.org/10.1080/07388551.2019.1601679>
- Nebcutter: en la página aparece: Vincze, T., Posfai, J. and Roberts, R.J. NEBcutter: a program to cleave DNA with restriction enzymes *Nucleic Acids Res.* 31: 3688-3691 (2003) <https://nc3.neb.com/NEBcutter/>
- Marasas, W. F. (1984). *Toxigenic Fusarium Species*. Pennsylvania State University Press.
- Masih, E., & Paul, B. (2002). Secretion of β -1,3-Glucanases by the Yeast *Pichia membranifaciens* and Its Possible Role in the Biocontrol of *Botrytis cinerea* Causing Grey Mold Disease of the Grapevine. *Current Microbiology*, 44, 391–395. <https://doi.org/10.1007/s00284-001-0011-y>
- Mbili, N. C. (2012). *Evaluation of integrated control of postharvest grey mould and blue mould of pome fruit using yeast, potassium silicate and hot water treatments*. Universidad de KwaZulu-Natal. <http://hdl.handle.net/10413/7984>
- McCormick, S. P. (2013). Microbial Detoxification of Mycotoxins. *Journal of Chemical Ecology*, 39(7), 907–918. <https://doi.org/10.1007/s10886-013-0321-0>
- McCusker, J. H., Clemons, K. V., Stevens, D. A., & Davis, R. W. (1994). Genetic characterization of pathogenic *Saccharomyces cerevisiae* isolates. *Genetics*, 136(4), 1261–1269.
- McNeill, J., Barrie, F., Buck, W., Demoulin, V., Greuter, W., Hawksworth, D., Herendeen, P., Knapp, S., Marhold, K., Prado, J., van Reine, W., Smith, G., Wiersema, J., & Turland, N. (2012). International Code of Nomenclature for algae,

- fungi and plants (Melbourne Code) adopted by the Eighteenth International Botanical Congress Melbourne, Australia, July 2011. En *Regnum Vegetabile* (Vol. 154).
- Medina, A., González-Jartín, J., & Sainz, M. J. (2017). Impact of Global Warming on Mycotoxins. *Current Opinion in Food Science*, 18, 76–81.
<https://doi.org/10.1016/j.cofs.2017.11.009>
- Medina, A., Mohale, S., Samsudin, N. I. P., Rodriguez-Sixtos, A., Rodriguez, A., & Magan, N. (2017). Biocontrol of mycotoxins: dynamics and mechanisms of action. *Current Opinion in Food Science*, 17, 41–48.
<https://doi.org/10.1016/j.cofs.2017.09.008>
- Messer, J. W., Rice, E., & Johnson, C. (2000). Total viable counts. Spread plate technique. *Encyclopedia of Food Microbiology*, 3, 2159–2160.
- Miguel, M. G. da C. P., Cardoso, P. G., Magalhães, K. T., & Schwan, R. F. (2011). Profile of microbial communities present in tibico (sugary kefir) grains from different Brazilian States. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(8), 1875–1884. <https://doi.org/10.1007/s11274-010-0646-6>
- Milićević, D., Nesic, K., & Jakšić, S. (2015). Mycotoxin Contamination of the Food Supply Chain - Implications for One Health Programme. *Procedia Food Science*, 5, 187–190. <https://doi.org/10.1016/j.profoo.2015.09.053>
- Miller, J. D. (1994). Mycotoxins. En *Organic Dusts. Exposure, Effects, and Prevention*. CRC Press.
- Mills, J. T., & Woods, S. M. (1994). Factors affecting storage life of farm-stored field peas (*Pisum sativum* L.) and white beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of Stored Products Research*, 30(3), 215–226.
[https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0022-474X\(94\)90049-N](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0022-474X(94)90049-N)
- Minekus, M., Alminger, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu, C., Carrière, F., Boutrou, R., Corredig, M., Dupont, D., Dufour, C., Egger, L., Golding, M., Karakaya, S., Kirkhus, B., Le Feunteun, S., Lesmes, U., Maclerzanka, A., MacKie, A., ... Brodkorb, A. (2014). A standardised static *in vitro* digestion method suitable for food-an international consensus. *Food and Function*, 5(6), 1113–1124.
<https://doi.org/10.1039/c3fo60702j>
- Mitra, M., Venkatesh, P., Ghissing, U., Biswas, A., Mitra, A., Mandal, M., Mishra, H. N., & Maiti, M. K. (2023). Fruity-scented antifungal volatiles from endophytic *Geotrichum candidum* PF005: Broad-spectrum bioactivity against stored grain pathogens, mode of action and suitable formulation for mycofumigation. *Biological Control*, 177, 105129. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2022.105129>
- Mohanram, S., & Kumar, P. (2019). Rhizosphere microbiome: revisiting the synergy of

- plant-microbe interactions. *Annals of Microbiology*, 69, 307–320.
<https://doi.org/10.1007/s13213-019-01448-9>
- Mohapatra, D., Kumar, S., Kotwaliwale, N., & Singh, K. K. (2017). Critical factors responsible for fungi growth in stored food grains and non-chemical approaches for their control. *Industrial Crops and Products*, 108, 162–182.
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.06.039>
- Monteagudo-Mera, A., Rastall, R. A., Gibson, G. R., Charalampopoulos, D., & Chatzifragkou, A. (2019). Adhesion mechanisms mediated by probiotics and prebiotics and their potential impact on human health. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(16), 6463–6472. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09978-7>
- Mookherjee, A., Bera, P., Mitra, A., & Maiti, M. K. (2017). Characterization and Synergistic Effect of Antifungal Volatile Organic Compounds Emitted by the *Geotrichum candidum* PF005, an Endophytic Fungus from the Eggplant. *Microbial Ecology*, 1–15. <https://doi.org/10.1007/s00248-017-1065-0>
- Moral, J., Garcia-Lopez, M. T., Camiletti, B. X., Jaime, R., Michailides, T. J., Bandyopadhyay, R., & Ortega-Beltran, A. (2020). Present status and perspective on the future use of aflatoxin biocontrol products. *Agronomy*, 10(4), 1–19.
<https://doi.org/10.3390/agronomy10040491>
- Morath, S. U., Hung, R., & Bennett, J. W. (2012). Fungal volatile organic compounds: A review with emphasis on their biotechnological potential. *Fungal Biology Reviews*, 26(2), 73–83. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fbr.2012.07.001>
- Moretti, A. F., Moure, M. C., Quiñoy, F., Esposito, F., Simonelli, N., Medrano, M., & León-Peláez, Á. (2022). Water kefir, a fermented beverage containing probiotic microorganisms: From ancient and artisanal manufacture to industrialized and regulated commercialization. *Future Foods*, 5, 100123.
<https://doi.org/10.1016/j.fufo.2022.100123>
- Mortuza, M. G., & Ilag, L. L. (1999). Potential for Biocontrol of *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griff. & Maubl. in Banana Fruits by *Trichoderma* Species. *Biological Control*, 15(3), 235–240.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1006/bcon.1999.0716>
- Muck, R. E., Nadeau, E. M. G., McAllister, T. A., Contreras-Govea, F. E., Santos, M. C., & Kung, L. (2018). Silage review: Recent advances and future uses of silage additives. *Journal of Dairy Science*, 101(5), 3980–4000.
<https://doi.org/https://doi.org/10.3168/jds.2017-13839>
- Murphy, A., & Kavanagh, K. (1999). Emergence of *Saccharomyces cerevisiae* as a human pathogen Implications for biotechnology. *Enzyme and Microbial Technology*, 25(7), 551–557. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(99\)00086-1](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(99)00086-1)

- Mwakinyali, S. E., Ding, X., Ming, Z., Tong, W., Zhang, Q., & Li, P. (2019). Recent development of aflatoxin contamination biocontrol in agricultural products. *Biological Control*, 128, 31–39. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2018.09.012>
- Nally, C. (2011). *Empleo de levaduras como agentes de control biológico de hongos patógenos*. Universidad Nacional de Tucuman.
- Natarajan, S., Balachandar, D., Senthil, N., Velazhahan, R., & Paranidharan, V. (2022). Volatiles of antagonistic soil yeasts inhibit growth and aflatoxin production of *Aspergillus flavus*. *Microbiological Research*, 263, 127150. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2022.127150>
- Naz, S., Cretenet, M., & Vernoux, J.-P. (2013). Current knowledge on antimicrobial metabolites produced from aromatic amino acid metabolism in fermented products. En *Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education*. Formatex Research Center.
- Neme, K., & Mohammed, A. (2017). Mycotoxin occurrence in grains and the role of postharvest management as a mitigation strategies. A review. *Food Control*, 78, 412–425. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.03.012>
- Nešić, K., Habschied, K., & Mastanjević, K. (2021). Possibilities for the Biological Control of Mycotoxins in Food and Feed. *Toxins*, 13(198). <https://doi.org/10.3390/toxins13030198>
- Nguyen, P. A., Strub, C., Fontana, A., & Schorr-Galindo, S. (2017). Crop molds and mycotoxins: Alternative management using biocontrol. *Biological Control*, 104, 10–27. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2016.10.004>
- Nielsen, B., Gürakan, G. C., & Ünlü, G. (2014). Kefir: A Multifaceted Fermented Dairy Product. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 6(3–4), 123–135. <https://doi.org/10.1007/s12602-014-9168-0>
- Okeke, E., Davwar, P. M., Roberts, L., Sartorius, K., Spearman, W., Malu, A., & Duguru, M. (2020). Epidemiology of Liver Cancer in Africa: Current and Future Trends. *Seminars in Liver Disease*, 40(2), 111–123. <https://doi.org/10.1055/s-0039-3399566>
- Olstorpe, M., Schnürer, J., & Passoth, V. (2012). Growth inhibition of various *Enterobacteriaceae* species by the yeast *Hansenula anomala* during storage of moist cereal grain. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(1), 292–294. <https://doi.org/10.1128/AEM.06024-11>
- Ortega, L. M. (2017). *Caracterización de aislamientos de Fusarium graminearum y su relación con el deterioro de granos de trigo infectados*. Universidad Nacional de La Plata.
- Oztekin, S., Dikmetas, D. N., Devecioglu, D., Acar, E. G., & Karbancioglu-Guler, F.

- (2023). Recent Insights into the Use of Antagonistic Yeasts for Sustainable Biomangement of Postharvest Pathogenic and Mycotoxigenic Fungi in Fruits with Their Prevention Strategies against Mycotoxins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 71, 9923–9950. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.3c00315>
- Pailin, T., Kang, D. H., Schmidt, K., & Fung, D. Y. C. (2001). Detection of extracellular bound proteinase in EPS-producing lactic acid bacteria cultures on skim milk agar. *Letters in Applied Microbiology*, 33(1), 45–49. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765X.2001.00954.x>
- Palomino Camargo, C., & González Muñoz, Y. (2014). Identificación de patógenos en alimentos: ventajas y limitaciones. *Salud Pública*, 31, 535–546.
- Palumbo, R., Crisci, A., Venâncio, A., Abrahantes, J. C., Dorne, J. Lou, Battilani, P., & Toscano, P. (2020). Occurrence and co-occurrence of mycotoxins in cereal-based feed and food. *Microorganisms*, 8(1). <https://doi.org/10.3390/microorganisms8010074>
- Pantelides, I. S., Christou, O., Tsolakidou, M. D., Tsaltas, D., & Ioannou, N. (2015). Isolation, identification and *in vitro* screening of grapevine yeasts for the control of black aspergilli on grapes. *Biological Control*, 88, 46–53. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2015.04.021>
- Park, M., Do, E., & Jung, W. H. (2013). Lipolytic enzymes involved in the virulence of human pathogenic fungi. *Mycobiology*, 41(2), 67–72. <https://doi.org/10.5941/MYCO.2013.41.2.67>
- Paster, N., Lisker, N., & Chet, I. (1983). Ochratoxin A production by *Aspergillus ochraceus* Wilhelm grown under controlled atmospheres. *Applied and Environmental Microbiology*, 45(3), 1136–1139. <https://doi.org/10.1128/aem.45.3.1136-1139.1983>
- Paz, A., Gonzalez, M., Ph, D., & Andrew, J. (2011). Código de barras de la vida: Introducción y perspectiva. *Acta Biológica Colombiana*, 16(3), 161–175.
- Pérez-Torrado, R., Llopis, S., Jespersen, L., Fernández-espinar, T., & Querol, A. (2012). Clinical *Saccharomyces cerevisiae* isolates cannot cross the epithelial barrier *in vitro*. *International Journal of Food Microbiology*, 157(1), 59–64. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.04.012>
- Pérez-Torrado, R., & Querol, A. (2016). Opportunistic Strains of *Saccharomyces cerevisiae*: A Potential Risk Sold in Food Products. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1–5. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01522>
- Peréz-Través, L., de Llanos, R., Flockhart, A., García-Domingo, L., Groenewald, M., Pérez-Torrado, R., & Querol, A. (2021). Virulence related traits in yeast species associated with food; *Debaryomyces hansenii*, *Kluyveromyces marxianus*, and

- Wickerhamomyces anomalus*. *Food Control*, 124(107901).
<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.107901>
- Pérez-Través, L., Lopes, C. A., Querol, A., & Barrio, E. (2014). On the complexity of the *Saccharomyces bayanus* taxon: Hybridization and potential hybrid speciation. *PLoS ONE*, 9(4), e93729. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0093729>
- Pestka, J. (2007). Deoxynivalenol: Toxicity, mechanisms and animal health risks. *Animal Feed Science and Technology - ANIM FEED SCI TECH*, 137, 283–298.
<https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2007.06.006>
- Pestka, J., & Smolinski, A. (2005). Deoxynivalenol: Toxicology and Potential Effects on Humans. *Journal of Toxicology and Environmental Health. Part B, Critical Reviews*, 8, 39–69. <https://doi.org/10.1080/10937400590889458>
- Petersson, S., & Schnurer, J. (1995). Erratum: Biocontrol of mold growth in high-moisture wheat stored under airtight conditions by *Pichia anomala*, *Pichia guilliermondii*, and *Saccharomyces cerevisiae* (Applied and Environmental Microbiology 61:3 (1029)). *Applied and Environmental Microbiology*, 61(4), 1677.
<https://doi.org/10.1128/aem.61.4.1677-1677.1995>
- Petruzzi, L., Bevilacqua, A., Baiano, A., Beneduce, L., Corbo, M. R., & Sinigaglia, M. (2014). Study of *Saccharomyces cerevisiae* W13 as a functional starter for the removal of ochratoxin A. *Food Control*, 35(1), 373–377.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.07.033>
- Pfliegler, W. P., Pusztahelyi, T., & Pócsi, I. (2015). Mycotoxins - prevention and decontamination by yeasts. *Journal of Basic Microbiology*, 55(7), 805–818.
<https://doi.org/10.1002/jobm.201400833>
- Piasecka-Jozwiak, K., & Chablowska, B. (2017). Anti-mold properties of yeast strains as a biological agent. *Journal of Research and Applications in Agricultural Engineering*, 62(4), 84–89.
- Pimenta, R. S., Alves, P. D., Correa Jr., A., Lachance, M. A., Prasad, G. S., Rajaram, Sinha, B. R., & Rosa, C. A. (2005). *Geotrichum silvicola* sp. nov., a novel asexual arthroconidial yeast species related to the genus *Galactomyces*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55, 497–501.
<https://doi.org/10.1099/ijs.0.63187-0>
- Pinotti, L., Ottoboni, M., Giromini, C., Dell'Orto, V., & Cheli, F. (2016). Mycotoxin Contamination in the EU Feed Supply Chain: A Focus on Cereal Byproducts. *Toxins*, 8(2). <https://doi.org/10.3390/toxins8020045>
- Pitt, J. I.; Hocking, A. D. (2009). *Fungi and Food Spoilage* (3° ed.). Springer.
- Pitt, J. I., & Hocking, A. D. (2022). *Fungi and Food Spoilage* (4° ed.). Springer.
<https://doi.org/10.1007/978-0-387-92207-2>

- Pitt, J., Wu, F., Gelderblom, W., Wild, C., Riley, R., Baan, R., & Miller, J. (2012). *Improving public health through mycotoxin control*.
- Pogačić, T., Šinko, S., Zamberlin, Š., & Samaržija, D. (2013). Microbiota of kefir grains. *Mljekarstvo*, 63(1), 3–14. <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84875201502&partnerID=40&md5=5e0dda4274c250edddaafc2c64c9cb56>
- Pottier, I., Gente, S., Vernoux, J. P., & Guéguen, M. (2008). Safety assessment of dairy microorganisms: *Geotrichum candidum*. *International Journal of Food Microbiology*, 126(3), 327–332. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.08.021>
- Price, M. F., Wilkinson, I. D., & Gentry, L. O. (1982). Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. *Sabouraudia: Journal of Medical and Veterinary Mycology*, 20(1), 7–14. <https://doi.org/10.1080/00362178285380031>
- Purutoğlu, K., İspirli, H., Yüzer, M. O., Serencam, H., & Dertli, E. (2020). Diversity and functional characteristics of lactic acid bacteria from traditional kefir grains. *International Journal of Dairy Technology*, 73(1), 57–66. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12633>
- Querol, A., Barrio, E., & Ramón, D. (1992). A Comparative Study of Different Methods of Yeast Strain Characterization. *Systematic and Applied Microbiology*, 15(3), 439–446. [https://doi.org/10.1016/S0723-2020\(11\)80219-5](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(11)80219-5)
- Quirós, M., Morales, P., Pérez-Través, L., Barcenilla, J. M., & Gonzalez, R. G. (2011). A new methodology to determine cell wall mannoprotein content and release in wine yeasts. *Food Chemistry*, 125(2), 1–28. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.08.066>
- Rahman, H. U., Yue, X., Yu, Q., Zhang, W., Zhang, Q., & Li, P. (2020). Current PCR-based methods for the detection of mycotoxigenic fungi in complex food and feed matrices. *World Mycotoxin Journal*, 13(2), 139–150. <https://doi.org/10.3920/WMJ2019.2455>
- Rajkowska, K., & Kunicka-Styczynska, A. (2010). Probiotic Properties of Yeasts Isolated from Chicken Feces and Kefirs. *Polish Journal of Microbiology*, 59(4), 257–263.
- Rankin, M. (2009). High Moisture Corn Harvest and Storage Considerations. *Board of Regents of the University of Wisconsin System*, 1–4.
- Raso, A., & Biassoni, R. (2020). A Quarter Century of PCR-Applied Techniques and Their Still-Increasing Fields of Use. En *Quantitative Real-time PCR: Methods and Protocols* (2° ed.). Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9833-3_1
- Rastogi, S., Dogra, R. K. S., Khanna, S. K., & Das, M. (2006). Skin tumorigenic potential of aflatoxin B1 in mice. *Food and Chemical Toxicology*, 44(5), 670–677. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fct.2005.09.008>

- Rivera, M. C., & Wright, E. R. (2014). Control biológico de enfermedades de plantas en Argentina. En *Control Biológico de Enfermedades de Plantas en América Latina y el Caribe*. <https://doi.org/10.13140/2.1.2368.5922>
- Rizzo, I., Lori, G., Vedoya, G., Carranza, M., Haidukowski, M., Varsavsky, E., Frade, H., Chiale, C., & Alippi, H. (1997). Sanitary factors and mycotoxin contamination in the argentinian wheat crop 1993/94. *Mycotoxin Research*, 13(2), 67–72. <https://doi.org/10.1007/BF02945068>
- Robert, V., & Casadevall, A. (2009). Vertebrate Endothermy Restricts Most Fungi as Potential Pathogens. *The Journal of Infectious Diseases*, 200, 1623–1626. <https://doi.org/10.1086/644642>
- Rodríguez, A., Rodríguez, M., Luque, M. I., Martín, A., & Córdoba, J. J. (2012). Real-time PCR assays for detection and quantification of aflatoxin-producing molds in foods. *Food Microbiology*, 31(1), 89–99. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.02.009>
- Romanelli, A. M., Fu, J., Herrera, M. L., & Wickes, B. L. (2014). A universal DNA extraction and PCR amplification method for fungal rDNA sequence-based identification. *Mycoses*, 57(10), 612–622. <https://doi.org/10.1111/myc.12208>
- Roumani, F., Azinheiro, S., Rodrigues, C., Barros-Velázquez, J., Garrido-Maestu, A., & Prado, M. (2022). Development of a real-time PCR assay with an internal amplification control for the detection of spoilage fungi in fruit preparations. *Food Control*, 135, 108783. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108783>
- Ruiz, M.J., Macáková, P., Juan Garcia, A., & Font, G. (2011). Cytotoxic effects of mycotoxin combinations in mammalian kidney cells. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 49, 2718–2724. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2011.07.021>
- Rychlik, M. (2012). Mycotoxins in foods. En *Chemical Contaminants and Residues in Food*. Woodhead Publishing.
- Sacristán, N., González, L., Castro, J. M., Fresno, J. M., & Tornadijo, M. E. (2012). Technological characterization of *Geotrichum candidum* strains isolated from a traditional Spanish goats' milk cheese. *Food Microbiology*, 30(1), 260–266. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2011.10.003>
- Sacristán Vega, N. (2015). *Selección de cepas de Geotrichum candidum aisladas de quesos artesanales con vistas a la obtención de co-cultivos de interés tecnológico para la elaboración de quesos*. Universidad de León.
- Sadiq, F. A., Yan, B., Tian, F., Zhao, J., Zhang, H., & Chen, W. (2019). Lactic Acid Bacteria as Antifungal and Anti-Mycotoxigenic Agents: A Comprehensive Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 18(5), 1403–1436.

- <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/1541-4337.12481>
- Sampaolesi, S. (2020). *Estudio de las propiedades tecnológicas, antimicrobianas, antifúngicas y secuestrantes de aflatoxina de los subproductos de la industria cervecera artesanal y su potencial como aditivo en la alimentación para aves*. Universidad Nacional de La Plata.
- Sarıçiçek, B. Z., Yildirim, B., Kocabaş, Z., & Özgümüş Demir, E. (2016). The Effects of Storage Time on Nutrient Composition and Silage Quality Parameters of Corn Silage Made in Plastic Mini Silo in Laboratory Conditions. *Journal of the Institute of Science and Technology*, 6(3), 177–177.
<https://doi.org/10.21597/jist.2016321853>
- Sarikkha, P., Nitorisavut, R., & Poljungreed, I. (2015). Identification of bacteria and yeast communities in a Thai sugary kefir by Polymerase Chain Reaction-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (PCR-DGGE) analyses. *The Journal of Industrial Technology*, 11(2), 25–39.
- Schaible, U. E., & Kaufmann, S. H. (2005). A nutritive view on the host-pathogen interplay. *Trends in Microbiology*, 13(8), 373–380.
<https://doi.org/doi:10.1016/j.tim.2005.06.009>
- Schalchli, H., Hormazabal, E., Becerra, J., Birkett, M., Marysol, A., Vidal, J., & Quiroz, A. (2011). Antifungal activity of volatile metabolites emitted by mycelial cultures of saprophytic fungi. *Chemistry and Ecology*, 27, 503–513.
<https://doi.org/10.1080/02757540.2011.596832>
- Schmidt-Heydt, M., Magan, N., & Geisen, R. (2008). Stress induction of mycotoxin biosynthesis genes by abiotic factors. *FEMS Microbiology Letters*, 284(2), 142–149. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2008.01182.x>
- Schollenberger, M., Lauber, U., Jara, H. T., Suchy, S., Drochner, W., & Müller, H.-M. (1998). Determination of eight trichothecenes by gas chromatography–mass spectrometry after sample clean-up by a two-stage solid-phase extraction. *Journal of Chromatography A*, 815(1), 123–132.
[https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(98\)00454-3](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0021-9673(98)00454-3)
- Schwadorf, K., & Müller, H.-M. (1991). Determination of trichothecenes in cereals by gas chromatography with ion trap detection. *Chromatographia*, 32(3), 137–142.
<https://doi.org/10.1007/BF02325016>
- Seifert, K. A. (2009). Progress towards DNA barcoding of fungi. *Molecular Ecology Resources*, 9, 83–89. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2009.02635.x>
- SENASA, Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (1999). Resolución-350-1999-SENASA. <http://www.senasa.gob.ar/normativas/resolucion-350-1999-senasa-servicio-nacional-de-sanidad-y-calidad-agroalimentaria>

- Serna-Saldivar, S. O. (2018). *Corn: Chemistry and Technology* (3° ed.). Elsevier
- Sharma, R. R., Singh, D., & Singh, R. (2009). Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists: A review. *Biological Control*, 50(3), 205–221. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2009.05.001>
- Shirima, C., Kimanya, M., Kinabo, J., Routledge, M., Srey, C., Wild, C., & Gong, Y. Y. (2013). Dietary exposure to aflatoxin and fumonisin among Tanzanian children as determined using biomarkers of exposure. *Molecular Nutrition & Food Research*, 57. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201300116>
- Shotwell, O. L. (1977). Aflatoxin in corn. *Journal of American Oil Chemists Society*, 54(3), 216–224.
- Shweta, S., Madhavan, S., Paranidharan, V., & Velazhahan, R. (2013). Detection of *Aspergillus flavus* in maize kernels by conventional and real-time PCR assays. *International Food Research Journal*, 20(6), 3329–3335.
- Silva, K. R., Rodrigues, S. A., Filho, L. X., & Lima, Á. S. (2009). Antimicrobial activity of broth fermented with kefir grains. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 152(2), 316–325. <https://doi.org/10.1007/s12010-008-8303-3>
- Singh, R., Gupta, N., Goswami, V. K., & Gupta, R. (2006). A simple activity staining protocol for lipases and esterases. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 70(6), 679–682. <https://doi.org/10.1007/s00253-005-0138-z>
- Siri-anusornsak, W., Kolawole, O., Mahakarnchanakul, W., Greer, B., Petchkongkaew, A., Meneely, J., Elliott, C., & Vangnai, K. (2022). The Occurrence and Co-Occurrence of Regulated, Emerging, and Masked Mycotoxins in Rice Bran and Maize from Southeast Asia. *Toxins*, 14(8), 1–18. <https://doi.org/10.3390/toxins14080567>
- Smerak, P., Barta, I., Polivkova, Z., Bartova, J., & Sedmikova, M. (2001). Mutagenic effects of selected trichothecene mycotoxins and their combinations with aflatoxin B1. *Czech Journal of Food Sciences*, 19(3), 90–96. <https://cifs.agriculturejournals.cz/artkey/cjf-200103-0003.php>
- Smith, J. (1997). Aflatoxins. En *Handbook of Plant and Fungal Toxicants*. CRC Press.
- Smith, L., Stasiewicz, M., Hestrin, R., Morales, L., Mutiga, S., & Nelson, R. (2016). Examining environmental drivers of spatial variability in aflatoxin accumulation in Kenyan maize: Potential utility in risk prediction models. *African Journal of Food, Agriculture, Nutrition and Development*, 16(3), 11086–11105.
- Sorenson, W. G. (1999). Fungal spores: hazardous to health? *Environmental Health Perspectives*, 107(suppl 3), 469–472. <https://doi.org/10.1289/ehp.99107s3469>
- Sorrentino, E., Tremonte, P., Succi, M., Iorizzo, M., Pannella, G., Lombardi, S. J., Sturchio, M., & Coppola, R. (2018). Detection of Antilisterial Activity of 3-

- Phenyllactic Acid Using *Listeria innocua* as a Model. *Frontiers in Microbiology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01373>
- Spadaro, D., & Droby, S. (2016). Development of biocontrol products for postharvest diseases of fruit: The importance of elucidating the mechanisms of action of yeast antagonists. *Trends in Food Science & Technology*, 47, 39–49. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.11.003>
- Stadie, J. (2013). *Metabolic activity and symbiotic interaction of bacteria and yeasts in water kefir*. Universidad de München
- Stoev, S. D. (2008). Complex Etiology, Prophylaxis and Hygiene Control in Mycotoxic Nephropathies in Farm Animals and Humans. *International Journal of Molecular Sciences*, 9(4), 578–605. <https://doi.org/10.3390/ijms9040578>
- Stoev, S. D. (2013). Food Safety and Increasing Hazard of Mycotoxin Occurrence in Foods and Feeds. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 53(9), 887–901. <https://doi.org/10.1080/10408398.2011.571800>
- Stoloff, L. (1977). Aflatoxins - an overview. En *Mycotoxins in Human and Animal Health*. Pathotox Publishers.
- Suanthie, Y., Cousin, M., & Woloshuk, C. (2009). Multiplex real-time PCR for detection and quantification of mycotoxigenic *Aspergillus*, *Penicillium* and *Fusarium*. *Journal of Stored Products Research*, 45, 139–145. <https://doi.org/10.1016/j.jspr.2008.12.001>
- Taheur, F. Ben, Fedhila, K., Chaieb, K., Kouidhi, B., Bakhrouf, A., & Abrunhosa, L. (2017). Adsorption of aflatoxin B1, zearalenone and ochratoxin A by microorganisms isolated from Kefir grains. *International Journal of Food Microbiology*, 251, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.03.021>
- Taheur, F. Ben, Kouidhi, B., Al Qurashi, Y. M. A., Salah-Abbès, J. Ben, & Chaieb, K. (2019). Review: Biotechnology of mycotoxins detoxification using microorganisms and enzymes. *Toxicon*, 160, 12–22. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2019.02.001>
- Taheur, F. Ben, Mansour, C., & Chaieb, K. (2020). Inhibitory effect of kefir on *Aspergillus* growth and mycotoxin production. *Euro-Mediterranean Journal for Environmental Integration*, 5(1), 1–8. <https://doi.org/10.1007/s41207-020-0141-x>
- Tamura, K., Stecher, G., & Kumar, S. (2021). MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Molecular Biology and Evolution*, 38(7), 3022–3027. <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>
- Tang, H., Wang, H. U. A., Yu, H., Piao, C., Liu, J., & Hu, Y. (2016). *Galactomyces geotrichum* Isolated From Water Kefir: Interaction with *Lactobacillus kefir*. *Italian Journal of Food Science*, 28, 287–298.
- Tenorio-Salgado, S., Castelán-Sánchez, H. G., Dávila-Ramos, S., Huerta-Saquero, A.,

- Rodríguez-Morales, S., Merino-Pérez, E., Roa de la Fuente, L. F., Solis-Pereira, S. E., Pérez-Rueda, E., & Lizama-Uc, G. (2021). Metagenomic analysis and antimicrobial activity of two fermented milk kefir samples. *MicrobiologyOpen*, 10(2), 1–19. <https://doi.org/10.1002/mbo3.1183>
- Thomas, P., Sekhar, A. C., Upreti, R., Mujawar, M. M., & Pasha, S. S. (2015). Optimization of single plate-serial dilution spotting (SP-SDS) with sample anchoring as an assured method for bacterial and yeast CFU enumeration and single colony isolation from diverse samples. *Biotechnology Reports*, 8, 45–55. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2015.08.003>
- Timar, A. V. (2010). Comparative Study of Kefir Lactic Microflora. *Anale Le Universității din Oradea Fascicula: Ecotoxicologie, Zootehnie si Tehnologii de Industrie Alimentară*, 847-858.
- Tolosa Chelós, J. (2017). *Evaluación de la presencia de micotoxinas en alimentos y piensos y sus micotoxinas*. Universidad de Valencia.
- Trucksess, M. W., Nesheim, S., & Eppley, R. M. (1984). Thin layer chromatographic determination of deoxynivalenol in wheat and corn. *Association of Official Analytical Chemists*, 67(1), 40–43.
- Turner, P. C., Collinson, A. C., Cheung, Y. B., Gong, Y., Hall, A. J., Prentice, A. M., & Wild, C. P. (2007). Aflatoxin exposure in utero causes growth faltering in Gambian infants. *International Journal of Epidemiology*, 36(5), 1119–1125. <https://doi.org/10.1093/ije/dym122>
- Tyska, D., Mallmann, A., Vidal, J. K., Simões, C. T., & Mallmann, C. (2022). Near-infrared spectroscopy to assess mycotoxins contamination and nutritional composition of maize marketed in South America, years 2020-2021. *World Mycotoxin Journal*, 16, 1–12. <https://doi.org/10.3920/WMJ2022.2774>
- Vaamonde, G. (1996). Micotoxinas. En *Toxicología de los alimentos* (2° ed.). Hemisferio Sur.
- Van Burik, J. H., & Magee, P. T. (2001). Aspects of Fungal Pathogenesis in Humans. *Annual Reviews in Microbiology*, 55(1), 743–772. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.55.1.743>
- Vero, S., Garmendia, G., González, M. B., Bentancur, O., & Wisniewski, M. (2013). Evaluation of yeasts obtained from Antarctic soil samples as biocontrol agents for the management of postharvest diseases of apple (*Malus × domestica*). *FEMS Yeast Research*, 13(2), 189–199. <https://doi.org/10.1111/1567-1364.12021>
- Vidotto, V., Koga-Ito, C. Y., Canella, D., Sinicco, A., Di Perri, G., Aoki, S., & Ito-Kuwa, S. (2000). Extracellular activity in *Cryptococcus neoformans* strains isolated from AIDS patients and from environmental sources. *Revista Iberoamericana de*

- Micologia*, 17(1), 14–19.
- Vila-Donat, P., Marín, S., Sanchis, V., & Ramos, A. J. (2018). A review of the mycotoxin adsorbing agents, with an emphasis on their multi-binding capacity, for animal feed decontamination. *Food and Chemical Toxicology*, 114, 246–259. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.02.044>
- Waldherr, F. W., Doll, V. M., Meißner, D., & Vogel, R. F. (2010). Identification and characterization of a glucan-producing enzyme from *Lactobacillus hilgardii* TMW 1.828 involved in granule formation of water kefir. *Food Microbiology*, 27(5), 672–678. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.03.013>
- Wang, L., Wu, J., Liu, Z., Shi, Y., Liu, J., Xu, X., Hao, S., Mu, P., Deng, F., & Deng, Y. (2019). Aflatoxin B1 Degradation and Detoxification by *Escherichia coli* CG1061 Isolated From Chicken Cecum. *Frontiers in Pharmacology*, 9, 1–9. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.01548>
- Wang, Y., Wang, P., Xia, J., Yu, T., Lou, B., Wang, J., & Zheng, X. D. (2010). Effect of water activity on stress tolerance and biocontrol activity in antagonistic yeast *Rhodosporidium paludigenum*. *International Journal of Food Microbiology*, 143(3), 103–108. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.07.035>
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. En *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press.
- Wielogórska, E., MacDonald, S., & Elliott, C. (2016). A review of the efficacy of mycotoxin detoxifying agents used in feed in light of changing global environment and legislation. *World Mycotoxin Journal*, 9, 419–433. <https://doi.org/10.3920/WMJ2015.1919>
- Williams, J. H., Phillips, T. D., Jolly, P. E., Stiles, J. K., Jolly, C. M., & Aggarwal, D. (2004). Human aflatoxicosis in developing countries: a review of toxicology, exposure, potential health consequences, and interventions. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 80(5), 1106–1122. <https://doi.org/https://doi.org/10.1093/ajcn/80.5.1106>
- Wisniewski, M., Biles, C., Droby, S., McLaughlin, R., Wilson, C., & Chalutz, E. (1991). Mode of action of the postharvest biocontrol yeast, *Pichia guilliermondii*. I. Characterization of attachment to *Botrytis cinerea*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 39, 245–258. [https://doi.org/10.1016/0885-5765\(91\)90033-E](https://doi.org/10.1016/0885-5765(91)90033-E)
- Wisniewski, M., Wilson, C., Droby, S., Chalutz, E., Ghaouth, A. El, & Stevens, C. (2007). Postharvest biocontrol: New concepts and applications. *Biological Control: A Global Perspective*, August, 262–273. <https://doi.org/10.1079/9781845932657.0262>

- Witthuhn, R. C., Schoeman, T., & Britz, T. J. (2005). Characterisation of the microbial population at different stages of Kefir production and Kefir grain mass cultivation. *International Dairy Journal*, 15(4), 383–389.
<https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2004.07.016>
- Wu, Z. W., Wang, Q. M., Liu, X. Z., & Bai, F. Y. (2016). Intragenomic polymorphism and intergenomic recombination in the ribosomal RNA genes of strains belonging to a yeast species *Pichia membranifaciens*. *Mycology*, 7(3), 102–111.
<https://doi.org/10.1080/21501203.2016.1204369>
- Wuczowski, M., Bond, C., & Prillinger, H. (2006). *Geotrichum vulgare* sp. nov., a novel asexual arthroconidial yeast. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56(1), 301–303. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63671-0>
- Xu, F., Baker, R. C., Whitaker, T. B., Luo, H., Zhao, Y., Stevenson, A., Boesch, C. J., & Zhang, G. (2022). Review of good agricultural practices for smallholder maize farmers to minimise aflatoxin contamination. *World Mycotoxin Journal*, 15(2), 171–186. <https://doi.org/10.3920/WMJ2021.2685>
- Yadav, P., Chauhan, A. K., Singh, R. B., Khan, S., & Halabi, G. (2022). Organic acids: microbial sources, production, and applications. En *Functional Foods and Nutraceuticals in Metabolic and Non-Communicable Diseases* (1st ed., Issue December 2021, pp. 325–337). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-819815-5.00053-7>
- Yang, Y. L. (2003). Virulence factors of *Candida* species. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 36(4), 223–228.
- Yeast-Id, <http://yeast-id.com>
- Yiannikouris, A., François, J., Poughon, L., Dussap, C. G., Bertin, G., Jeminet, G., & Jouany, J. P. (2004). Alkali extraction of β -D-glucans from *Saccharomyces cerevisiae* cell wall and study of their adsorptive properties toward zearalenone. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(11), 3666–3673.
<https://doi.org/10.1021/jf035127x>
- Yu, J., Cleveland, T. E., Nierman, W. C., & Bennett, J. W. (2005). *Aspergillus flavus* genomics: gateway to human and animal health, food safety, and crop resistance to diseases. *Revista Iberoamericana de Micología*, 22(4), 194–202.
[https://doi.org/10.1016/s1130-1406\(05\)70043-7](https://doi.org/10.1016/s1130-1406(05)70043-7).
- Zain, M. E. (2011). Impact of mycotoxins on humans and animals. *Journal of Saudi Chemical Society*, 15(2), 129–144.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jscs.2010.06.006>
- Zajc, J., Gostinčar, C., Černoša, A., & Gunde-Cimerman, N. (2019). Stress-tolerant yeasts: Opportunistic pathogenicity versus biocontrol potential. *Genes*, 10(1).

<https://doi.org/10.3390/genes10010042>

- Zhang, H., Lee, T. A. J., Waalwijk, C., Chen, W., Xu, J., Jingsheng, X., Zhang, Y., & Feng, J. (2012). Population Analysis of the *Fusarium graminearum* Species Complex from Wheat in China Show a Shift to More Aggressive Isolates. *PLoS One*, 7, e31722. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031722>
- Zhang, X., Li, C., Xue, B., Ji, P., Li, Y., Sun, L., & Wang, S. (2022). Development of a Rapid Sporulation Method of *Fusarium graminearum* Using Liquid Cultivation. *Plant Disease*, 106(1), 34–38. <https://doi.org/10.1094/PDIS-05-21-0911-SR>
- Zhimo, V. Y., Biasi, A., Kumar, A., Feygenberg, O., Salim, S., Vero, S., Wisniewski, M., & Droby, S. (2020). Yeasts and Bacterial Consortia from Kefir Grains Are Effective Biocontrol Agents of Postharvest Diseases of Fruits. *Microorganisms*, 8(3), 428. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8030428>

VII. PRODUCCIÓN CIENTÍFICA

A continuación se enumeran las publicaciones obtenidas a partir de la presente tesis doctoral y de colaboraciones realizadas durante su transcurso:

- Moure, M.C., Pérez Torrado, R., Garmendia, G., Vero, S., Querol, A., Alconada, T., León Peláez, A. (2022). Characterization of kefir yeasts with antifungal capacity against *Aspergillus* species. *International Microbiology*, <https://doi.org/10.1007/s10123-022-00296-z>
- Alconada, T. M., Moure, M. C. (2022). Deterioration of lipids in stored wheat grains by environmental conditions and fungal infection – A review. *Journal of Stored Products Research*, 95, 101914, ISSN 0022-474X, <https://doi.org/10.1016/j.jspr.2021.101914>.
- Moretti, A.F., Moure, M.C., Quiñoy, F., Espósito F., Simonelli, N., Medrano, M., León Peláez, A. (2022). Water kefir, a fermented beverage containing probiotic microorganisms: from ancient and artisanal manufacture to industrialized and regulated commercialization. *Future Foods*, 100123, ISSN 2666-8335, <https://doi.org/10.1016/j.fufo.2022.100123>
- Ortega, L. M., Romero, L., Moure, M.C., Garmendia, G., Ramírez Albuquerque, D., Fernández Pinto, V., Vero, S., Alconada, T.M. (2019). Effect of moisture on wheat grains lipid patterns and infection with *Fusarium graminearum*. *International Journal of Food Microbiology*, 306, <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108264>
- Ortega, L., Moure, M.C., Astoreca, A., Alberione, E., Alconada, T. (2019). Wheat Grains Damaged by *Fusarium graminearum*: Alterations in Yield, Toxicity and Protein Composition. *Vegetos: An International Journal of Plant Research and Biotechnology*, <https://doi.org/10.1007/s42535-019-00055-y>
- Alconada, T.M., Moure, M. C., Ortega, L.M. (2019). *Fusarium* Infection in Wheat, Aggressiveness and Changes in Grain Quality: A Review. *Vegetos: An International Journal of Plant Research and Biotechnology*, <https://doi.org/10.1007/s42535-019-00054-z>
- Ortega, L.M., Moure, M.C., González, E.M., Alconada, T.M. (2018). Wheat storage proteins: changes on the glutenins after wheat infection with different isolates of *Fusarium graminearum*. *International Microbiology*, 1–8, <https://doi.org/10.1007/s10123-018-00048-y>

VIII. ANEXOS

Anexo I: Soluciones, caldos y medios de cultivo

Caldo/Agar^a YPD	
Extracto de levadura (Biokar Diagnostics, Francia)	10 g/l
Peptona (Britania, Argentina)	20 g/l
Glucosa (Cicarelli, Argentina)	20 g/l
Agar agar ^a (Britania, Argentina)	20 g/l
Caldo/Agar^a extracto de malta (MEA)	
Extracto de malta (Biokar Diagnostics, Francia)	10 g/l
Extracto de levadura	20 g/l
Agar agar ^a	20 g/l
Caldo YES	
Sacarosa	150 g/l
Extracto de levadura	20 g/l
Agar papa (PDA, Biokar Diagnostics, Francia)	
Extracto de papa	4 g/l
Glucosa	20 g/l
Agar agar	15 g/l
Agar YGC (Biokar Diagnostics, Francia)	
Extracto de levadura	5 g/l
Glucosa	20 g/l
Cloranfenicol	0,1 g/l
Agar agar	15 g/l
Agar YNB	
YNB (Yest Nitrogen Base, BD Difco TM) ^b	6,7 g/l
Agar agar	20 g/l
Agar MRS (Biokar Diagnostics, Francia)	
Peptona	20 g/l
Extracto de levadura	5 g/l
Glucosa	20 g/l
Tween 80	1,08 g/l
K ₂ HPO ₄	2 g/l
Acetato de sodio	5 g/l
Citrato de amonio	2 g/l

Sulfato de magnesio	0,2 g/l
Sulfato de manganeso	0,05 g/l
Agar agar	20 g/l
Agar Sabouraud glucosado (Merk, Alemania)	
Peptona de caseína	5 g/l
Peptona de carne	5 g/l
D(+)-Glucosa	40 g/l
Agar agar	15 g/l
Agar agua	
Agar agar	2 g/l
Lugol	
I ₂	10 g/l
KI	20 g/l
Solución de esporas	
Lauril Sulfato de Sodio (Merck, Darmstadt, Alemania)	0,1 g/l
Glucosa	10 g/l
Solución fisiológica	
NaCl (Anedra, Argentina)	8,5 g/l
Buffer PBS	
NaCl	8,02 g/l
KCl (Anedra, Argentina)	0,23 g/l
Na ₂ HPO ₄ (Anedra, Argentina)	1,17 g/l
KH ₂ PO ₄ (Anedra, Argentina)	0,2 g/l
Solución de azúcares no refinados	
Azúcar de mascabo/Chancaca/Miel de caña	4,5 g/l
Solución gástrica	
NaCl	7,25 g/l
KCl	0,52 g/l
NaHCO ₃ (Britania, Argentina)	3,8 g/l
Pepsina porcina ^c (Sigma-Aldrich, Estados Unidos)	3 g/l
Solución intestinal	
NaCl	1,3 g/l
KCl	0,25 g/l
NaHCO ₃	0,65 g/l
Pancreatina porcina ^c (Sigma-Aldrich, Estados Unidos)	1 g/l
Sales biliares ^c (Britania, Argentina)	70 g/l

Cultivo celular	
DMEM (Dulbecco Modified Eagle's Medium, HIMEDIA, India)	500ml
Suero fetal bovino inactivado ^d (VWR, EEUU)	10 % (v/v)
Aminoácidos no esenciales (Invitrogen, Gibco)	1 % (v/v)
Gentamicina (Invitrogen, Gibco)	50 µg/ml

^a Se agregó agar agar para obtener el medio sólido.

^b El caldo YNB se preparó 10X en agua destilada y se esterilizó por filtración, para luego agregárselo al agar agar que se preparó 2X en agua destilada y se esterilizó a 121 °C por 15 min.

^c Se esterizaron por filtración con membranas de 0,22 µm de tamaño de poro.

^d El suero se inactivo térmicamente a 56 °C por 30 min.

Anexo II: Primers

Región génica	Primer	Nombre	Secuencia
<i>GSY1</i>	Foward		5'-ATTGGAAAAAGAATTTTCGAGCAYACRATGAG-3'
	Reverse		5'-AATTTCTTGCCACCGGCAAGGGTATTCATATT-3'
<i>MAG2</i>	Foward		5'-ATGGTAGAACCGGATATGCAGAARAARGC-3'
	Reverse		5'-AGCTCCAAGGAATTAGATACACCRCAYTTCAT-3'
D1/D2	Foward	NL1	5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3'
	Reverse	NL4	5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3'
ITS1/ITS2	Foward	ITS1	5'- TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'
	Reverse	ITS4	5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'
Inespecífico		M13	5'-GAGGGTGGCGGTTCT-3'
<i>omt-A</i>	Foward		5'-GACCAATACGCCACACAG-3'
	Reverse		5'-CTTTGGTAGCTGTTTCTCGC-3'