



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

## Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

POTENCIAL PROBIÓTICO DE LEVADURAS AISLADAS DEL ATOLE AGRIO DE  
VILLAHERMOSA, TABASCO

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

Q.A. RICARDO MANRIQUE DORRONSORO

TUTOR PRINCIPAL

DRA. MA. DEL CARMEN WACHER RODARTE  
Facultad de Química

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

DR. AGUSTÍN LÓPEZ MUNGUÍA CANALES  
Instituto de Biotecnología

DR. FRANCISCO RUIZ TERÁN  
Facultad de Química

Ciudad de México. Mayo, 2017



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **Agradecimientos**

Al programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), por la formación académica.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada (CVU 588441) para realizar mis estudios de maestría.

A mi tutor:

Dra. María del Carmen Wachter Rodarte (FQ, UNAM).

A los miembros del comité tutor:

Dr. Agustín López Munguía (IBT, UNAM).

Dr. Francisco Ruíz Terán (FQ, UNAM).

A los integrantes del jurado de examen:

Dra. Amelia Farrés González Sarabia (FQ, UNAM).

Dr. José Mariano García Garibay (FQ, UNAM).

Dra. Teresita del Rosario Sainz Espuñes (UAM Xochimilco).

Dra. María de los Dolores Reyes Duarte (UAM Cuajimalpa).

Dr. José Adelfo Escalante Lozada (IBT, UNAM).

A mi tutora del subprograma 121:

Dra. Patricia Severiano Pérez (FQ, UNAM).

A la Dra Gloria Díaz Ruíz por su apoyo con la revisión del manuscrito de la tesis y por el apoyo técnico en los ensayos microbiológicos.

A la Biol. María Teresa Flores Espinoza por su apoyo durante la realización de este proyecto.

A la Dra. Rebeca Ramírez Carrillo por su apoyo con el análisis estadístico.

Al Dr. Jorge Santiago Urbina por el apoyo técnico durante la identificación de las levaduras.

Al Q.F.B. Alejandro Camacho Cruz y la Q.F.B. María Antonieta Silva Chávez del cepario de la Facultad de Química por las cepas proporcionadas.

A todas las personas que me ayudaron durante la realización de los experimentos: Dra. Dolores Reyes Duarte, Carlina Peña García, Bertha Julieta Sandoval Guillén, Dr. José Fausto Rivero Cruz, Dra. Carolina Peña, QFB Laurel Elidé Fabila y Mariana Ramírez.

A las asistentes de procesos del programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas:

Leticia García Gutiérrez

Adelina González Pérez

A todos mis compañeros del laboratorio 324.

A todos mis colegas de los laboratorios 105, 106, 111, 312, 313, 321 y 323.

A todos mis familiares y amigos que compartieron conmigo esta etapa de mi vida.

# Índice

1	Resumen.....	1
2	Introducción .....	3
3	Antecedentes .....	5
3.1	Alimentos fermentados de maíz.....	5
3.2	Atoles fermentados de maíz que se consumen en México .....	5
3.3	Atole agrio de dobla .....	6
3.4	Probióticos.....	9
3.4.1	Levaduras probióticas .....	11
3.4.1.1	Saccharomyces cerevisiae var. boulardii.....	14
3.4.2	Métodos más empleados para evaluar el potencial probiótico de bacterias y levaduras.....	15
3.4.2.1	Biopelículas.....	15
3.4.2.2	Métodos de simulación del tracto digestivo .....	16
4	Justificación .....	18
5	Hipótesis .....	18
6	Objetivos .....	19
6.1	Objetivo general.....	19
6.2	Objetivos particulares .....	19
7	Estrategia experimental .....	20
8	Materiales y métodos.....	21
8.1	Recuperación y conservación de aislados .....	21
8.2	Clasificación morfológica.....	21
8.3	Identificación de los aislados .....	22
8.3.1	Extracción de ADN.....	22
8.3.2	Reacción en Cadena de la Polimerasa .....	23
8.3.3	Amplificación aleatoria de ADN polimórfico .....	23
8.3.4	Análisis de restricción.....	25
8.3.5	Purificación de productos de PCR.....	25
8.3.6	Secuenciación .....	25
8.4	Determinación del potencial probiótico .....	25
8.4.1	Crecimiento a 37 °C.....	25
8.4.2	Curvas de crecimiento células vs. densidad óptica .....	26

8.4.3	Crecimiento en pH ácido.....	26
8.4.4	Crecimiento en presencia de sales biliares.....	27
8.4.5	Actividad antimicrobiana .....	27
8.4.6	Formación de biopelícula.....	28
8.4.7	Resistencia al paso sucesivo a través del tracto gastrointestinal.....	29
8.5	Análisis estadístico.....	30
9	Resultados y discusión .....	31
9.1	Recuperación de aislados y clasificación morfológica.....	31
9.2	Identificación de aislados .....	33
9.3	Crecimiento a 37 °C.....	38
9.4	Crecimiento en pH ácido .....	40
9.5	Crecimiento en presencia de sales biliares.....	41
9.6	Actividad antimicrobiana.....	43
9.7	Formación de biopelícula .....	46
9.8	Simulación del paso sucesivo a través del tracto gastrointestinal.....	49
10	Conclusiones .....	54
11	Perspectivas .....	55
12	Referencias.....	56
13	Anexos.....	67
13.1	Claves originales de las cepas.....	67
13.2	Medios de cultivo.....	69
13.3	Reactivos .....	70
13.4	Información complementaria .....	71
13.4.1	Observaciones levaduras .....	71
13.4.2	Secuencias de ADN.....	72
13.4.3	Cuenta en placa 37 °C .....	74
13.4.4	Análisis estadístico pH y SB.....	75
13.4.5	0.5 % sales biliares .....	78
13.4.6	Curvas de crecimiento células vs. Densidad óptica .....	79
13.4.7	Análisis estadístico formación de biopelícula .....	81
13.4.8	Simulación del paso sucesivo a través del tracto gastrointestinal.....	82

## 1 Resumen

El atole agrio es una bebida fermentada no alcohólica a base de maíz que se produce en el sureste de México. Se elabora de manera tradicional sin añadir ningún inóculo, por lo tanto, la microbiota que participa en el proceso de fermentación es compleja. Está conformada por bacterias, hongos y levaduras. Se conoce poco sobre ella, pero hasta el momento se han identificado algunas bacterias lácticas (Valderrama, 2012), enterobacterias (Esquivel, 2012; Esquivel, 2016) y levaduras presentes durante la fermentación. Estas últimas son principalmente *Pichia kudriavzevii* y *Clavispora lusitaniae* y algunas especies de los géneros *Trichosporon* y *Candida* (Cocconceli, 2013).

El objetivo de este proyecto es determinar el potencial probiótico *in vitro* de las levaduras que participan en la fermentación del atole agrio. El primer paso fue determinar viabilidad y pureza de los 44 aislados de muestreos de los años 2010, 2011 y 2012 conservados a -70 °C. Se agruparon de acuerdo a sus características macroscópicas, microscópicas y a los resultados de los perfiles de sus polimorfismos de fragmentos de restricción de la región 5.8S-ITS. Se seleccionó una cepa de cada perfil y se secuenció el dominio D1/D2 del ADNr 26S. La mayoría fueron identificadas como *Candida intermedia* (9 aislados), *Pichia kudriavzevii* (5 aislados) y *Clavispora lusitaniae* (4 aislados). Además, se encontraron *Candida parapsilosis* (1 aislado) y hongos saprófitos del maíz como *Ustilago longissima*, *U. esculenta*, *Pseudozyma parantártica* y *Moesziomyces bullatus*.

Posteriormente se evaluó el crecimiento a 37 °C, que es una temperatura no óptima para la mayoría de las levaduras y es un requisito indispensable para realizar las pruebas posteriores. Todos los aislados excepto los hongos saprófitos fueron capaces de crecer a esta temperatura. Las mayores cuentas se obtuvieron para *P. kudriavzevii* con resultados de hasta  $1 \times 10^{11}$  UFC/mL después de 72 h en caldo YPD. Con base en los resultados obtenidos, se seleccionaron *P. kudriavzevii* (5 aislados) y *Clavispora lusitaniae* (4 aislados) para la etapa de caracterización como probióticos: resistencia a pH ácido y sales biliares. Para todas las pruebas se utilizó *S. boulardii* (Sb) como control aislada del suplemento alimenticio Floratil® (Merck) por ser la única levadura probiótica comercial en la actualidad.

Los 9 aislados fueron capaces no sólo de resistir, sino de crecer en pH 2.5 y en presencia de 1.5 % (m/v) de sales biliares. Los resultados fueron analizados mediante un análisis de varianza y la prueba de rangos de Duncan. Se observó que, a las 24 horas de fermentación, la cepa 39 es la que mejor crece en presencia de 1.5 % de sales biliares y la cepa 37 la que mejor crece a pH 2.5. Para complementar los resultados, se realizó una prueba de hidrólisis de las sales biliares y se encontró que ninguno de los aislados tiene esta habilidad. Por ser las que mejor crecieron,

se seleccionaron las cepas 37 y 39 (*C. lusitaniae*) pero también se utilizaron las cepas 8 y 41 (*P. kudriavzevii*) porque tuvieron las mayores cuentas de esa especie para evaluar el potencial antimicrobiano.

Se probó la actividad antimicrobiana de las 4 cepas mencionadas anteriormente contra algunos patógenos presentes en alimentos: *E. coli* O157:H10 (EHEC), *Salmonella enterica* Typhimurium ATCC 14028, *Listeria monocytogenes* CFQ-103 (Facultad de de Química, UNAM), *S. aureus* ATCC 25923 y *Bacillus cereus* ATCC 11778; además se probaron contra *Candida albicans* ATCC 14053 por ser la levadura patógena de mayor importancia clínica. No se encontró inhibición contra ninguno de los microorganismos mencionados. Adicionalmente se evaluó la formación de biopelícula. Para esta prueba se utilizó como control positivo *Candida albicans* ATCC 14053, la cual se consideró como el 100 % para comparar los resultados de las levaduras de este estudio. Las cepas evaluadas formaron biopelícula entre 5.62 % y 7.53 %, mientras que *S. boulardii* formó 11.85 %. Con base en estos resultados, se seleccionaron las cepas 8 y 37 para la última prueba.

Finalmente se realizó una simulación del tránsito por el tracto gastrointestinal, la cual consiste en imitar las condiciones de tiempo, pH y enzimas presentes en el tracto digestivo. En esta prueba se incluyeron las enzimas lisozima, pepsina y pancreatina. Además, se imitaron los valores de pH estomacal (2.5) y duodenal (7.2) y la presencia de sales biliares (0.5 % m/v). Se observó que los aislados resistieron las condiciones, disminuyendo aproximadamente un ciclo logarítmico. No hubo diferencia significativa ( $\alpha=0.05$ ) entre los aislados 8, 37 y el control (Sb), por lo tanto, estos dos aislados fueron catalogados como potencialmente probióticos.

## 2 Introducción

Los cereales son de gran importancia ya que constituyen una gran fuente de nutrientes en todo el mundo. Al ser fermentados aumenta su aporte nutricional y mejoran sus propiedades sensoriales y funcionales. De todos los alimentos fermentados, los elaborados con cereales se producen en mayor volumen (Hammes *et al.*, 2005). En México, el maíz es la base de la alimentación y con él se elabora el atole agrio, una bebida fermentada no alcohólica elaborada a base de maíz no nixtamalizado. Se produce en el sureste del país (Guyot, 2012), en los estados de Chiapas, Tabasco y Veracruz (Valderrama, 2012). La microbiota nativa es responsable de la fermentación e incluye bacterias, hongos y levaduras. Se han aislado una variedad de especies de bacterias lácticas, bacterias no lácticas como *Bacillus*, enterobacterias y levaduras de diferentes etapas de fermentación del atole agrio de Villahermosa, Tabasco (Valderrama, 2012; Esquivel, 2012; Cocconceli, 2013). La importancia de las levaduras en la fermentación es grande, ya que se encuentran en cuentas altas durante toda la fermentación e imparten características sensoriales al producto.

Los probióticos son microorganismos vivos que, administrados en cantidades adecuadas, pueden tener un beneficio en la salud del huésped. Han sido consumidos por el hombre en los alimentos fermentados desde hace muchos años, pero hasta hace poco se comenzó a estudiarlos. La mayoría de los probióticos se han aislado de lácteos y son principalmente bacterias de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*. La única levadura reconocida como probiótica actualmente es *Saccharomyces cerevisiae* var. *bouardii*, que fue aislada de la fruta del lichi (*Litchi chinensis*) en Indonesia. Esto se debe a la evidencia científica que se ha recabado a través de estudios clínicos válidos *i.e.* doble ciego, aleatorizados, controlados con placebo (Czerucka *et al.*, 2007; Rijkers *et al.*, 2011; Lukaszewicz, 2012; Butel, 2014; Fijan, 2014). Esta levadura se ha utilizado exitosamente como tratamiento contra varias enfermedades estomacales en personas bajo tratamiento de antibióticos. Otros beneficios reportados incluyen modular la microbiota intestinal y el sistema inmune (Palma *et al.*, 2015). Es importante mencionar que los beneficios son específicos para cada cepa y no es posible extrapolarlos incluso entre microorganismos de la misma especie.

La búsqueda de nuevos probióticos en la actualidad no se limita a lácteos fermentados. Recientemente, se ha probado el potencial probiótico de otros géneros de levaduras como *Candida*, *Pichia* y *Kluyveromyces* aislados de diversos alimentos fermentados, obteniéndose en la mayoría de los casos resultados positivos para pruebas *in vitro* (Tiago *et al.*, 2009; Li-Shui *et al.*, 2010; Roostita *et al.*, 2011; Pedersen *et al.*, 2012; García-Hernández *et al.*, 2012., Diosma *et al.*, 2014; Perricone *et al.* 2014; Lohith & Appaiah, 2014; Greppi *et al.*, 2015; Ogunremi *et al.*,

2015). La mayoría de éstos se laboran a base de cereales como sorgo, maíz y trigo. Utilizar este tipo de sustratos puede tener ciertas ventajas. Desde el punto de vista económico, producir cereales es más económico que producir leche. Por otro lado, estos alimentos pueden ser consumidos por personas intolerantes a la lactosa o que tienen dietas restringidas (e.g. vegetarianos); además de que, por ser de origen vegetal, tienen generalmente menos contenido de colesterol que la leche (Prado *et al.*, 2008).

El atole agrio es consumido por las comunidades mazatecas cuando se padece de diarrea. Por lo tanto, resulta interesante evaluar si las levaduras presentes durante su fermentación pudieran tener características que las cataloguen como probióticas. Con el objeto de seleccionar levaduras potencialmente probióticas aisladas del atole agrio, es necesario primero determinar si poseen ciertas características que les permitan persistir las condiciones del tracto gastrointestinal para después poder ejercer su efecto benéfico. Deberán ser capaces de sobrevivir en valores bajos de pH, en presencia de bilis, de colonizar el intestino, de inhibir microorganismos patógenos y de tener efectos positivos en la salud del huésped. El objetivo de este trabajo es la caracterización probiótica *in vitro* de levaduras aisladas del atole agrio. Los criterios de selección se basarán en crecimiento a 37 °C, resistencia a sales biliares y pH ácido, formación de biopelícula y actividad antimicrobiana. Con las cepas que se seleccionen se hará una simulación del tránsito a través del tracto gastrointestinal.

### 3 Antecedentes

#### 3.1 Alimentos fermentados de maíz

Existen diversos alimentos fermentados a base de maíz alrededor del mundo. Se producen principalmente en países en vías de desarrollo como en Latinoamérica y África. Algunos ejemplos son: *banku*, *busaa*, *chicha*, *kenkey*, *mahewu*, *mawè*, *munkoyo*, *ogí*, *poto-poto* y pozol. De éstos, *mahewu* (Sudáfrica), *mawè* (Benin, Congo), *poto-poto* (Congo) y pozol (México) son bebidas no alcohólicas similares al atole agrio (Blandino *et al.*, 2003; Nout *et al.*, 2007; Guyot, 2012). A continuación, se hace una breve descripción de algunos de estos alimentos.

**Mahewu.** Es una bebida tradicional ácida no alcohólica producida en el pueblo del Bantu, Sudáfrica. Se elabora con harina de maíz y agua. La mezcla es fermentada y hervida para formar un atole. El microorganismo predominante durante la fermentación es *Streptococcus lactis*. No se han reportado levaduras que participen en el proceso (Gadaga *et al.*, 1999).

**Mawè.** Es una masa fermentada que se elabora a partir de maíz descascarillado con la cual se pueden preparar diversos platillos, dentro de ellos una bebida tipo atole. La levadura predominante en la fermentación es *Candida krusei*, seguida de *Candida glabrata* y *Kluyveromyces marxianus* (Greppi *et al.*, 2013).

**Pozol.** Es una bebida fermentada elaborada a base de maíz, de origen maya, no alcohólica, ácida y refrescante. La materia prima es el nixtamal, el cual es molido y amasado en forma de bolas. Éstas se cubren con hojas de plátano y se fermentan de manera espontánea de 1 a 30 días. Posteriormente se mezclan las bolas con agua en proporción 1:2 ó 1:3 para preparar la bebida, la cual puede ser mezclada con sal, chile molido tostado, azúcar, miel o cacao. La microbiota responsable de la fermentación consta de bacterias, hongos y levaduras. De estas últimas se han identificado *Rodhotorula minuta*, *R. mucilaginoso*, *Debaryomyces hanseii*, *Kluyveromyces lactis* y *Cladosporium cladosporioides* (Wacher *et al.*, 2000). Además de ser consumido como bebida refrescante, el pozol se utiliza con fines medicinales como controlar diarreas o reducir la fiebre (Wacher *et al.*, 1993).

#### 3.2 Atoles fermentados de maíz que se consumen en México

En México se consumen diversos alimentos fermentados elaborados a base de maíz. Algunos ejemplos son el tesgüino, atole agrio y pozol. El primero es una bebida alcohólica, mientras que el atole agrio y el pozol son bebidas que se elaboran mediante una fermentación láctica. La principal diferencia entre estas dos es la materia prima utilizada y el proceso de elaboración. Más adelante se describen los detalles. Existen en México una variedad de atoles de maíz fermentados, dentro de los cuales se pueden mencionar los atoles agrios de la Sierra Norte de Puebla,

específicamente en la comunidad de Cuetzalan (Valderrama-Rouy & Ramírez-Suárez; 1993; Arce, 2007) y el que se produce en el estado de Tabasco (Valderrama, 2013; Esquivel, 2013; Esquivel 2016). A este último se le conoce como *Xocoatolli*, que proviene del náhuatl *Xococ*: agrio y *Atolli*: atole.

### 3.3 Atole agrio de dobla

El atole agrio de dobla se elabora en el estado de Tabasco. Se elabora a partir de maíz tierno, que es el maíz recién cosechado, de tal manera que conserva aún cierto grado de humedad. “Cuando el maíz se encuentra en la etapa de madurez fisiológica se dobla dentro de la misma planta y se deja que pierda humedad alrededor de treinta días antes de cosechar. Esto se hace con el objetivo de proteger a la planta contra el desarrollo de microorganismos, ya que si queda unido (doblado) a la planta, ésta lo protege”. Debido a este proceso los habitantes de la zona le llaman maíz de “dobla” (Valderrama, 2012).

Es consumido por los habitantes de la comunidad de Cerro Blanco, Tlacotapa, Tabasco durante los meses de Mayo y Septiembre, que corresponden a las fechas de cosecha del maíz. Esta bebida es consumida por mujeres que acaban de dar a luz y se encuentran en periodo de lactancia, ya que se cree que ésta aumenta la cantidad de leche que se produce. También es consumida cuando se padece de diarrea y es preparada durante la celebración de día de muertos para colocarla en las ofrendas dedicadas a los difuntos que disfrutaban de esta bebida (Valderrama, 2012). Antiguamente, las comunidades prehispánicas de esta zona, consumían el atole agrio durante las festividades de *Hueytozotli* (gran vigilia) del calendario Azteca que era el período de adoración de los dioses del maíz (Castro, 2006).

El proceso de elaboración (Figura 1) comienza con la limpieza y desgranado del maíz. Posteriormente se realiza una molienda para formar una masa, la cual puede ser fermentada directamente (fermentación sólida) o añadiéndole agua en proporción 1:1 (fermentación líquida). El tiempo de fermentación es diferente en ambos casos: la mezcla se fermenta por un período de 6 horas y la masa por 12 h. A esta última se le agrega agua en la misma proporción y se homogeniza. Ambas se filtran con un colador casero y el líquido se lleva a ebullición hasta formar una consistencia espesa, proceso que puede tomar entre 5 y 30 minutos. El atole se puede consumir solo o adicionándole azúcar (Valderrama, 2012; Esquivel, 2012).

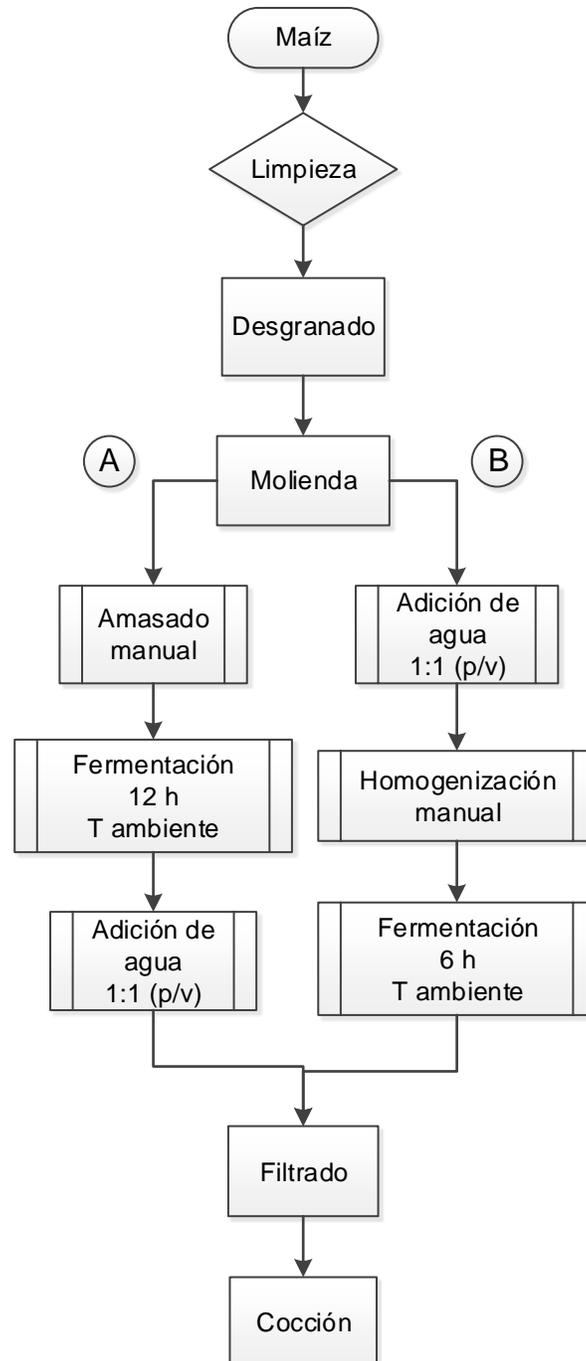
La microbiota consta de bacterias lácticas (BAL), bacterias lácticas amilolíticas (BALA), coliformes, enterobacterias, mesófilos aerobios, hongos y levaduras (Esquivel, 2012). Se han reportado cuentas al final de la fermentación de hasta  $54 \times 10^8$  UFC/mL,  $37 \times 10^{10}$  UFC/mL, para BAL y BALA, respectivamente. Los coliformes y enterobacterias se encuentran en cantidades de hasta  $91 \times 10^7$  UFC/mL y  $20 \times 10^8$  UFC/mL al inicio de la fermentación; sin embargo, estas cuentas tienden

a disminuir conforme avanza el tiempo. Los hongos y levaduras alcanzan cuentas de  $52 \times 10^9$  UFC/mL y  $29 \times 10^{11}$  UFC/mL en la fermentación líquida y sólida, respectivamente (Esquivel, 2012). Sin embargo, después de la cocción las cuentas disminuyen hasta  $13 \times 10^3$  UFC/mL (Valderrama, 2012), e incluso hasta  $<10$  UFC/mL (Esquivel, 2012), dependiendo del tiempo de calentamiento.

Valderrama (2012) identificó bacterias lácticas presentes en la fermentación como *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *delbrueckii*, *L. delbrueckii*, *L. plantarum* y *Lactococcus lactis* ssp. *Lactis*. Esquivel (2012) identificó las enterobacterias como *Serratia marcescens*, *Enterobacter cloacae*, *Morganella morganii* ssp. *sibonii* y *Klebsiella pneumoniae* ssp. *pneumoniae*. Las levaduras aisladas se han identificado como *Pichia kudriavzevii* y *Clavispora lusitaniae* principalmente, además se han encontrado varias especies del género *Candida* (*C. intermedia*, *C. parapsilosis*, *C. pararugosa*, *C. quercitrusa*, *C. tropicalis*), *Pichia* (*P. fabianii*, *P. galeiformis*, *P. manshurica*) y *Trichosporon* (*T. asahii*, *T. japonicum*) (Cocconceli, 2013).

Existe una variedad de atole agrio que se elabora por la población náhuatl y mestiza de San Andrés Tzicuilan, Cuetzalan, en la sierra norte del estado de Puebla. Se conoce como *axokot*. Este atole se elabora a partir de maíz nixtamalizado, el cual se muele, se mezcla con agua y se hierve durante 15 min hasta obtener una consistencia espesa. El atole es depositado en un cántaro de barro de boca ancha (que sólo se utiliza para este fin) que contiene en las paredes internas una pasta hecha a base de “hierba dulce” (*Lippia dulcis*) y cal. Se agregan 4 brazas de carbón hirviendo, se tapa con hojas verdes de plátano y se fermenta durante 48 horas a temperatura ambiente con una cubierta térmica hecha con hojas secas y costales. En las localidades de San Miguel Tzinacapan, Zacatipan y Zapotitlán de Méndez del estado de Puebla se preparan atoles similares, pero con pequeñas variaciones en el proceso (Arce, 2007).

En el atole de Cuetzalan se identificaron 5 especies de levaduras correspondientes a 3 géneros: *Cryptococcus* sp., *C. usbekistanensis*, *C. albidus*, *Candida parapsilosis* y *Kloeckera apiculata*.



**Figura 1.** Proceso de elaboración del atole agrio de Villahermosa, Tabasco. A: Fermentación sólida. B: Fermentación líquida (Valderrama, 2012).

Las diferencias más importantes en el proceso de elaboración del atole agrio de Villahermosa y Cuetzalan son: la nixtamalización del maíz, la presencia de la pasta hecha con hierba y cal, y la etapa del proceso en la que se fermentan. La nixtamalización es una cocción alcalina que se le da al grano de maíz que sirve para remover el pericarpio más fácilmente y obtener una masa más suave, pero también

genera cambios químicos favorables en la composición del grano, por ejemplo, la disponibilidad de niacina. La pasta de *Lippia dulcis* se utiliza para endulzar la bebida. El orden de fermentación/cocción en ambos atoles es diferente. En el atole de Cuetzalan la cocción es primero y posteriormente se agrega al cántaro de fermentación; mientras que en el atole de Villahermosa primero se fermenta y al final se cuece. Estas diferencias repercuten en la microbiota que participa en la fermentación. En el caso particular de las levaduras, se han encontrado diferentes géneros en ambos atoles, siendo el único en común *Candida*.

El atole agrio de Cuetzalan se consume como bebida refrescante, en sustitución de agua potable y en diversas festividades religiosas como semana santa (Arce, 2007). En Villahermosa, Tabasco es consumido por mujeres lactantes debido a que se cree que aumenta la cantidad de leche que se produce; además se recomienda consumir en caso de diarrea (Valderrama, 2012).

### **3.4 Probióticos**

La Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) definieron en 2005 a los probióticos como “microorganismos vivos que al ser suministrados en cantidades adecuadas promueven beneficios en la salud del organismo huésped” (Palma *et al.*, 2015). Esta idea surgió desde hace más de un siglo cuando el científico ruso Ilya Ilyich Mechnikov (Élie Metchnikoff) propuso en su publicación *The prolongation of life* que la longevidad de personas de Bulgaria estaba asociada al consumo de leche fermentada, específicamente a los lactobacilos. Al mismo tiempo, el pediatra francés Henry Tissier observó que infantes enfermos de diarrea tenían pocas bacterias Gram-positivas con forma de “Y”, mientras que los niños sanos poseían una cuenta mayor de estas bacterias “bífidas” en sus heces fecales, proponiendo que el consumo de estas bifidobacterias servía como microbiota preventiva. Ambos investigadores reportaron por primera vez el beneficio a la salud de las bacterias *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, respectivamente. La palabra probiótico fue acuñada por Lilly y Stillwell en 1965 para referirse a una sustancia de origen microbiano que es capaz de acelerar el crecimiento de otro microorganismo (Butel, 2014). Dicha definición está obsoleta actualmente, pues los probióticos se definen como microorganismos y no sustancias.

Un microorganismo debe tener ciertas características para considerarse probiótico. Deben ser cepas plenamente identificadas, pues los efectos sobre la salud que han sido demostrados son específicos de cada cepa y no pueden ser extrapolados incluso entre cepas de la misma especie. Deben ser seguras para el ser humano, para lo cual la FDA se ha encargado de clasificar distintos aditivos alimentarios (incluyendo los microorganismos) como generalmente reconocido como seguro o GRAS, por sus siglas en inglés. Para ejercer su efecto, los probióticos deben llegar

vivos al intestino, por lo que deben ser capaces de resistir las condiciones del tracto gastrointestinal como el pH del estómago, la presencia de ácidos biliares y algunas enzimas digestivas. Una vez que llegan a su sitio de acción deben ser capaces de adherirse a la mucosa intestinal, sin embargo, no deben invadir el tejido y deben de ser eliminados una vez que se dejan de consumir. Adicionalmente, no deben de ser patógenos oportunistas e idealmente deben de inhibir el crecimiento de patógenos. Por último, deben estimular el sistema inmune del huésped, para lo cual se han descrito muchos mecanismos que se discutirán posteriormente (Puupponen-Pimiä *et al.*, 2002; Perricone *et al.*, 2014).

Los microorganismos reportados como probióticos son principalmente bacterias de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*. Sin embargo, se han reportado otros géneros como *Bacillus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Escherichia* y *Saccharomyces* (Prado *et al.*, 2008). Se han aislado de: alimentos fermentados, principalmente lácteos; del tracto gastrointestinal de niños y adultos sanos, de heces fecales; del tracto gastrointestinal de animales (abejas, pescado, camarón, etc.); y de alimentos no fermentados como carne, salchichas o vegetales (Butel, 2014).

Dentro de los efectos benéficos para la salud, se han reportado: prevención y tratamiento de infecciones intestinales, disminución de niveles de colesterol, disminución de diarreas provocadas por virus, bacterias o parásitos, estimulación del sistema inmune, tratamiento contra el síndrome de colon irritable e intolerancia a la lactosa, y finalmente exclusión o reducción de la adherencia de patógenos (Salminen *et al.*, 1998; Mattila *et al.*, 1999).

Se han descrito tres mecanismos principales de acción de los probióticos (Butel, 2014). El primero y más importante es a través de la regulación de la microbiota intestinal, lo cual se puede lograr de distintas maneras. Una forma es el efecto barrera, que consiste en prevenir o disminuir la colonización del intestino por patógenos. Se han propuesto varias teorías sobre cómo se llega a esto, las cuales incluyen la producción de compuestos extracelulares (*e.g.* bacteriocinas o proteasas que degradan toxinas), reducción del pH intestinal mediante el aumento de ácidos grasos libres, competencia por nutrientes e inhibición de la adherencia de los patógenos al intestino compitiendo por los sitios de unión. Al impedir que los patógenos se adhieran, también se impide la translocación de éstos.

El segundo modo de acción consiste en mejorar la función de barrera de la mucosa intestinal. Esta función está relacionada a las uniones entre las células epiteliales. Los probióticos actúan a nivel de las vías de señalización provocando un incremento en la capa de la mucosa, estimulando la producción de defensinas y proteínas que ayudan a mejorar la función de barrera de la mucosa.

El tercero y probablemente el más complejo es la modulación del sistema inmune. Más del 70 % de las células inmunes del cuerpo se encuentran en el intestino, principalmente en el intestino delgado, donde forman parte del tejido linfóide asociado a intestino (GALT, Gut Associated Lymphoid Tissue). Los probióticos inducen la maduración del GALT, manteniendo al sistema inmune en alerta. En este tejido existen receptores específicos como los receptores tipo Toll (TLR, Toll Like Receptor), los cuales son proteínas del sistema inmune innato que se expresan en macrófagos y células dendríticas. Los TLR reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (MAMPs, Microbial Associated Molecular Patterns), interactúan con las células del epitelio intestinal y estimulan el sistema inmune a nivel de lámina propia. Como consecuencia, se activan las células T y se diferencian los linfocitos T, induciendo a respuestas anti inflamatorias (e.g. Interleucina 10).

Además de los tres mecanismos principales, los probióticos también pueden conferir un efecto benéfico en la salud del huésped de otras maneras, como ayudar a la digestión de lactosa produciendo  $\beta$ -galactosidasa en el intestino y otras enzimas que ayudan a la digestión. Otro beneficio indirecto es aumentar la absorción de calcio, lo cual se logra reduciendo el pH del lumen intestinal por la producción de ácidos grasos libres.

La regulación sobre los probióticos cambia de país en país. En EUA la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA, Food and Drug Administration) se encarga de regular, mientras que en Europa la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA, European Food Safety Authority) tiene esta tarea. La FDA y la EFSA no aceptan ningún microorganismo como probiótico debido a que no se ha demostrado evidencia contundente de la relación causa-efecto entre los beneficios reportados y su consumo. Por otro lado, en Japón existe la definición de FOSHU (Foods for Specified Health Uses) desde 1991. En ella se incluyen diversos alimentos funcionales, dentro de los cuales existe la categoría de alimentos que promueven la salud intestinal. Aquí se incluyen las bacterias lácticas y bifidobacterias, además de oligosacáridos, lactosa, fibra dietética, etc. (Fijan, 2014).

### **3.4.1 Levaduras probióticas**

Las levaduras son microorganismos unicelulares clasificados dentro del dominio *Eukarya*. La palabra *yeast* proviene del alemán *gist*, que se refiere a la espuma que se genera durante la fermentación de la cerveza. Por otro lado, la palabra *levure* en francés se refiere a la acción de fermentar la masa de trigo para hacer pan. Ambos términos hacen referencia a la fermentación de alimentos, proceso que ha sido utilizado por el hombre desde hace muchos años con el fin de conservar los alimentos y mejorar sus propiedades organolépticas. Lo primero sugiere que producen ciertas sustancias que inhiben el crecimiento de otros microorganismos, además indica que es seguro consumirlas.

Se conoce poco sobre las levaduras como probióticos. La más estudiada por la ciencia es *Saccharomyces boulardii*, la cual se discutirá en la sección 3.2.1.1. A pesar de ser diferentes, se han propuesto mecanismos similares sobre la forma que ejercen su beneficio *i.e.* modular la microbiota intestinal y el sistema inmune. Sin embargo, las levaduras tienen ventajas sobre las bacterias como mayor tamaño, pH óptimo de crecimiento menor (4.5-6.5) y diferente composición en la pared celular, lo cual implica diferente modo de acción a nivel inmunológico. Además, al ser eucariontes son naturalmente resistentes a los antibióticos que actúan contra bacterias, pero esta característica no es transmisible a las bacterias comensales del intestino (Czerucka *et al.*, 2007). Esto las hace ideales para suministrarse en conjunto con antibióticos.

Existen reportes del efecto antagonista de las levaduras desde finales del siglo XIX y principios del siglo XX (Pasteur, 1877; Hayduck, 1909). Esta característica se le atribuye principalmente a la competencia por nutrientes, acidificación del medio por metabolitos como ácidos orgánicos y secreción de compuestos antimicrobianos como las toxinas *killer*: proteínas extracelulares letales para cepas sensibles de la misma especie y especies de otros géneros, pero las levaduras que las producen son inmunes (Hatoum *et al.*, 2012). La toxina secretada tiene 3 posibles mecanismos de acción: 1, formación de poros en la membrana, lo cual causa pérdida de iones; 2, inhibición de la síntesis del  $\beta$ -1,3 glucano, componente esencial de la pared celular; y 3, inhibición de la síntesis del DNA. La producción de toxinas *killer* ha sido identificada en los géneros *Saccharomyces*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Torulopsis*, *Williopsis* y *Zygosaccaromyces* (Hatoum *et al.*, 2012). Las levaduras *killer* fueron descritas por primera vez en 1963 por Bevan y Makower.

Se conoce mucho sobre el efecto que tienen las toxinas *killer* sobre otras levaduras y hongos, sin embargo, poco se ha estudiado sobre su efecto contra bacterias. Además de proteínas, existen otros compuestos que inhiben el crecimiento de bacterias como: ácidos, péptidos, aminos, etc. (Tabla 1).

La actividad antagonista de las levaduras tiene diversas aplicaciones en los campos de la industria alimenticia, agricultura, medicina y veterinaria. En la industria alimenticia se ha utilizado en la producción de diversos alimentos fermentados como vino, cerveza y yogurt. En el caso de los vinos se ha utilizado para prevenir el desarrollo de levaduras y bacterias indeseables en la fermentación. Además, también se han utilizado para el biocontrol de cultivos antes y después de la cosecha. En medicina se ha utilizado exitosamente para el tratamiento de diversos tipos de diarrea. Finalmente, en veterinaria se utilizan las levaduras para mejorar el crecimiento y salud del ganado.

**Tabla 1.** Compuestos antibacterianos generados por levaduras (Hatoum *et al.*; 2012).

<b>Levadura productora</b>	<b>Microorganismo sensible</b>	<b>Compuesto</b>	<b>Referencia</b>
NE*	<i>E. coli</i> Estafilococos	Amina termolábil	Hayduck & Fernbach (1909)
<i>Debaryomyces hanseii</i>	<i>Clostridium tyroburyticum</i> <i>C. butyricum</i>	Intracelulares y extracelulares	Fatichenti <i>et al.</i> (1983)
<i>Kloeckera apiculata</i> <i>Kluyveromyces thermotolerans</i>	<i>Bacillus megaterium</i> <i>Lactobacillus plantarum</i>	Forma activa de azul de metileno	Bilinski & Casey (1989)
<i>Geotrichum candidum</i>	<i>Listeria sp.</i>	Ácido D-3-fenil láctico Ácido D-3-Indol láctico	Dieuleveux (1998)
<i>Candida bombicola</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Candida albicans</i>	Soforósidos (glicolípidos extracelulares)	Cavalero & Cooper (2003)
<i>Pichia sp.</i> <i>Sacharomyces ludwigii</i> <i>Candida pulcherrima</i>	<i>Lactobacillus hilgardii</i> <i>L. brevis</i> <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Dióxido de azufre	Fleet (2003)
<i>Candida intermedia</i> <i>Kluyveromyces marxianus</i>	<i>Listeria sp.</i>	NE	Goerges <i>et al.</i> (2006)
<i>Pichia norvegensis</i> WSYC 592	<i>L. monocytogenes</i>	NE	Goerges <i>et al.</i> (2011)
<i>Issatchenkia orientalis</i> <i>Candida krusei</i> <i>K. marxianus</i>	<i>Listeria sp.</i>	NE	Goerges <i>et al.</i> (2011)
<i>Candida parapsilosis</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>S. aureus</i> <i>E. coli</i>	NE	Roostita <i>et al.</i> (2011)
<i>Debaryomyces hanseii</i> <i>Pichia fermentans</i> <i>Candida tropicalis</i> <i>W. anomala</i>	<i>Listeria sp.</i>	Péptidos hidrofóbicos termoestables	Hatoum <i>et al.</i> (2012)
<i>Pichia kudriavzevii</i> RY55	<i>E. coli</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> <i>Klebsiella sp.</i> <i>S. aureus</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>P. alcaligenes</i>	Toxina <i>killer</i>	Bajaj <i>et al.</i> (2013)
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Oenococcus oeni</i>	Péptidos antimicrobianos	Branco <i>et al.</i> (2015)

\*NE= No se especifica

#### 3.4.1.1 *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*

Fue aislada de la fruta del lichi en Indochina en el año 1926 por el científico francés Henri Boulard. Fue patentada en 1947 y comercializada por primera vez en 1953. Originalmente fue descrita como una especie, pero los avances en biología molecular revelaron que era parte de *S. cerevisiae*. McFarland y Bernasconi (1993) describieron las diferencias entre *S. cerevisiae* (Sc) y *S. boulardii* (Sb): Fenotípicamente, Sb tiene mejor crecimiento a 37 °C que a 30 °C, no forma ascosporas y no utiliza galactosa. Genotípicamente el dominio D1/D2 del ADNr es casi idéntico, con una diferencia entre 0-0.5 %, la región ITS-5.8S tiene un porcentaje de identidad mayor al 99 %. El gen II de la citocromo C oxidasa mitocondrial varía en 3 nucleótidos (0.5 %) y el cariotipo de ambas tiene una diferencia de 3.4 %. Como se puede observar el grado de variabilidad es mínimo, esta fue la razón por la cual Sb se incluyó dentro de Sc como *S. cerevisiae* var. *boulardii*. Sin embargo, Sb tiene poca capacidad de reproducirse sexualmente, lo cual la podría separar nuevamente como una especie en el futuro (Lukaszewicz, 2012). Posterar *et al.* (2005) evaluaron varios métodos para identificar Sb y concluyeron que la mejor opción es el análisis de polimorfismos de los genes YKL139w y YLR177w.

Cada vez hay más publicaciones sobre estudios clínicos doble ciego en los que se ha demostrado la eficiencia de Sb en comparación con el placebo. Ha sido utilizada para distintos fines: prevención de diarrea asociada a antibióticos, diarrea recurrente asociada a *C. difficile*, diarrea del viajero, diarrea aguda de origen bacteriano y viral, diarrea asociada a alimentación por sonda y para tratar diarrea en pacientes con SIDA. Además, se ha empleado para el tratamiento de colitis ulcerativa, enfermedad inflamatoria intestinal y síndrome de intestino irritable (Czerucka *et al.*, 2007).

Los mecanismos que se han propuesto para su modo de acción son los siguientes: efecto antimicrobiano, efecto nutritivo, inactivación de toxinas bacterianas, *quorum sensing*, efecto barrera, efectos inmunomodulatorios, efectos anti inflamatorios y mantenimiento de la integridad de la barrera intestinal (Lukaszewicz, 2012).

El efecto antimicrobiano se puede lograr de varias maneras. Se ha observado que Sb puede prevenir que los patógenos se adhieran a las paredes del intestino por tres mecanismos: uniéndose directamente a las células de Sb, por actividad proteolítica y por impedimento estérico. Además, pueden inhibir el crecimiento de patógenos compitiendo por nutrientes o acidificando el medio. Otro modo de acción es la neutralización de toxinas bacterianas. Se ha observado que Sb secreta proteasas extracelulares que eliminan las toxinas producidas por *Clostridium difficile* y *Vibrio cholerae*. La primera es una serin proteasa de 54 kDa que actúa de manera proteolítica sobre la toxina A de *C. difficile* y su receptor, además de tener un efecto antiinflamatorio. La segunda es una proteína de 120 kDa que inhibe la secreción de

cloruro por la toxina colérica a través de la reducción de formación de AMP cíclico. También se ha visto que Sb produce una fosfatasa que desfosforila endotoxinas como la LPS de *E. coli* 055B5 (Czerruca *et al.*, 2007).

Algunos de los compuestos extracelulares que secreta Sb son moléculas que participan en la percepción del *quorum sensing*. Éstas pueden inhibir la adhesión de los microorganismos patógenos en el intestino. Sb puede también regular algunos factores de virulencia de patógenos. Por ejemplo, se ha observado que la movilidad de *Salmonella enterica* Typhimurium en células de colon humanas es reducida en presencia de Sb. Además, Sb inactiva toxinas bacterianas. Un ejemplo es la fosfatasa de 63 kDa que es capaz de desfosforilar e inactivar parcialmente la endotoxina LPS de *E. coli*.

La modulación del sistema inmune se da principalmente a través de la producción de compuestos que modifican las vías de señalización del sistema inmune de la mucosa y células epiteliales. Un ejemplo es la producción de un factor soluble de bajo peso molecular (< 1kDa) por Sb que inhibe la producción de compuestos pro inflamatorios como la Interleucina 8, el factor alfa de necrosis tumoral y el interferón gama (Sougioultzis *et al.*, 2006). También se ha visto que al administrar Sb hay un aumento en la producción de inmunoglobulina A (Buts *et al.*, 1990). Fakruddin *et al.* (2017) encontraron que *S. cerevisiae* IFST 062013, aislada de fruta, estimula la producción simultánea de citoquinas anti-inflamatorias (IL-10) y pro-inflamatorias (IFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ), ayudando a mantener un balance entre las citoquinas tipo Th1 y Th2, factor importante para regular el sistema inmune del huésped.

### **3.4.2 Métodos más empleados para evaluar el potencial probiótico de bacterias y levaduras**

El primer paso para determinar si un microorganismo es probiótico es realizar pruebas *in vitro* que demuestren que son capaces de resistir las barreras naturales del tracto digestivo para que éstos puedan llegar a su sitio de acción. Para evaluar esto, las pruebas más comunes que se hacen son: resistencia a lisozima (paso a través de la boca), resistencia a pH ácido (paso a través del estómago), resistencia a sales biliares (paso a través del duodeno), resistencia a enzimas digestivas como pepsina y pancreatina. También se realizan pruebas como formación de biopelícula y actividad antimicrobiana. La primera es un indicador de que los microorganismos son capaces de adherirse a las paredes del intestino. La segunda indica que los microorganismos son capaces de inhibir posibles patógenos que se encuentren en el intestino, promoviendo la salud del huésped.

#### **3.4.2.1 Biopelículas**

Las biopelículas son ecosistemas microbianos conformados por uno o varios microorganismos asociados a una superficie que puede ser viva o inerte. Tienen

estructuras complejas y funciones específicas. Generalmente se componen de células y una matriz extracelular que confiere adherencia y protección a la comunidad microbiana. Dicha matriz está compuesta de polisacáridos, proteínas y ADN extracelular (Hall-Stoodley *et al.*, 2004). Se encuentran en distintos hábitats naturales, implantes y además son de gran importancia en plantas procesadoras de alimentos, pues son difíciles de remover. Las células que forman biopelículas son fisiológicamente diferentes a las células plantónicas de la misma especie, *i.e.* células libres. La película les permite interactuar de varias maneras: existe transferencia horizontal de genes y comunicación de tipo *quorum sensing*. Generalmente les confiere resistencia a detergentes y antibióticos, pues la matriz extracelular protege a las células (Molin & Tolker-Nielsen, 2003).

El proceso de formación de biopelículas se divide en 3 fases: adherencia, maduración y dispersión. Durante la primera etapa las células se adhieren a la superficie; este proceso se da primero por interacciones débiles hidrofóbicas y de tipo van der Waals, posteriormente se pueden adherir fuertemente mediante estructuras como el pili en el caso de bacterias. En la etapa de maduración, las células forman la matriz extracelular mencionada anteriormente. Para esto las células son capaces de comunicarse vía *quorum sensing* usando moléculas como la N-Acil homoserina lactona (Donlan, 2002). La tercera etapa consiste en la dispersión de células hacia el medio, lo cual les permite a las células formar biopelículas en otras superficies.

Las películas sirven para: mecanismo de defensa, son de importancia a nivel industrial pues son difíciles de remover, también son un factor de virulencia y un indicador de probióticos. En este caso nos interesa saber si las levaduras aisladas del atole agrio son capaces de formar biopelícula para medir de manera indirecta si pueden ser capaces de adherirse a las células del intestino.

#### **3.4.2.2 Métodos de simulación del tracto digestivo**

Existen varios métodos reportados para simular *in vitro* el paso a través del intestino. Se usan tanto para evaluar probióticos como prebióticos. Éstos prueban si una sustancia o microorganismo es capaz de resistir las barreras naturales del cuerpo humano *i.e.* enzimas digestivas, pH ácido y sales biliares (Visozo *et al.*, 2006; Perricone *et al.*, 2014). La mayoría coinciden en los mismos experimentos con pequeñas variaciones. La más importante es que algunos hacen los experimentos por separado y otros hacen experimentos sucesivos. Visozo *et al.* (2006) utilizó el método de Plackett-Burman (PB) para determinar los parámetros que afectan la supervivencia de probióticos durante una simulación del tránsito gastrointestinal. El experimento consiste en 8 corridas con diferentes variables: efecto protector de leche descremada, composición del medio, presencia de lisozima, pepsina y pH del medio. A partir de estos resultados se diseñó una prueba para simular el paso a

través del estómago e intestino de los microorganismos, la cual fue utilizada durante este estudio y se describe en la sección 8.3.7.

En la literatura se reportan diferentes concentraciones de las diferentes enzimas y sales biliares. La lisozima se utiliza generalmente a 100 ppm (Visozo *et al.*, 2006; Giles-Gómez *et al.* 2016); la pepsina a 0.3 % (m/v) (Visozo *et al.*, 2006; Castro-Rodríguez *et al.*, 2015) y la pancreatina varía entre 0.1 % (Visozo *et al.*, 2006) y 0.19 % (m/v) (Castro-Rodríguez *et al.*, 2015). Es importante mencionar que en ninguno de los artículos mencionados se mencionan las unidades a las que equivalen estas concentraciones de enzimas. Las concentraciones de sales biliares varían entre 0.3 % (Gilliand *et al.*, 1984; Giles-Gómez *et al.* 2016) y 1.5 % (m/v) (Solieri *et al.*, 2014) 0.3 % m/v.

Además de las metodologías mencionadas anteriormente, existen otras pruebas que se realizan para determinar el potencial probiótico como actividad enzimática (proteasa, lipasa, fitasa), hidrofobicidad de la superficie celular, actividad antioxidante, resistencia a antibióticos, autoagregación, coagregación con patógenos, degradación de colesterol, adherencia a células intestinales, entre otras (Diosma *et al.*, 2014; Perricone *et al.*, 2014; Ogunremi *et al.*, 2015; Giles-Gómez *et al.*, 2016).

#### **4 Justificación**

Los probióticos son de gran importancia en la actualidad, ya que su consumo ayuda a prevenir enfermedades gastrointestinales y a mejorar el sistema inmune de quien los consume. Existe controversia en cuanto a su eficacia, por lo que han despertado un gran interés por parte de la ciencia. Además de estudiar los mecanismos de acción de los microorganismos ya conocidos, recientemente se ha evaluado el potencial probiótico de microorganismos aislados de distintas fuentes como los alimentos fermentados. Al ser una bebida tradicional con una microbiota compleja, es posible que en la fermentación del atole agrio participen microorganismos con posibles efectos benéficos a la salud y también que su microbiota difiera de la de otros atoles de maíz, ya que posee la particularidad de ser elaborado con maíz tierno. Se ha reportado que las levaduras están presentes en cuentas altas durante la fermentación y es consumido cuando se padece de diarrea, por lo tanto, resulta interesante estudiar su potencial probiótico. Este producto se calienta después de la fermentación para elaborar el atole. Aunque en este paso seguramente se eliminan la mayoría de los microorganismos, se podría plantear posteriormente la mezcla de este atole con otro que no haya sido calentado, la inoculación de levaduras probióticas después del calentamiento o el uso de estas levaduras en otros atoles de maíz.

#### **5 Hipótesis**

El atole agrio, al ser un alimento fermentado tradicional, cuenta con una microbiota compleja en donde interaccionan una gran cantidad de microorganismos. Se ha observado que la interacción entre miembros de comunidades similares les confiere capacidades que pueden convertirlos en probióticos. Entonces, dentro de las levaduras aisladas del atole agrio de dobla, es posible que se encuentren algunas con estas características.

## **6 Objetivos**

### **6.1 Objetivo general**

Determinar el potencial probiótico *in vitro* de las levaduras aisladas del atole agrio de dobla.

### **6.2 Objetivos particulares**

- Identificar las levaduras aisladas del atole agrio de dobla en los muestreos realizados en poblaciones cercanas a Villahermosa, Tabasco, en los años 2010, 2011 y 2012.

Con el objeto de determinar su posible sobrevivencia en el cuerpo humano el proyecto se dividió en 4 etapas:

1. Evaluar el crecimiento de las cepas a 37 °C.
2. Determinar su resistencia a sales biliares y pH ácido.
3. Evaluar la formación de biopelícula y probar su actividad antimicrobiana contra patógenos encontrados en alimentos.
4. Seleccionar las cepas con el mejor potencial probiótico midiendo su capacidad de resistir a las condiciones del aparato digestivo, mediante la determinación de su sobrevivencia en medios de cultivo que simulen las condiciones del estómago y del intestino.

## 7 Estrategia experimental



**Figura 2.** Estrategia experimental del proyecto. \*Selección de aislados con base en los resultados obtenidos.

## 8 Materiales y métodos

Se trabajó con un total de 44 aislados de levaduras tanto de la fermentación líquida como de la sólida y de varios tiempos de fermentación de los años 2010, 2011 y 2012 conservadas en tubos con glicerol al 15 % a -70 °C (Tabla 2). Se organizaron de acuerdo con la fecha de aislamiento, con tipo y tiempo de fermentación y se les asignó una clave consecutiva del número 1 al 44, las claves originales se encuentran en el anexo 13.1. Como control se utilizó *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* aislada del suplemento alimenticio Floratil® de la compañía Merck, proporcionado por el Maestro Alejandro Camacho, de la Colección del Cultivos del Departamento de Biología de la Facultad de Química, UNAM.

**Tabla 2.** Clasificación de aislados del atole agrio de acuerdo con el año de muestreo y el tipo de fermentación del cual fueron aisladas (sólida o líquida).

Año	Sólida	Líquida	Total
2010	15	6	21
2011	7	8	15
2012	4	4	8
Total	26	18	44

### 8.1 Recuperación y conservación de aislados

Se descongelaron los tubos a temperatura ambiente con ayuda del vórtex, se transfirieron 50 µL a un vial con 5 mL de caldo YPD (Anexo 13.2) y se incubaron a 30 °C por 24 h o hasta que hubiera crecimiento. Posteriormente se estrió cada cultivo en placas con el mismo medio y se incubaron en las mismas condiciones.

Los aislados puros se conservaron a mediano plazo en tubos de rosca con medio GELPA inclinado (Anexo 13.2), las tapas fueron cubiertas con *parafilm*® para evitar la desecación y la contaminación de los cultivos. Se verificó la pureza de los cultivos previo a cada experimento estriando en agar YPD (Anexo 13.2) y mediante observaciones microscópicas. Los cultivos se sembraron cada 2 meses.

### 8.2 Clasificación morfológica

Se agruparon los aislados de acuerdo con sus características macroscópicas y microscópicas. Se crecieron en medios YPD, Extracto de malta y WL (Anexo 13.2). Las observaciones de morfología de las colonias fueron registradas y se hicieron preparaciones en fresco de cada una para observarlas al microscopio (Olympus CX40). En medio líquido se registró el crecimiento (inferior, superior) y la producción de CO<sub>2</sub>; en sólido se registró el tamaño, color, borde, textura y elevación de las colonias; en el microscopio se observó la forma, tamaño y agrupación de las células, para esto se tomó un portaobjetos limpio y desengrasado al cual se le agregaron 30 µL de agua destilada con micropipeta, posteriormente se picaron las colonias con

un palillo estéril y se suspendieron en el portaobjetos uniformemente, se colocó un cubreobjetos encima y se observaron en el microscopio (Olympus CX40) con un aumento total de 400X.

### **8.3 Identificación de los aislados**

En resumen, se extrajo ADN de un cultivo de 24 h usando la metodología de Santiago-Urbina *et al.* (2015). Se amplificó la región 5.8S-ITS, que comprende el gen ribosomal 5.8S y dos espaciadores de transcripción no codificantes ITS1 e ITS2 (5.8S-ITS). Los productos de amplificación fueron digeridos con las enzimas de restricción *Hae III*, *Hinf I* y *Hha I* y se agruparon los aislados con base en sus perfiles de restricción. Se seleccionó un aislado de cada grupo, se amplificó el dominio D1/D2 del ADN<sub>r</sub> 26S y se enviaron a secuenciar para su identificación.

#### **8.3.1 Extracción de ADN**

Se transfirió una asada del cultivo conservado en medio YPD (Anexo 13.2) inclinado a un tubo con caldo YPD (Anexo 13.2) y se incubó a 30 °C durante toda la noche (18-24 h). Se colocaron 1.5 mL de este cultivo en un tubo para micro centrifuga, se centrifugaron a 10 000 rpm por 10 min, se descartó el sobrenadante y se repitió el proceso para obtener más células. Éstas se lavaron con agua destilada estéril y se suspendieron en 200 µL de buffer de ruptura (Anexo 13.3). Se agregaron 0.3 g de perlas de vidrio (diámetro 0.42–0.6 mm) y 200 µL de PCI (Anexo 13.3). Se agitó la mezcla en vórtex a máxima velocidad por un minuto, después se agregaron 200 µL del buffer TE (Anexo 13.3) pH 8, se mezcló con ayuda del vórtex y se centrifugó la mezcla a 14 000 rpm por 10 min. Se recuperaron 350 µL de la fase acuosa (superior) en un tubo nuevo y se agregó 1 mL de etanol 96 % (v/v), se incubó la muestra en el refrigerador (4 °C) durante media hora, se centrifugó a 14 000 rpm por 10 min, se decantó el sobrenadante, se lavó el ADN con 1 mL de etanol 70 % (v/v) y se dejó secar a temperatura ambiente por 3 horas. Finalmente, se suspendió el ADN en 50 µL de agua desionizada estéril, se agregaron 2 UI de RNAsa (1 µL) y se incubó a 37 °C por 1 h. El ADN se conservó a -20 °C hasta su posterior uso.

Se comprobó la calidad de la extracción de ADN mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1 % (p/v) y buffer TBE [1X] (Anexo 13.3), revelada con una solución de bromuro de etidio [5 µg/µL] y observada a través del equipo *Chemidoc imager* y el software *Image Lab* (Biorad). Para determinar la concentración se tomaron 2 µL de cada muestra y se colocaron en una placa de 16 pozos, se realizó un barrido de 200 a 300 nm utilizando el equipo *Epoch* (Biotek), se calculó la concentración usando la absorbancia a 260 nm y la pureza con la relación 260/280 nm. Como blanco se colocó agua desionizada estéril en los dos pozos superiores.

### **8.3.2 Reacción en Cadena de la Polimerasa**

Se amplificaron los genes 5.8s-ITS y D1/D2 rDNA 26S. La reacción de PCR se realizó en un volumen de 50 µL, utilizando dos pares de primers descritos por Esteve-Zarzoso *et al.* (1999) y White *et al.* (1990), respectivamente (Tabla 3) utilizando un termociclador *Tpersonal* (Biometra). La mezcla de reacción consistió de buffer 1X, 2.25 mM de MgCl<sub>2</sub>, 20 µM de cada dNTP, 1.25 U de Taq polimerasa de alta fidelidad (Invitrogen) y agua desionizada estéril (Tabla 4). Se utilizaron 100 ng de templado en cada reacción. Como control negativo se incluyó un tubo con la mezcla de reacción sin ADN. Los tiempos, temperaturas y ciclos se muestran en la Tabla 5. Después de la reacción, los tubos se conservaron en congelación a -18 °C.

Se visualizaron los productos de PCR mediante una electroforesis en gel de agarosa al 2 % (p/v) bajo las mismas condiciones mencionadas en la sección 8.3.1.

### **8.3.3 Amplificación aleatoria de ADN polimórfico**

Se realizó una reacción de PCR utilizando el primer descrito por Fadda *et al.* (2004) (Tabla 3) bajo las condiciones mencionadas anteriormente. La mezcla de reacción consistió de buffer 1X, 2.25 mM de MgCl<sub>2</sub>, 40 µM de cada dNTP, 1.25 U de Taq polimerasa de alta fidelidad (Invitrogen) y agua desionizada estéril (Tabla 4). Se utilizaron 100 ng de templado en cada reacción, como control negativo se incluyó un tubo con la mezcla de reacción sin ADN. Los tiempos, temperaturas y ciclos se muestran en la Tabla 5. Después de la reacción, los tubos se conservaron en congelación a -18 °C.

Se visualizaron los productos de PCR mediante una electroforesis en gel de agarosa al 2 % (p/v) bajo las mismas condiciones mencionadas en la sección 8.3.1

**Tabla 3.** Cebadores utilizados en las reacciones de PCR.

Cebador	Secuencia 5'-3'	Referencia
ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	Esteve-Zarzoso <i>et al.</i> (1999)
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	
NL1	GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG	White <i>et al.</i> (1990)
NL4	GGTCCGTG TTTCAAGACGG	
M13	GAGGGTGGCGGTTCT	Fadda <i>et al.</i> (2004)

**Tabla 4.** Concentración de reactivos en las reacciones de PCR.

Reactivo	5.8s-ITS y D1/D2 rDNA 26S		M13	
	Cantidad x tubo	Mezcla de reacción.	Cantidad x tubo	Mezcla de reacción.
Buffer (10X)	5 µL	1 X	5 µL	1 X
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	4.5 µL	2.25 mM	4.5 µL	2.25 mM
dNTP's (10 mM)*	0.5 µL	100 µM	1 µL	200 µM
Primer Forward (10 µM)	2.5 µL	0.5 µM	1 µL	1 µM
Primer Reverse (10 µM)	2.5 µL	0.5 µM	-	-
Taq (5U/µL)**	0.25 µL	0.025 U/µL	0.5 µL	0.050 U/µL
Templado (100 ng/µL)	1 µL	100 ng	1 µL	100 ng
Agua	Cbp 50 µL	-	Cbp 50 µL	-

\*Invitrogen \*\*Platinum® Taq DNA polymerase high fidelity.

**Tabla 5.** Condiciones durante las reacciones de PCR.

Periodo	5.8S-ITS		D1/D2		M13	
	Temperatura/Tiempo	# Ciclos	Temperatura/Tiempo	# Ciclos	Temperatura/Tiempo	# Ciclos
Desnaturalización	95 °C/ 5 min	1	95 °C/ 5 min	1	95 °C/ 5 min	1
Desnaturalización	94 °C / 1 min	35	94 °C / 1 min	30	93 °C / 45 seg	40
Alineamiento	55.5 °C / 2 min		52 °C / 45 seg		44,5 °C / 1 min	
Extensión	72 °C / 2 min		72 °C / 1 min		72 °C / 1 min	
Extensión	72 °C / 10 min	1	72 °C / 10 min	1	72 °C / 6 min	1

### **8.3.4 Análisis de restricción**

Se tomaron 10  $\mu$ L de cada producto de PCR sin purificar y se colocaron en tubos de 100  $\mu$ L. Aparte se preparó una mezcla con cada enzima de restricción (2 U por reacción) con el buffer del mismo fabricante y agua. Se homogenizó la mezcla y se agregaron 5  $\mu$ L a los tubos con el producto de PCR. Se incubaron a 37 °C por 3.5 h. Una vez finalizada la reacción se visualizaron los productos de la restricción mediante una electroforesis en gel de agarosa al 2 % (p/v) bajo las mismas condiciones mencionadas en la sección 8.3.1.

### **8.3.5 Purificación de productos de PCR**

Los amplicones del dominio D1/D2 se purificaron utilizando el kit *PCR Clean up* (Millipore®). Para esto se colocaron las columnas moradas con el filtro hacia abajo sobre tubos eppendorf de 1.5 mL, se agregaron 355  $\mu$ L de agua desionizada estéril sobre cada una sin tocar el filtro con la punta. Posteriormente se agregaron 45  $\mu$ L de cada producto de PCR en cada columna, se cerraron los tubos y se centrifugaron 15 min a 3500 rpm. Se transfirieron las columnas de manera invertida sobre tubos nuevos, se agregaron 25  $\mu$ L de agua desionizada estéril y se centrifugaron a 3500 rpm por 2 min. Se evaluó la concentración y pureza de los productos puros mediante una electroforesis en gel de agarosa al 2 % (p/v) bajo las mismas condiciones mencionadas en la sección 8.3.1.

### **8.3.6 Secuenciación**

Los productos de PCR puros se enviaron a secuenciar a Laragen Inc. (Culver City, California, USA). Se diluyeron a una concentración de 10 ng/ $\mu$ L, para esto se tomaron 10  $\mu$ L de cada producto de PCR puro y se agregó la cantidad necesaria de agua desionizada estéril para llegar a esta concentración. Las secuencias obtenidas se compararon con la base de datos del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI) utilizando la herramienta BLAST.

## **8.4 Determinación del potencial probiótico**

### **8.4.1 Crecimiento a 37 °C**

Se tomó una asada de los cultivos conservados en medio GELPA inclinado y se transfirió a un vial con 5 mL de YPD (Anexo 13.2), se incubó 18-24 h a 30 °C. Se tomó 1 mL de este cultivo y se inoculó en matraces con 50 mL del mismo medio. Se cuantificó el crecimiento midiendo la densidad óptica (DO) a 600 nm en los tiempos 0, 24, 48 y 72 h. Se realizó un experimento por duplicado para cada muestra. Para leer la DO se tomó 1 mL del matraz y se hicieron diluciones necesarias para que la DO quedara dentro del intervalo estadísticamente confiable (0.1-1.0). Para el blanco y las diluciones se utilizó medio YPD estéril. Se multiplicó el valor de absorbancia por el factor de dilución y se obtuvieron los resultados. Se determinó el número de células viables mediante cuenta en placa al inicio ( $t_0$ ) y al final ( $t_{72}$ ). Para esto se

hicieron diluciones decimales seriadas tomando 5 mL del cultivo y se diluyeron en 45 mL de solución salina estéril al 0.85 % (m/v), de aquí se tomaron 500  $\mu$ L para hacer las siguientes diluciones en viales con 4.5 mL de la misma solución salina. Se sembraron 3 diluciones por duplicado en cajas con medio YPD (Anexo 13.2) y se incubaron a 37 °C por 48 h. Para realizar el conteo se tomaron en cuenta aquellas diluciones que contenían el número de colonias dentro del rango estadístico correcto (15-150 colonias) (Ramírez *et al.*, 2008). Las levaduras se observan como colonias de color blanco a crema.

#### **8.4.2 Curvas de crecimiento células vs. densidad óptica**

Para relacionar los resultados de densidad óptica con la concentración de células se realizaron curvas de calibración de la siguiente manera: se tomó una asada de cada cultivo conservado en los tubos con GELPA (Anexo 13.2) inclinado y se sembró por estría en agar YPD (Anexo 13.2). Se incubaron 48 h a 30 °C. Posteriormente se tomó abundante cantidad del cultivo y se suspendió en un vial con 5 mL de PBS pH 7.4 (Anexo 13.3). De esta solución concentrada se tomaron distintos volúmenes y se colocaron en viales con PBS. Se buscaron 5 tubos con densidades ópticas entre 0.1 y 1.0. Una vez se obtuvieron, se contaron las células en una cámara de Neubauer (hematocitómetro). Para esto se tomaron 500  $\mu$ L de la suspensión celular y se mezclaron con el mismo volumen de azul de metileno al 0.1 % (m/v). Se mezclaron y se colocaron 10  $\mu$ L en la cámara. Se contaron 5 campos en el microscopio (Olympus CX40) en diagonal. El número de células contadas fue multiplicado por 2 (factor de dilución), por 5 (para obtener los 25 campos totales) y por 10000, debido al volumen de la cámara. De esta manera se obtuvieron el número de células por mililitro.

#### **8.4.3 Crecimiento en pH ácido**

Se tomó una asada de los cultivos conservados en medio GELPA (Anexo 13.2) inclinado y se transfirió a un vial con 5 mL de YPD (Anexo 13.2), se incubó 72h a 30 °C. Se tomaron 0.1 mL de este cultivo y se inocularon en viales con 5 mL de YPD (Anexo 13.2) acidificado a pH 2.5 con HCl 1N. Se inocularon los tubos con 2 % (v/v) a partir de un cultivo en fase estacionaria (72 h), se midió la concentración del inóculo mediante cuenta en placa. Como control se realizó el mismo experimento pero en medio sin acidificar (pH 6.5). Se midió la concentración de inóculo mediante cuenta en placa. Se incubaron a 37 °C y se tomaron muestras al tiempo 0, 3 y 24 horas; se realizó el conteo en placa, para lo cual se tomaron 0.5 mL de los cultivos anteriores y se hicieron diluciones decimales seriadas con viales con 4.5 mL de solución salina estéril (0.85 % p/v) y se sembraron por extensión en placas de medio YM (Anexo 13.2), se incubaron 48 h a 30 °C y se tomaron las dentro del rango estadístico correcto. Se realizaron 3 experimentos independientes, cada uno por duplicado (n = 6).

Para preparar el medio acidificado se prepararon 100 mL de YPD (Anexo 13.2) de manera convencional y posteriormente se agregó HCl 1N hasta llegar al pH deseado. Se colocaron 5 mL en viales y se esterilizaron en autoclave a 121 °C por 15 min. Se realizó una prueba de esterilidad incubando los medios a 30 °C durante 48 h y, debido a que se forma un precipitado, se sembraron placas de YM para verificar que no se hubieran contaminado los medios acidificados. El pH final del medio de cultivo varió entre 2.40 y 2.60.

#### **8.4.4 Crecimiento en presencia de sales biliares**

Se tomó una asada de los cultivos conservados en medio GELPA (Anexo 13.2) inclinado, se transfirió a un vial con 5 mL de YPD (Anexo 13.2) y se incubó 72h a 30 °C. Se tomaron 0.1 mL de este cultivo y se inocularon en viales con 5 mL de medio YNB (Anexo 13.2) adicionado con 0.5 % (m/v) de dextrosa y con 0, 0.5 y 1.5 % (m/v) de sales biliares (Anexo 13.2). Se incubaron 48 h a 37 °C y se tomaron muestras en los tiempos 0, 3 y 24 h. Se midió el crecimiento mediante densidad óptica a 600 nm. Se realizaron dos experimentos independientes cada uno por duplicado (n = 4).

Para determinar si las levaduras son capaces de hidrolizar las sales biliares, se sembraron por estría en placas de YPD (Anexo 13.2) con 0.5 % (m/v) de sales biliares y se incubaron a 37 °C durante 48 h. Se observó la presencia o ausencia de un halo alrededor de las colonias para saber si la prueba era positiva o negativa, respectivamente. Además, se comparó la morfología de las colonias crecidas en este medio con colonias en YPD sin sales biliares (Dashkevicz & Feighner, 1989).

#### **8.4.5 Actividad antimicrobiana**

Se realizó la prueba mediante la técnica de difusión en agar. Se utilizaron como microorganismos indicadores *E. coli* O157:H10 (EHEC), *Salmonella enterica* Typhimurium ATCC 14028, *Listeria monocytogenes* CFQ-103 (Cepario de la Facultad de Química), *S. aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* ATCC 11778 y *Candida albicans* ATCC 14053. Para cada experimento se utilizó como control positivo Clorhexidina 0.2 % (m/v) y agua destilada estéril como control negativo. Los sobrenadantes para la prueba se obtuvieron a partir de cultivos de 72 h en medio KTP (*Killer Toxin Production*) que es caldo YPD tamponado a pH 5 con buffer de fostato-citrato 50 mM y adicionado con 50 g/L de glicerol (Bajaj *et al.*, 2013). Para esto se tomó una asada de los cultivos conservados en medio GELPA (Anexo 13.2) inclinado y se transfirió a un vial con 5 mL de YPD (Anexo 13.2), se incubó 24 h a 30 °C, posteriormente se inocularon 500 µL de estos cultivos en viales con medio KTP (Anexo 13.2) y se incubaron con agitación a 30 °C durante 72 h. Una vez transcurrido ese tiempo se centrifugaron los cultivos a 14000 rpm a 4 °C durante 10 min, se tomó el sobrenadante con micropipeta y se repitió el proceso. Los sobrenadantes se conservaron por un periodo máximo de 5 días en refrigeración.

Se prepararon placas con BHI (para bacterias) y YPD (para *C. albicans*) (Anexo 13.2), ambas con agar al 1.7 % (m/v). Se sometieron a prueba de esterilidad. Por otro lado, se prepararon tubos con 10 mL de los mismos medios pero con menor concentración de los componentes para las sobrecapas, pero con 0.8 % (m/v) de agar (Anexo 13.2). Los microorganismos patógenos se reactivaron tomando 50  $\mu$ L de cultivos en ultracongelación (-70 °C), se colocaron en viales con 5 mL de BHI o YPD y se incubaron 18-24 h a 37 °C. Transcurrido este tiempo se inocularon 500  $\mu$ L de estos cultivos en viales con 5 mL de medio estéril y se incubaron a 37 °C durante 6 h (Tavera, 2010). Se inocularon 30  $\mu$ L de la dilución correspondiente de los microorganismos indicadores en la sobrecapa de agar en sobrefusión (45 °C) para después ser vertida en una placa de agar en cuya superficie se encontraban sobrepuestos tubos de vidrio de 1 cm de diámetro (externo) y 2 cm de altura. Una vez que gelificó la sobrecapa se retiraron las torres de vidrio para formar los pozos, en los cuales se colocaron los sobrenadantes o los controles. Las cajas se incubaron con la tapa hacia arriba a 37 °C durante 18 h. Posteriormente se inspeccionaron las cajas de manera visual. La inhibición del crecimiento es evidenciada mediante un halo alrededor de los pozos.

#### **8.4.6 Formación de biopelícula**

Se tomó una asada de los cultivos conservados en medio GELPA (Anexo 13.2) inclinado y se transfirió a un vial con 5 mL de YPD (Anexo 13.2), se incubó 72 h a 30 °C. Se transfirieron 1.5 mL a un tubo eppendorf, se centrifugó el cultivo (10000 rpm, 4 °C, 10 min). Se lavaron las células con 1.5 mL de agua destilada estéril y se resuspendieron en 1 mL de PBS (Anexo 13.3). Posteriormente se diluyeron con el mismo buffer hasta obtener una densidad óptica de 0.5 a 600 nm ( $20\text{-}35 \times 10^6$  UFC/mL), para esto se colocó 1 mL de la suspensión celular anterior en un vial con 5 mL de PBS, se leyó la absorbancia y cuando fue necesario se agregaron más células en volúmenes de 100  $\mu$ L hasta obtener la densidad óptica deseada. Por otro lado se prepararon placas de poliestireno estériles de 12 pozos (Thermo Scientific) con 2 mL de caldo YPD (Anexo 13.2). Se inocularon 0.1 mL de la suspensión celular y se incubaron 48 h a 37 °C sin agitación. Una vez transcurrido el tiempo se removió el medio de cultivo con cuidado utilizando una micropipeta. Se agregaron 2 mL de formaldehído al 10 % (v/v) para fijar las células y se incubó a temperatura ambiente toda la noche. Se retiró el formaldehído volteando cuidadosamente las placas sobre una charola. Se agregaron 2 mL de agua destilada y se agitó suavemente la placa para remover las células no adheridas. Se retiró el sobrenadante volteando nuevamente la placa y se repitió el proceso 2 veces más. Para teñir las células se agregaron 2 mL de cristal violeta 1 % (m/v) y se incubaron a temperatura ambiente 45 min. Se retiró el colorante, se lavaron las células con 2 mL de agua destilada con agitación y finalmente se resuspendieron en 4 mL de isopropanol. La suspensión se leyó en el espectrofotómetro a 490 nm. Se incluyó como control negativo el medio

de cultivo sin inóculo y como control positivo *Candida albicans* ATCC14053. Ambos controles se trataron igual que las muestras y éstos representaron el 0 y 100 % de la biopelícula formada para comparar los resultados, respectivamente. Para obtener las fotografías se realizó el mismo procedimiento pero en lugar de agregar isopropanol se cortó el fondo de los pozos con ayuda de un cúter flameado. Éstos se pegaron a portaobjetos y se observaron en un microscopio de campo claro (Olympus CX40) con un aumento total de 1000X.

#### **8.4.7 Resistencia al paso sucesivo a través del tracto gastrointestinal**

Se realizó de acuerdo con la metodología descrita por Visozo *et al.* (2006). Para este experimento se prepararon soluciones de lisozima, jugo gástrico y jugo pancreático artificiales. La lisozima se preparó a una concentración de 100 ppm en solución electrolítica estéril (6.2g/L NaCl, 2.2 g/L KCl, 0.22g/L CaCl<sub>2</sub> and 1.2 g/L NaHCO<sub>3</sub>) y se esterilizó mediante filtración con membrana de 0.22 µm. Para el jugo gástrico se disolvieron 3 g /L de pepsina (Sigma Aldrich) en la misma solución electrolítica y se ajustó el pH a 2.5 con HCl 5 M. Esta solución se esterilizó mediante filtración con membrana de 0.22 µm. El jugo pancreático artificial se preparó disolviendo 1 g/L de pancreatina (Sigma Aldrich) en la siguiente solución: 6.4 g/L NaHCO<sub>3</sub>, 0.239g/L KCl, 1.28g/L NaCl y 0.5 % de sales biliares, ajustada a pH 7.2 con HCl 1N. Una vez disuelta la enzima se esterilizó la solución someténdola a luz UV durante 15 min ya que se forma un precipitado y era imposible de filtrar. Se sometió a prueba de esterilidad sembrando en placas de BHI y YPD (anexo 13.2). Todas las soluciones se prepararon el día del experimento utilizando material previamente esterilizado.

Se partió de cultivos de 72 h (fase estacionaria) crecidos en YPD (anexo 13.2). Se tomaron 1.5 mL de cada cultivo, se colocaron en micro-tubos y se centrifugaron a 12 000 rpm durante 5 min. Se descartó el sobrenadante y se agregaron nuevamente 1.5 mL de cultivo. Se repitió el proceso un total de 3 veces, se lavaron las células con 1.5 mL de solución salina 0.85 % (m/v) y finalmente se suspendieron las células en la misma solución hasta obtener una densidad óptica de 1.5, lo cual corresponde a  $1 \times 10^7$ - $1 \times 10^8$  células/mL. Se tomaron 1.5 mL de inóculo, se colocaron en un micro tubo nuevo y se agregaron 1.5 mL de solución de lisozima. Se incubaron los tubos con agitación durante 5 min. Se tomó una muestra de 500 µL, se hicieron diluciones decimales seriadas con solución salina 0.85 % (m/v) y se sembraron en placas de YM (anexo 13.2). Posteriormente se colocaron los 2.5 mL restantes en un vial, se agregaron 5 mL de solución de pepsina y se incubaron las muestras durante 1 h. Al transcurrir este tiempo se tomaron 500 µL para el conteo de células. Finalmente, se colocaron los 7 mL restantes del cultivo en un tubo *Falcon* de 50 mL, se agregaron 32 mL de la solución de pancreatina con sales biliares y se incubaron las muestras

durante 2 h a 37 °C. Se tomaron 500 µL para el conteo de células nuevamente. Para el cálculo de UFC/mL se multiplicaron los resultados por los factores de dilución.

### **8.5 Análisis estadístico**

Se realizó el análisis de los resultados de pH y sales biliares para cada tiempo de fermentación (0, 3 y 24 horas) y cada una de las condiciones de cultivo (pH ácido y sales biliares) utilizando el programa *IBM S.P.S.S. Statistics*. Se realizaron 2 tipos de análisis de varianza, uno de tipo aleatorio en donde sólo se evaluó el efecto de las 10 cepas sobre la concentración de UFC/células y otro de tipo en bloques en donde se evaluaron los efectos de las cepas sobre la concentración de UFC/células y del número de réplicas realizado. Los valores de F para la variable cepas obtenidos en cada uno de los 2 análisis de varianza realizados se compararon y en el diseño donde se obtuvo el mayor valor de F calculada fue en donde se interpretó el efecto de las cepas. Cuando en el análisis de varianza al comparar el valor de F calculada con el valor de F de tablas se obtiene como resultado diferencia de tipo significativo o altamente significativa a continuación se realizaron las pruebas de rango múltiple de SNK y Duncan y se interpretó la prueba donde se obtuvo un mayor número de grupos.

Para la prueba de formación de biopelícula se realizó un análisis de varianza de tipo aleatorio con un nivel de significancia de  $\alpha = 0.05$  utilizando el programa *Statgraphics Centurion XV*. Posteriormente se realizaron las pruebas de rangos múltiples de Diferencia Mínima Significativa, Duncan y Tukey, todas con el mismo nivel de significancia que la ANOVA. Esta última fue la que mejor separó los aislados debido a que se obtuvo un mayor número de grupos homogéneos y por lo tanto los resultados se interpretaron utilizando esta prueba.

Los resultados del paso sucesivo a través del tracto gastrointestinal fueron realizados con un análisis de varianza de tipo aleatorio con un nivel de significancia de  $\alpha = 0.05$ . Debido a que no hubo diferencia significativa entre las cepas no fue necesario realizar pruebas estadísticas posteriores.

## 9 Resultados y discusión

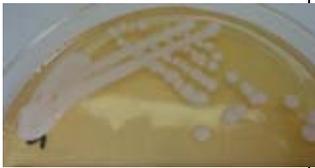
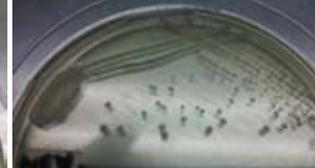
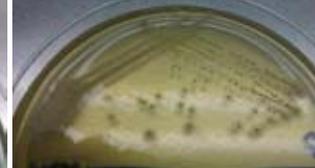
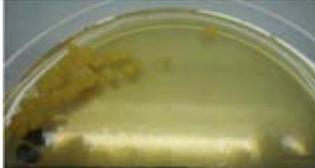
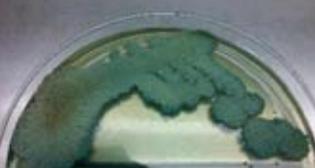
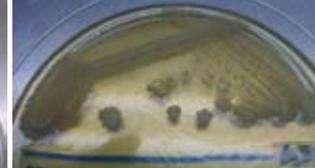
### 9.1 Recuperación de aislados y clasificación morfológica

Se recuperaron 44 aislados viables a partir de los muestreos de los años 2010, 2011 y 2012. Algunos eran levaduras o bacterias puras y otros eran cultivos mixtos. Se seleccionaron sólo los que eran levaduras puras (24 aislados). Se crecieron en diferentes medios y se agruparon de acuerdo con observaciones macroscópicas y microscópicas (Tabla 6). De las 24 levaduras puras, 9 presentaron morfología tipo A; 5 tipo B y 5, C; el resto fueron diferentes cada una. En medio YPD las colonias tipo A son tamaño mediano, circulares, borde entero, convexas, cremosas, color blanco opaco. Las colonias tipo B son similares pero más chicas, butirosas y color blanco brillante. Las C son grandes, circulares, borde entero, planas, butirosas, color gris con el centro blanco elevado. En la tabla 6 se muestran fotos de las colonias maduras de cada tipo.

Tras 48 h de incubación en medio WL las colonias presentaron coloración verde-azul. Se observó aclaramiento del medio de color azul a verde-amarillo alrededor de las colonias debido al vire del indicador azul de bromocresol por la disminución del pH. En este medio se observaron diferencias entre la colonia 9 y 37-40, que no se distinguían en YPD, pero 24 y 28 se veían iguales. Después de la incubación, se guardaron las cajas en el cuarto frío por un mes y se realizaron nuevamente las observaciones. En extracto de malta todas las colonias excepto las colonias tipo B presentaron formación de pseudo hifas, lo cual era evidenciado macroscópicamente por el borde de las colonias (Tabla 6).

Las levaduras pueden vivir como células independientes o formar estructuras llamadas hifas, las cuales son una red de filamentos que en conjunto se llaman micelio (Kurtzman & Fell, 2011). El cambio fenotípico entre estas estructuras depende de las condiciones ambientales, *i.e.* pH, humedad, disponibilidad de nutrientes, etc. (Madigan & Martinko, 2005). La clasificación de levaduras de acuerdo a su morfología ha sido útil desde antes de que existiera la biología molecular. En el ámbito clínico, las placas de dalmau han servido para identificar levaduras en pacientes con micosis. Esta prueba sirve para determinar si las levaduras son capaces de formar pseudohifas bajo ciertas condiciones. Junto con pruebas bioquímicas, ayudan a identificar a *Candida albicans* y otras levaduras patógenas (Koehler *et al.*, 1999). Cabe mencionar que algunos de los genes de virulencia de *C. albicans* son genes relacionados con el dimorfismo y cambio fenotípico, *e.g.* *phr1*, *hyr1*, *efg1* (Navarro-García *et al.*, 2001). De los aislados evaluados, todos excepto *Clavispora lusitaniae* formaron pseudo hifas, por lo que sería interesante realizar pruebas posteriores para ver si poseen algún factor de virulencia además del dimorfismo (*e.g.* adhesinas, aspartil proteinasas secretadas o fosfolipasas) (Calderone & Fonzi, 2001).

**Tabla 6.** Morfología de las colonias de levaduras aisladas del atole agrío en diferentes medios de cultivo: YPD, WL y Extracto de Malta (Anexo 13.2).

Clave	Aislados	YPD	WL	Extracto de malta
A	1, 4, 6, 7, 10, 12, 15, 18, 20			
B	9, 37, 38, 39, 40			
C	8, 41, 42, 43, 44			
D	24			
E	25			
F	28			
G	32			
H	36			

## 9.2 Identificación de aislados

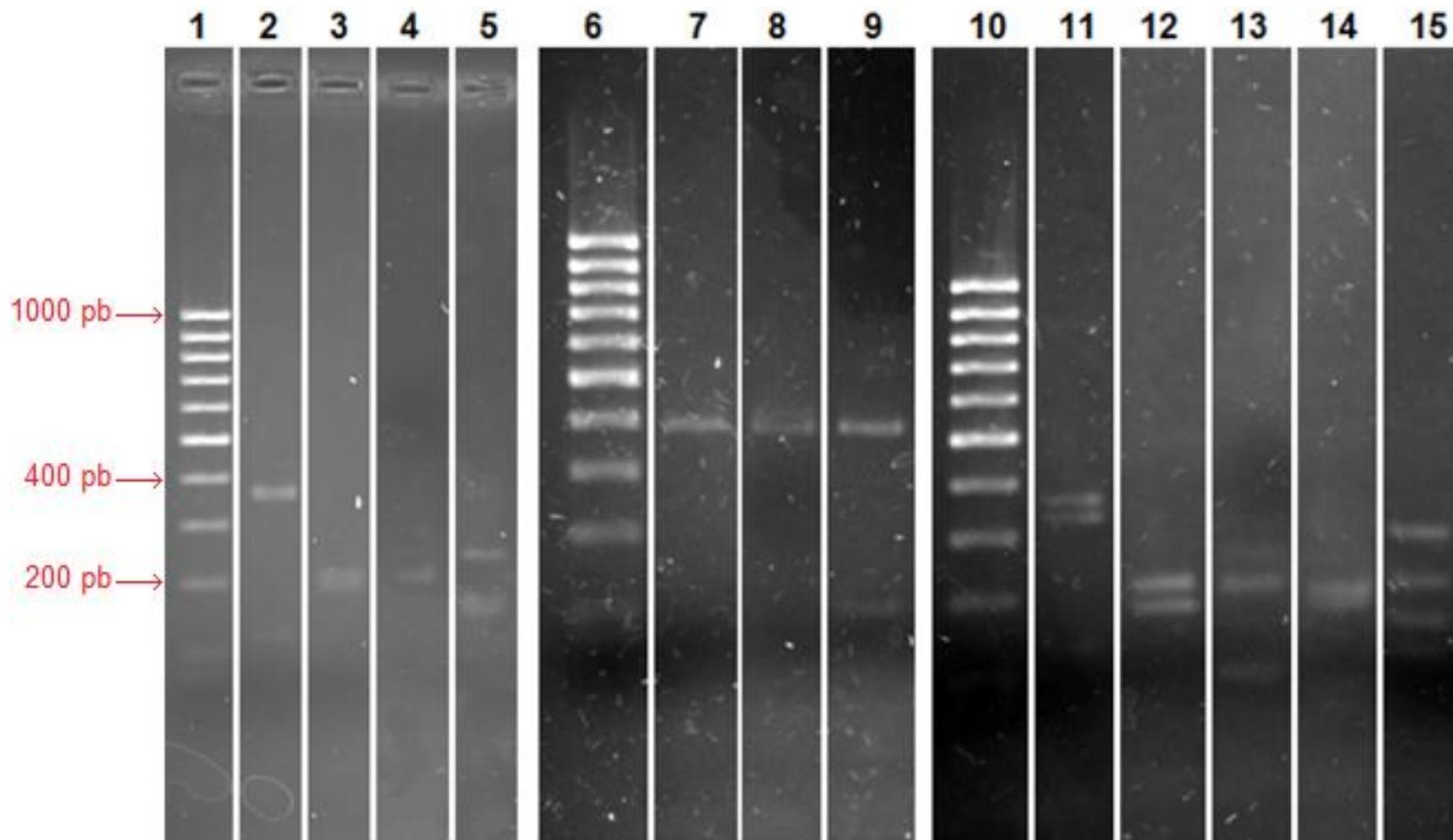
Se identificaron los aislados utilizando los perfiles de fragmentos de restricción (RFLP) del gen 5.8s-ITS y secuenciación del dominio D1/D2 de la subunidad ADNr 26S. La amplificación de los ITS mostró productos entre 370 y 515 pares de bases. Las enzimas de restricción cortaron los amplicones en productos de diferentes tamaños. De acuerdo con estos perfiles, los aislados se dividieron en 9 grupos y se seleccionó uno de cada perfil para identificarlo por secuenciación (Tabla 7).

**Tabla 7.** Perfiles de polimorfismos de fragmentos de restricción (RFLP) de la región ITS-5.8S de las levaduras usadas en este estudio. Los amplificadores fueron digeridos con las enzimas *Hae III*, *Hinf I* y *Hha I*.

Gpo	Aislados	PA*	<i>Hae III</i>	<i>Hinf I</i>	<i>Hha I</i>
-	Sb	830	320+230+180+140	370+370+120	370+340
I	1, 4, 6, 7, 10, 12, 15, 18, 20	395	390	200+195	220+190
II	8, 41, 42, 43, 44	510	385+100	245+160+150	220+210+70
III	37, 38, 39, 40	380	380	220	230+110
IV	9	510	400+110	260+240	285+220

\*Tamaño del producto de amplificación (pares de bases) de la región 5.8S-ITS.

La mayoría de los aislados fueron identificados como *Candida intermedia* (Grupo I). Los grupos II y III fueron identificados como *Pichia kudriavzevii* y *Clavispora lusitaniae*, respectivamente. El aislado 9 se identificó como *Candida parapsilosis*. Los grupos V-IX se enviaron a secuenciar directamente sin hacer el análisis de restricción debido a que presentaban morfologías macroscópicas y microscópicas diferentes entre sí. La identificación de los 24 aislados corresponde a 6 géneros diferentes (Tabla 8). Coconceli (2013) aisló 343 levaduras de 17 especies diferentes. La más abundante fue *Pichia kudriavzevii*, seguido de *Clavispora lusitaniae*. La mayoría de las 15 especies restantes pertenecieron al género *Candida* (*C. intermedia*, *C. parapsilosis*, *C. pararugosa*, *C. quercitrusa*, *C. tropicalis*), *Pichia* (*P. fabianii*, *P. galeiformis*, *P. manshurica*) y *Trichosporon* (*T. asahii*, *T. japonicum*). También encontraron *S. cerevisiae* y *Wickerhamomyces anomalus*. Las levaduras identificadas en este estudio corresponden a algunas de las especies encontradas por Coconceli (2013) i.e. *Pichia kudriavzevii*, *Clavispora lusitaniae*, *Candida intermedia* y *C. parapsilosis*. Sin embargo, los hongos saprófitos del maíz no habían sido reportados anteriormente. Éstos se encontraron únicamente en el muestreo de 2011, lo cual puede indicar contaminación en la materia prima utilizada.



**Figura 3.** Electroforesis en gel de agarosa al 2 % (m/v) (70 V, 90 min) de los perfiles de restricción de los aislados. Carriles: Marcador de peso molecular, 1, 6 y 10. Sb: 2, 11 y 15. *Candida intermedia*: 3, 7 y 12. *Clavispora lusitaniae*: 4, 8 y 13. *Pichia kudrivzevii*: 5, 9 y 14. Carriles 1-5: *Hinf I*; carriles 6-9 y 15: *Hae III*; Carriles 10-14: *Hha I*.

**Tabla 8.** Identificación de aislados de levaduras del atole agrio por secuenciación del dominio D1/D2 del ADNr 26S (n=24).

Grupo	Proporción <sup>1</sup> (%)	Aislados	Identificación <sup>2</sup>	Identidad (%)
-	-	Sb	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99
I	37.50	1, 4, 6, 7, 10, 12, 15, 18, 20	<i>Candida intermedia</i>	99
II	20.83	8, 41, 42, 43, 44	<i>Pichia kudriavzevii</i>	99
III	16.67	37, 38, 39, 40	<i>Clavispora lusitaniae</i>	99
IV	4.17	9	<i>Candida parapsilosis</i>	99
V	4.17	36	<i>Pseudozyma parantarctica</i>	99
VI	4.17	25	<i>Ustilago esculenta</i>	95
VII	4.17	28	<i>Ustilago longissima</i>	99
VIII	4.17	32	<i>Moesziomyces bullatus</i>	100
IX	4.17	24	ND <sup>2</sup>	-

<sup>1</sup>Total de aislados de una especie divididos entre el total de aislados identificados (n=24).

<sup>2</sup>Comparando con la base de datos del NCBI. ND: No se determinó.

El género *Candida* tiene más de 200 especies, incluye todas las especies que no pueden ser clasificadas dentro de otros géneros de los ascomicetos asexuales, como consecuencia es un género muy heterogéneo (Esteve-Zarzoso *et al.*, 1999). Se han aislado de diversos ambientes como suelo, vegetales, agua y alimentos. Además forman parte de las membranas mucosas de mamíferos como el tracto gastrointestinal, boca y vagina (Castañón, 2016). Sin embargo, pueden ser patógenos oportunistas especialmente en personas inmunocomprometidas o con implantes o catéteres en el cuerpo. *C. albicans* es sin duda la de mayor importancia clínica, pero algunas otras especies pueden llegar a causar infecciones, dentro de las cuales se encuentran *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, entre otras (Papon *et al.*, 2013).

*Candida intermedia* forma parte de la microbiota natural de la cavidad bucofaríngea humana y se ha encontrado en la superficie de quesos madurados. Ha sido aislada de diversos alimentos como cerveza, frutas, salmuera (Barnett *et al.*, 2000; Kurtzman & Fell, 2011), leche cruda (Spanamberg *et al.*, 2004) y de bebidas fermentadas como el tepache (Moreno-Terrazas, 2005). Existen pocos reportes sobre *C. intermedia* como el agente causal de enfermedades en humanos. Sheng-Yuan *et al.* (2010), reportaron un caso de 2 pacientes con candidemia relacionada al uso de catéter venoso central y alimentación parenteral. Los pacientes fueron eficientemente tratados con fluconazol y no presentaron daño irreversible en sus órganos. Este es un caso aislado en el que la condición de los pacientes aumentó el riesgo de infección, pero en casos similares se ha descrito a *S. cerevisiae* como agente causal de fungemia, levadura generalmente reconocida como segura (GRAS).

*Candida parapsilosis* ha sido aislada de aceitunas, vegetales en estado de descomposición (Barnett *et al.*, 2000), pulque (Lappe & Ulloa, 1993) y yogurt (Kosse *et al.*, 1997). También ha sido aislada de piel sana, uñas infectadas y vejiga de vaca con mastitis (CBS, 2006). *C. parapsilosis* es considerada como la segunda levadura patógena oportunista, después de *C. albicans*. Se ha encontrado principalmente como agente causal de infección en pacientes de cirugía de córnea (Bourcier *et al.*, 2003).

El género *Pichia* es un género de la familia *Saccharomycetaceae*, actualmente se aceptan 20 especies (Kurtzman & Fell, 2011). Se reproducen de forma sexual, algunos anamorfos son especies del género *Candida*. *P. kudriavzevii* (antes *Issatchenkia orientalis*) se ha aislado de suelo, frutas y fermentaciones naturales como masa agria, *Towa* y jugo de piña fermentada; además es un aislado clínico común. Se ha estudiado su potencial biotecnológico en la desacidificación de vino (Mónaco *et al.*, 2014), como posible probiótico para disminuir el contenido de colesterol en lácteos fermentados (Li-Shui *et al.*, 2010) y producción de toxinas *killer* con efecto antibacteriano (Bajaj *et al.*, 2013). Adicionalmente, la secuenciación del genoma de *P. kudriavzevii* M12 reveló la presencia de genes que codifican para enzimas involucradas en la fermentación de xilosa y fitasas que pudieran utilizarse en la producción de bioetanol y en el procesamiento de alimentos y la agricultura (Chan, 2012). Sin embargo, Kurtzman & Fell (2011) sugieren que *P. kudriavzevii* sea clasificada como patógena debido a que en su forma asexual (*C. krusei*) ha sido aislada en muchos casos clínicos.

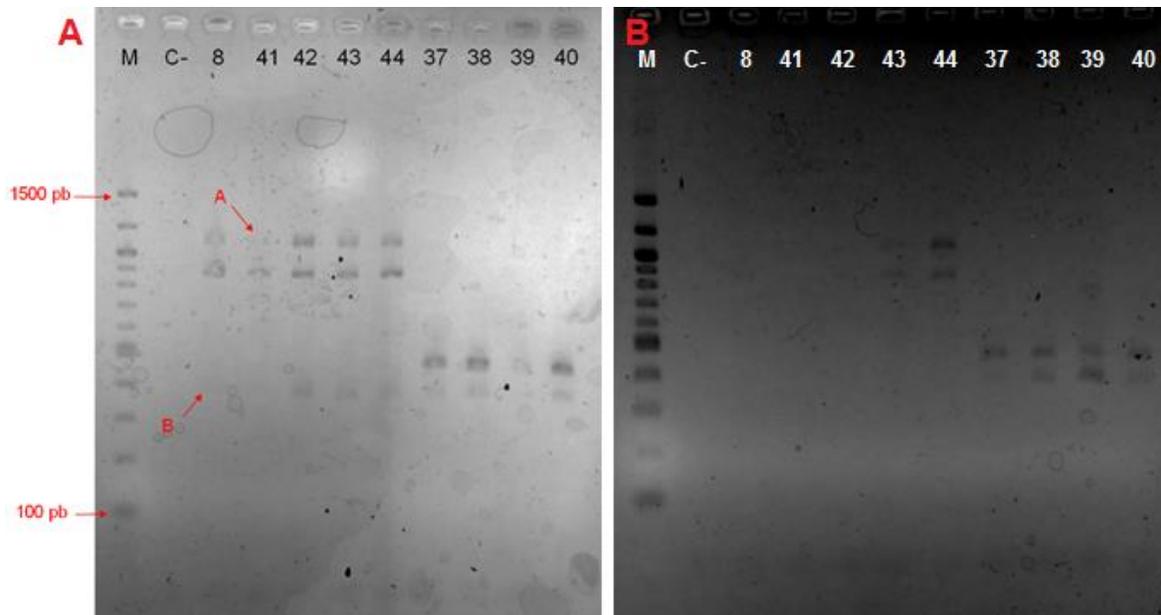
*Clavispora lusitaniae* es la forma sexual de *Candida lusitaniae*. Ha sido aislada del tracto gastrointestinal de cerdos, leche de vaca con mastitis, tejido muerto de cactus, de agave para la producción de tequila y de diversos casos clínicos, aunque no es considerada un patógeno verdadero, pues sólo afecta a personas inmunocomprometidas (Hurley *et al.*, 1987). Por otro lado, se encuentra presente en distintos alimentos fermentados tradicionales africanos como el Ogi, Mawe, Gowe y Tchoukoutou; y de zumos de frutas como jugo de naranja y agua de coco (Greppi *et al.*, 2013; Maciel *et al.*, 2013). Sahota *et al.* (2009) elaboraron una bebida fermentada a base de zanahoria en India utilizando como inóculo *C. lusitaniae*, la cual no se pasteurizaba al final de la fermentación, lo que podría indicar que es seguro consumir células vivas de la cepa que utilizaron en ese estudio.

El resto de los aislados corresponde a hongos saprófitos del maíz de los géneros *Ustilago*, *Pseudozyma* y *Moesziomyces*. El aislado 24 no pudo ser identificado debido a que su ADN no se extrajo exitosamente. Cabe mencionar que el aislado 25 tiene 95 % de identidad con *Ustilago esculenta* por lo que es posible que se trate de otra especie. Para esto se podría analizar la secuencia de bases de los espaciadores internos de la transcripción (ITS1 e ITS2) para corroborar su identidad.

En el muestreo de 2010 se identificaron 11 aislados: 9 de la fermentación sólida y 2 de la líquida; los cuales fueron 9 aislados de *Candida intermedia*, 1 de *Pichia kudriavzevii* y 1 de *Candida parapsilosis*. Éstas últimas se encontraron en los tiempos 24 h y tiempo 0 h de la fermentación sólida, respectivamente. En el muestreo de 2011 se encontraron únicamente los hongos saprófitos mencionados anteriormente. En la fermentación del 2012 se aislaron únicamente levaduras del tiempo 24 h, se encontró *Clavispora lusitaniae* en la fermentación líquida y *Pichia kudriavzevii* en la sólida. De las levaduras que se encontraron en mayor proporción, *C. intermedia* se encontró únicamente en el muestreo de 2010, mientras que *P. kudriavzevii* y *C. lusitaniae* en el muestreo de 2012.

En el atole agrio de Cuetzalan (Arce, 2007) se aislaron e identificaron levaduras de diferentes géneros durante la fermentación: *Cryptococcus usbekistanensis*, *Cryptococcus*, sp y *Cryptococcus. albidus*; *Candida parapsilosis* y *Kloeckera apiculata*. Además se aislaron mohos de los géneros *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium* y *Cladosporium*. La única levadura que se encontró en común es *Candida parapsilosis*, la cual ha sido aislada de varios alimentos elaborados a base de maíz. Las diferencias en la microbiota de ambos atoles se deben a que son dos procesos completamente diferentes. Cabe mencionar que *C. parapsilosis* se aisló únicamente en el tiempo 0 h del atole agrio de Villahermosa.

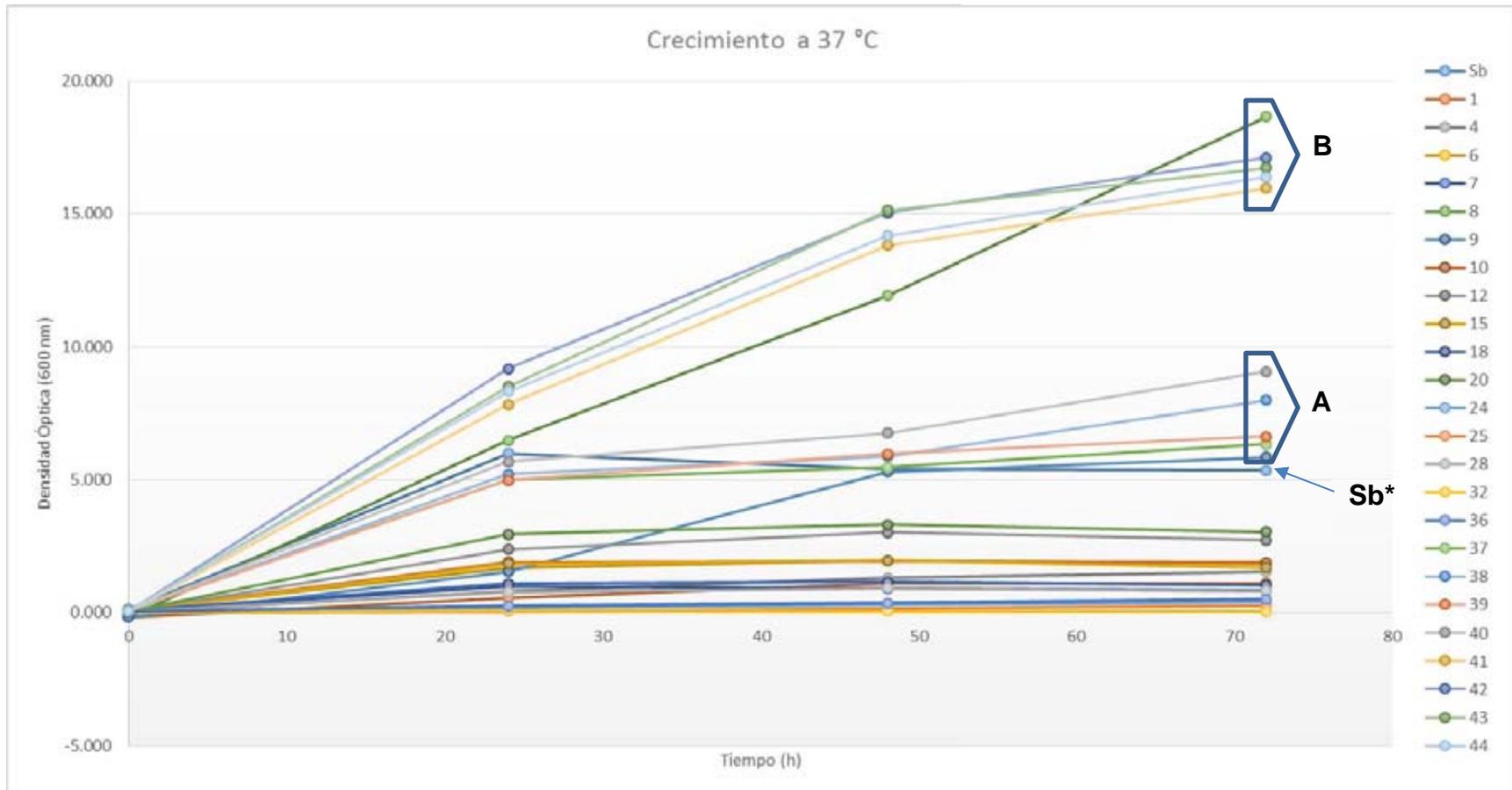
Los aislados de *Pichia kudriavzevii* y *Clavispora lusitaniae* se intentaron diferenciar a nivel de cepa mediante una amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPD) utilizando el cebador M13. Primero se realizaron las reacciones de PCR utilizando DNA de diferentes concentraciones (Figura 4A). Se puede observar que la banda marcada como A no aparece en el aislado 41 y la banda B no está presente en los aislados 8 y 41. Esto podría indicar que hay 3 cepas diferentes de *Pichia kudriavzevii*. Sin embargo, al repetir el experimento utilizando la misma concentración de ADN (100 ng/uL) como templado (Figura 4B) no se obtuvieron los mismos patrones de bandas. La reproducibilidad es una de las limitaciones de esta técnica (van de Zande & Bijlsma, 1995). Estos resultados no fueron suficientes para poder distinguir entre cepas de la misma especie. Para complementarlos se podría utilizar otro cebador.



**Figura 4.** Patrones electroforéticos de la amplificación con el primer M13. **A:** Productos de amplificación con 1 uL de templado (concentraciones variables) 419, 337, 1323, 441, 1853, 1070, 428, 284, 463 ng/uL. **B:** Productos de amplificación con misma concentración de templado 100 ng/uL. Los carriles están etiquetados con el nombre de las cepas. M: marcador de peso molecular de 100 pb (invitrogen).

### 9.3 Crecimiento a 37 °C

Como un primer criterio de selección de levaduras potencialmente probióticas se crecieron las 24 levaduras puras en medio YPD a 37 °C, que es la temperatura corporal humana y es a la temperatura a la cual se realizaron los experimentos posteriores. El inóculo varió entre  $(1 \times 10^{8.57} \pm 0.59)$  UFC/mL. Los resultados se muestran en la figura 5. Se puede observar que hay dos grupos que crecieron mejor que Sb (Grupos A y B). *Candida intermedia* presentó cuentas entre  $10 \times 10^2$  y  $25 \times 10^6$  UFC/mL después de 72 h. Los aislados restantes presentaron cuentas similares o mayores al control. Los aislados de *Pichia kudriavzevii*, correspondientes al grupo A de la figura, presentaron un mejor crecimiento a 37 °C, obteniéndose cuentas de hasta  $1 \times 10^{11}$  UFC/mL a las 72 h (Tabla 12, anexo 13.4.3). *Clavispora lusitaniae* (Grupo B) mostró una densidad óptica mayor al control, pero las cuentas fueron en algunos casos menores con respecto a Sb. A pesar de ser una temperatura no óptima para el crecimiento de levaduras, el hecho de que hayan sido capaces de crecer en cuentas tan altas se puede atribuir a que se aislaron de una zona geográfica con clima cálido húmedo, donde la temperatura máxima promedio en el mes de mayo es de 36 °C (INEGI, 2015). Los hongos saprófitos del maíz presentaron turbidez en el medio hasta después de 7 días de incubación.



**Figura 5.** Crecimiento de los aislados de levaduras del atole agrío a 37 °C en medio YPD líquido. Se muestra el promedio de dos experimentos independientes (n = 2). \* Sb: *S. boulardii*.

Con base en los resultados obtenidos, se seleccionaron los aislados identificados como *Pichia kudriavzevii* (cepas 8, 41-44) y *Clavispora lusitaniae* (cepas 37-40) para las siguientes pruebas.

#### 9.4 Crecimiento en pH ácido

Se evaluó el crecimiento en medio líquido YPD acidificado a pH 2.5 con HCl 1N. El ácido clorhídrico secretado en el estómago tiene pH de 0.9, pero los alimentos hacen que aumente hasta 3.0 (Zubaidy & Khidhr, 2014). Se escogieron los tiempos de 3 y 24 horas porque el primero simula el tránsito a través del estómago y el segundo para evaluar condiciones de estrés prolongado (Perricone *et al.*, 2014). Todos los aislados fueron capaces de crecer bajo estas condiciones (Figura 6). Al realizar el análisis de varianza se observa que no hay diferencia significativa ( $\alpha=0.05$ ) entre las cepas en el tiempo 3, pero sí hay en los tiempos 0 y 24 horas. Posteriormente se realizó una prueba de rangos de Duncan para agrupar a los aislados de acuerdo con las medias (Tablas 13-16). En el tiempo 24 horas la cepa que tiene estadísticamente mayor número de UFC es la 37. De las cepas de *Pichia kudriavzevii* todas fueron catalogadas dentro del mismo intervalo.

Como una prueba adicional, se inocularon los 9 aislados y Sb en medio YPD ajustado a pH 1 con HCl 5 M. Se incubaron durante 72 h a 37 °C y se registró el crecimiento observando presencia o ausencia de turbidez en el medio. Ninguna de las levaduras fue capaz de crecer bajo estas condiciones.

El ácido gástrico es producido por las células parietales en las glándulas gástricas. El pH de éste en el lumen estomacal varía entre 1.5 y 3.5 (Marieb & Hoehn; 2010). La acidez ayuda a desnaturalizar las proteínas para que puedan ser digeridas posteriormente en el intestino. Además, inhibe el crecimiento de bacterias patógenas para prevenir infecciones. El pH óptimo de crecimiento de la mayoría de las levaduras es más ácido que el de las bacterias, variando entre 3.5 y 5.0. De hecho, los medios de cultivo acidificados son una manera de hacer selectivos los medios para levaduras (Kurtzman & Fell., 2011). Esto explica por qué las levaduras fueron capaces de resistir las condiciones del experimento, mientras que la composición del medio explica por qué fueron capaces de crecer, pues se trata de un medio rico en nutrientes (Anexo 13.2).

La resistencia al pH ácido en *S. boulardii* se debe a la sobreexpresión de proteínas de genes relacionados a respuesta al estrés (Czeruca *et al.*, 2007). Se ha observado que hay dos tipos principales de genes de respuesta a estrés ambiental en levaduras. El primer grupo corresponde a genes que se expresan siempre independientemente del tipo de estrés. Se dividen en positivos y negativos, dependiendo del tipo de regulación genética. Para *S. cerevisiae*, los positivos están involucrados en procesos de oxidación y vías de señalización, incluyen genes

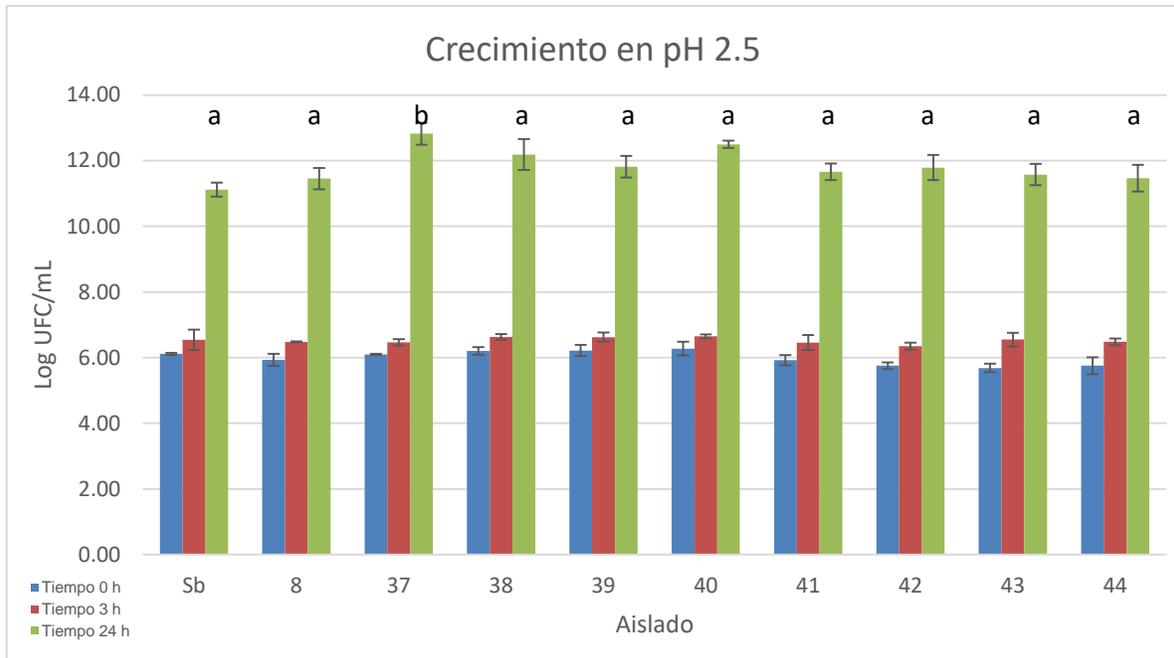
regulados por la proteína-quinasa A (PKA) y la red Msn2p/Msn4p. Los genes negativos incluyen genes involucrados en el crecimiento óptimo de la célula, como biogénesis de ribosomas y fermentación (Brion *et al.*, 2016). El segundo grupo corresponde a condiciones ambientales específicas (e.g. pH, temperatura, etc.) (Brion *et al.*, 2016). Los más estudiados son los genes de respuesta a choque térmico, que expresan proteínas específicas, llamadas HSP (*Heat Shock Protein*) (Mager & Ferreira, 1993).

Algunos autores han reportado levaduras no *Saccharomyces* resistentes a pH ácido (García-Hernández *et al.*, 2012; Lohith & Appaiah, 2014; Diosma *et al.*, 2014; Perricone *et al.*, 2014) y otros han reportado crecimiento (Pedersen *et al.*, 2012).

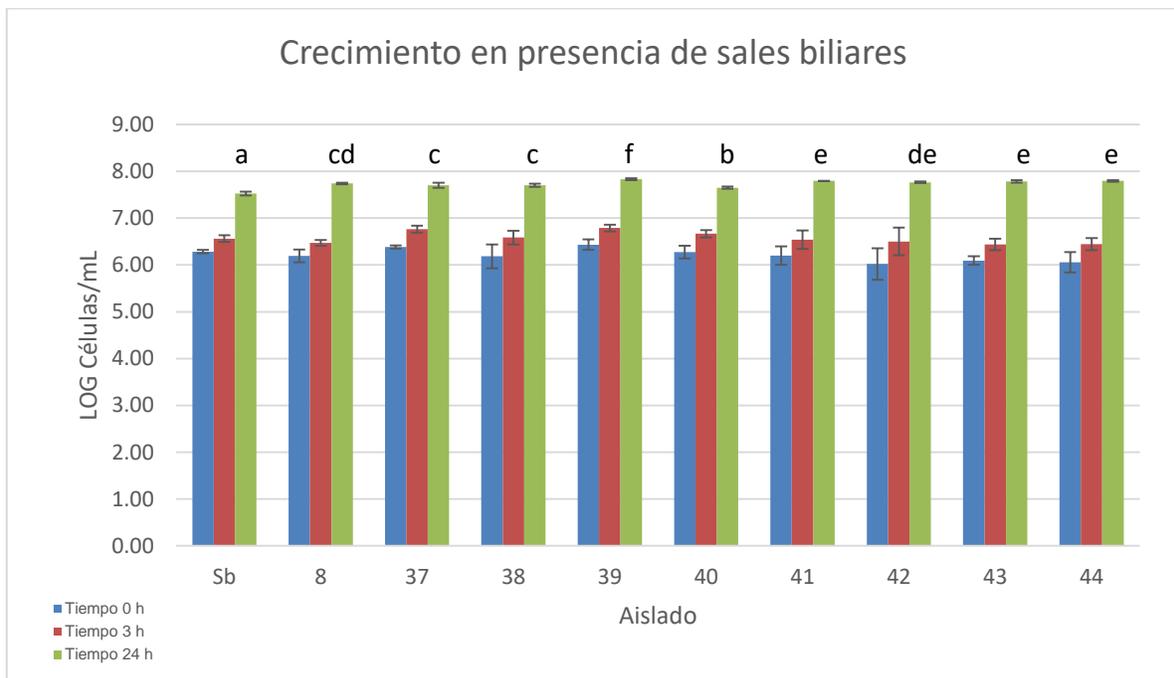
### **9.5 Crecimiento en presencia de sales biliares**

Inicialmente se probó la concentración mínima inhibitoria que recomienda el fabricante: 0.5 % (m/v) (Anexo 13.3). Al ver que todas las cepas crecían, se decidió aumentar la concentración al triple como fue probado por Solieri *et al.* (2014) para intentar discriminar entre cepas, sin embargo todas crecieron aún con esta concentración de sales biliares. Los resultados obtenidos fueron graficados como células/mL, para lo cual se realizaron las curvas de crecimiento de cada cepa (Anexo 13.4.6). Como se puede observar en la figura 7 el crecimiento de las distintas cepas fue similar en presencia de las sales biliares en comparación con Sb. Sin embargo, al realizar el análisis estadístico, se concluyó que en el tiempo 0 h, las de mayores cuentas fueron las de las cepas 37, 39, 40 y Sb; en el tiempo 3 h, 37, 39 y 40; y en el tiempo 24 h, la de mayores cuentas fue la cepa 39. De las cepas de *Pichia kudriavzevii* todas fueron catalogadas dentro del mismo rango excepto la cepa 8 (Tablas 17-20, Anexo 13.4.4).

En comparación con los resultados de pH 2.5, el crecimiento en presencia de sales biliares fue menor. En las dos condiciones se partió de cuentas de  $1 \times 10^6$  UFC/mL. Después de 24 horas de incubación se alcanzaron cuentas entre  $1 \times 10^{11}$ - $1 \times 10^{12}$  UFC/mL para pH ácido y  $1 \times 10^7$ - $1 \times 10^8$  UFC/mL para sales biliares. Esto se debe probablemente al medio de cultivo que se utilizó, ya que el YPD utilizado para las pruebas de pH tiene mayor cantidad de nutrientes que el YNB usado para las pruebas de sales biliares (Anexo 13.2). Como perspectiva se propone realizar los mismos experimentos pero en solución salina ajustada al mismo pH y adicionada de sales biliares. Esto con la finalidad de quitar el medio de cultivo y expresar los resultados como porcentaje de sobrevivencia (Vijendra & Prasad, 2005). Cabe mencionar que cuando se consumen probióticos dentro de una matriz, ésta tiene un efecto protector; de modo que al ingerir atole agrio, los microorganismos se encuentran protegidos por la matriz en la que se encuentran.



**Figura 6.** Crecimiento en caldo YPD ajustado a pH 2.5 con HCl 1N de los nueve aislados de levaduras y Sb. Promedios de 3 experimentos independientes (n=3). Letras diferentes indican diferencia significativa en la concentración de UFC/mL en el tiempo 24 h, según la prueba de rangos múltiples de Duncan.



**Figura 7.** Crecimiento de los 9 aislados de levaduras y Sb en caldo YNB con 0.5 % (m/v) de glucosa y 1.5 % (m/v) de sales biliares. Promedio de 2 experimentos independientes cada uno por duplicado (n=4). Letras diferentes indican diferencia significativa en la concentración de Células/mL en el tiempo 24, según la prueba de rangos múltiples de Duncan.

La mayoría de las publicaciones sobre potencial probiótico utilizan como primer criterio la resistencia a pH ácido y a sales biliares. Las condiciones varían un poco pero el intervalo de pH probado oscila entre 2 y 3, mientras que la concentración de sales biliares evaluado va desde 0.3 hasta 1.5 % (m/v). Algunos autores reportan resistencia y otros reportan crecimiento bajo estas condiciones. Se han reportado como resistentes a *Saccharomyces cerevisiae* y *Candida humilis* (Perricone *et al.*, 2014), *S. cerevisiae* e *Issatchenkia orientalis* (Lohith & Appaiah, 2014) y *Wickerhamomyces anomalus* (García-Hernández *et al.*, 2012). Por otro lado se han reportado como capaces de crecer bajo estas condiciones a *Kluyveromyces marxianus*, *Issatchenkia occidentalis*, *S. cerevisiae* y *S. unisporus* (Diosma *et al.*, 2014) y a *K. marxianus*, *Candida krusei*, *C. tropicalis*, *C. rugosa*, *C. norvegensis*, *C. fabianii*, *Trichosporon asahii* y *Candida albicans* (Pedersen *et al.*, 2012). En este trabajo se observó que todas las cepas de *Clavispora lusitaniae* y *P. kudriavzevii* fueron capaces de crecer. La última ya se había reportado (es la forma sexual de *C. krusei* y antes era llamada *I. occidentalis*) pero *C. lusitaniae* no había sido reportada. Es importante mencionar que estas características son específicas dependen de la cepa y no de la especie.

Como una prueba adicional, se evaluó la capacidad de los aislados de hidrolizar las sales biliares. Se encontró que, a pesar de ser capaces de crecer en presencia de las mismas, no pueden hidrolizarlas. Esto es porque no se observaron halos de precipitación alrededor de las colonias ni cambio de coloración en éstas en comparación con los cultivos crecidos en el mismo medio sin las sales biliares (Dashkevicz & Feighner, 1989). La presencia de la hidrolasa de sales biliares (Cholyglycine hydrolase, E.C.3.5.1.24) es deseable en microorganismos probióticos debido a que la desconjugación de las sales biliares estimula la producción de las mismas, jugando un papel regulatorio. Las sales biliares ayudan a la digestión de lípidos (e.g. el colesterol) en el intestino.

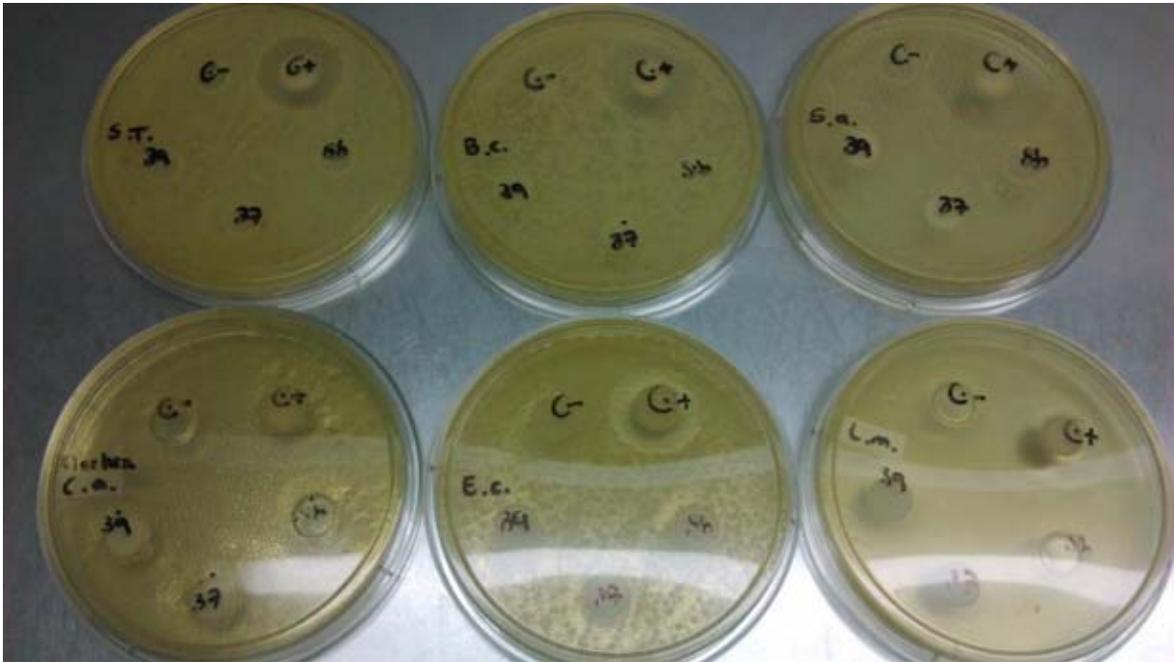
Con base en los resultados obtenidos, se seleccionaron 2 aislados de *C. lusitaniae* (37 y 39) y 3 aislados de *P. kudriavzevii* (8, 41 y 44) para experimentos posteriores.

## **9.6 Actividad antimicrobiana**

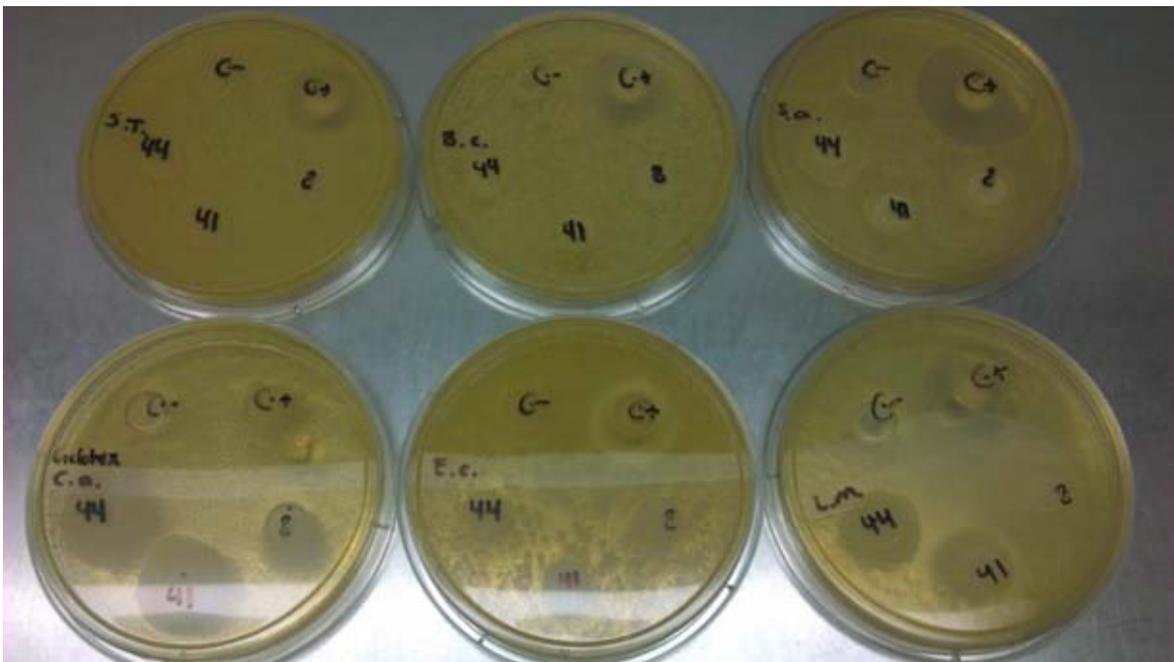
Existe una variedad de compuestos generados por levaduras que se han reportado como inhibitorias del crecimiento bacteriano. Dentro de éstas se encuentran los ácidos orgánicos (hexanóico, octanóico, decanóico), aminas, glicolípidos, péptidos y proteínas (Tabla 1). Incluso la producción de etanol inhibe el crecimiento de bacterias. El objetivo de esta prueba era ver si las levaduras seleccionadas podían inhibir bacterias patógenas. No se encontró actividad antimicrobiana contra los microorganismos probados (figuras 8 y 9).

Perricone *et al.* (2014) probaron la actividad antimicrobiana de varios aislados de *Candida humilis* y *S. cerevisiae* contra *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Escherichia coli* O157:H7, *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans* con el método de doble capa. No encontraron actividad antimicrobiana contra ninguno de los patógenos. Por otro lado, Roostita *et al.* (2011) reportaron actividad de *Candida parapsilosis* contra *Pseudomonas aeruginosa*, *S. aureus* y *E. coli*. La primera se considera como microorganismo de descomposición al ser transmitida por alimentos y es un patógeno oportunista. Bajaj *et al.* (2013) reportaron actividad antimicrobiana de *Pichia kudriavzevii* cepa RY55 contra *E. coli*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella* sp., *S. aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Pseudomonas alcaligenes*; se trata de una toxina *killer* de naturaleza proteica que además de inhibir otras levaduras también puede inhibir a las bacterias mencionadas. Los investigadores aislaron la proteína y la caracterizaron, encontrando que se trataba de una proteína de 39.8 KDa con actividad máxima a 30 °C y pH 5. García-Hernández *et al.* (2012) reportaron a *Pichia kudriavzevii* LV-8 capaz de aglutinar y adherirse a los patógenos *E. coli*, *S. Typhimurium*, *L. monocytogenes* y *E. faecalis*, lo cual puede inhibir su crecimiento en el intestino. Sin embargo estas características son propias de cada cepa, por lo tanto, no se pueden extrapolar los resultados a otras cepas de la misma especie. Finalmente, Tiago *et al.* (2009) reportaron inhibición *in vitro* de *C. difficile* por levaduras de los géneros *Metschnikowia*, *Geotrichum*, *Galactomyces*, *Issatchenkia*, *Kluyveromyces* y *Starmerella*, aisladas de diversos ambientes naturales.

Es importante mencionar que no se encontró actividad antimicrobiana de *S. boulardii*. Los reportes que existen sobre ella mencionan que puede inhibir el crecimiento de patógenos de dos formas principalmente, el primero es la producción de factores que neutralizan las toxinas bacterianas y el segundo es a través de la modulación de las vías de señalización que implican la respuesta pro inflamatoria. Se ha visto que Sb produce *in vivo* una proteasa extracelular de 54 kDa que es capaz de degradar las toxinas A y B producidas por *Clostridium difficile* (Castagliuolo *et al.*, 1999). También se ha visto que tanto *E. coli* O:157 como *S. enterica* Typhimurium DT104 se unen de manera irreversible a residuos de manosa en la superficie de Sb vía receptores de lectina (adhesinas). Esto previene que se unan al borde de cepillo de los enterocitos y permite que se eliminen con el movimiento intestinal (Gedek, 1999). Ninguno de estos mecanismos se puede medir con el método de difusión en agar, el cual fue utilizado en el presente estudio (Balouiri *et al.*, 2016).



**Figura 8.** Prueba de difusión en agar de las cepas Sb, 37 y 39 contra: ST: *Salmonella enterica* Typhimurium, Bc: *Bacillus cereus*, Sa: *Staphylococcus aureus*, Ca: *Candida albicans*, Ec: *E. coli*, Lm: *Listeria monocytogenes*. Control negativo (C-): agua destilada; Control positivo (C+): clorhexidina 0.2 % (m/v).



**Figura 9.** Prueba de difusión en agar de las cepas 8, 41 y 44 contra: ST: *Salmonella enterica* Typhimurium, Bc: *Bacillus cereus*, Sa: *Staphylococcus aureus*, Ca: *Candida albicans*, Ec: *E. coli*, Lm: *Listeria monocytogenes*. Control negativo (C-): agua destilada; Control positivo (C+): clorhexidina 0.2 % (m/v).

Fakruddin *et al.* (2017) realizaron diversos experimentos con *S. cerevisiae* IFST062013 y observaron de que el lisado celular tiene mayor actividad antimicrobiana que el sobrenadante, concluyendo que se trata de compuestos ligados a la membrana y no son compuestos extracelulares. La cepa estudiada tuvo mayor actividad antimicrobiana contra bacterias Gram (-) que contra Gram (+).

Se observó que en algunos casos las cepas de *Pichia kudriavzevii* crecen dentro y alrededor de los pozos, a pesar de haber centrifugado los cultivos 3 veces. Esto podría indicar que estas levaduras son capaces de competir con las bacterias de prueba que se usaron y posiblemente crecen con mayor velocidad que ellas, aunque es meramente una hipótesis. Generalmente las bacterias crecen más rápido que las levaduras, por ejemplo, el tiempo de duplicación de *E. coli* en medio LB a 37 °C es de hasta 20 min (Sezonov *et al.*, 2007), mientras que el de *S. cerevisiae* en YPD es ~90 min (Boekhout & Robert, 2003). Ambos son medios de cultivo ricos para bacterias y levaduras, respectivamente. El hecho de que en este caso las levaduras hayan sobrepasado el crecimiento de las bacterias implica que fueron capaces de competir por nutrientes, uno de los mecanismos por los cuales las levaduras pueden ejercer un efecto probiótico. No es una inhibición del crecimiento como tal, pero puede ser interesante estudiar este efecto posteriormente.

### **9.7 Formación de biopelícula**

Las biopelículas se definen como una comunidad de microorganismos que están unidos entre sí y sobre una superficie, embebidas en una matriz extracelular protectora (Hall-Stoodley *et al.*, 2004). El experimento realizado se basó en medir la capacidad de las células de adherirse a una superficie de poliestireno. Esta propiedad puede ser conveniente o indeseable, ya que, por una parte es un indicador de que los probióticos pueden adherirse a las células del intestino (característica deseable); y por otra, la mayoría de las enfermedades nosocomiales se dan porque las levaduras forman biopelículas en catéteres e implantes. La diferencia radica en que los probióticos se adhieren al intestino, pero no son capaces de traslocarse y una vez que se dejan de consumir son eliminados en los siguientes días. Por ejemplo: Sb adquiere una concentración determinada en ratas después de 3 días de ser administrada y se elimina de 2 a 5 días después de interrumpir su administración (Czerruca *et al.*, 2007). Las levaduras patógenas por otro lado, son capaces de invadir tejido e incluso causar enfermedades sistémicas. Para complementar los resultados se podrían hacer ensayos de adherencia a líneas celulares, ya que, si bien la formación de biopelícula es una propiedad deseada, también es un factor de virulencia, pues confiere mayor resistencia a sustancias anti fúngicas.

Para realizar la prueba, se seleccionó primero el control positivo. Se decidió trabajar con *Candida albicans* debido a que es una levadura ampliamente reportada en la

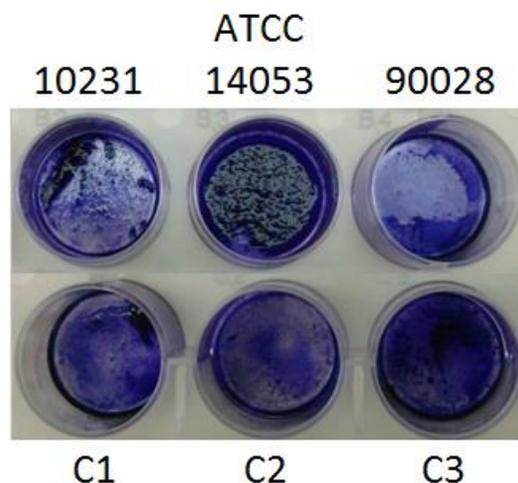
literatura como formadora de biopelícula (Chandra *et al.*, 2001; Desai J.V., & Mitchell A.P., 2015; Tsui *et al.*, 2016). Es causante de enfermedades nosocomiales y además es capaz de formar biopelícula en algunos implantes u objetos médicos que se introducen al cuerpo humano como catéteres, etc. (Tsui *et al.*, 2016). El cepario de la Facultad de Química proporcionó amablemente 6 cepas de *Candida albicans*, 3 de origen clínico de la colección del Cepario (C1, C2 y C3) y 3 del ATCC con las claves: 10231, 14053 y 90028. La cepa C1 fue donada por el Dr. Rubén López de la Facultad de Medicina y las cepas C2 y C3 fueron donadas por el Hospital General. La cepa ATCC 10231 fue aislada de un hombre con broncomicosis, las cepas 14053 y 90028 fueron aisladas de sangre humana. Se realizó un experimento utilizando las 6 cepas y se encontró que la que formaba mayor cantidad de biopelícula bajo las condiciones probadas fue la cepa de *C. albicans* ATCC 14053 pues forma una monocapa densa en el fondo de la placa (Figura 10); además de que al suspenderla en isopropanol fue la que obtuvo una mayor absorbancia en el espectrofotómetro (resultados no mostrados). Con base en estos resultados se seleccionó esta cepa como control positivo para los experimentos posteriores.

Una vez seleccionado el control, se hicieron las pruebas con los aislados. En la tabla 9 se puede observar que la cepa o aislado que mejor forma biopelícula fue Sb, seguida de 37 (*C. lusitaniae*) y 8 (*Pichia kudriavzevii*) (Tabla 9). Chi *et al.* (2015) reportan a *Pichia kudriavzevii* como formadora de biopelícula, característica que aumenta significativamente su tolerancia a los estreses térmico y oxidativo, además de aumentar su poder como agente de biocontrol sobre enfermedades post cosecha de peras. También incrementa la cantidad de enzimas antioxidantes que produce como catalasa y superóxido dismutasa. *Clavispora lusitaniae* no ha sido reportada como formadora de biopelícula. Sin embargo, *Candida lusitaniae*, la forma asexual de *Clavispora lusitaniae*, se ha reportado como formadora de biopelícula en placas de poliestireno (Pannanusorn *et al.*, 2012), silicón y resina de acrílico (Junqueira *et al.*, 2011). Perricone *et al.* (2014) reportaron algunas cepas de *S. cerevisiae* y de *Candida humilis* como formadoras de biopelícula sobre una superficie de acero. Evaluaron la formación de biopelícula durante un periodo de 8 días de incubación. Por otro lado, Silva-Díaz *et al.* (2015) reportaron a *Candida kruzei*, la forma asexual de *Pichia kudriavzevii*, como formadora de biopelícula. Los investigadores reportaron que esta levadura tiene actividad metabólica similar a *Candida albicans* y que incluso es capaz de formar más biomasa que *C. albicans*.

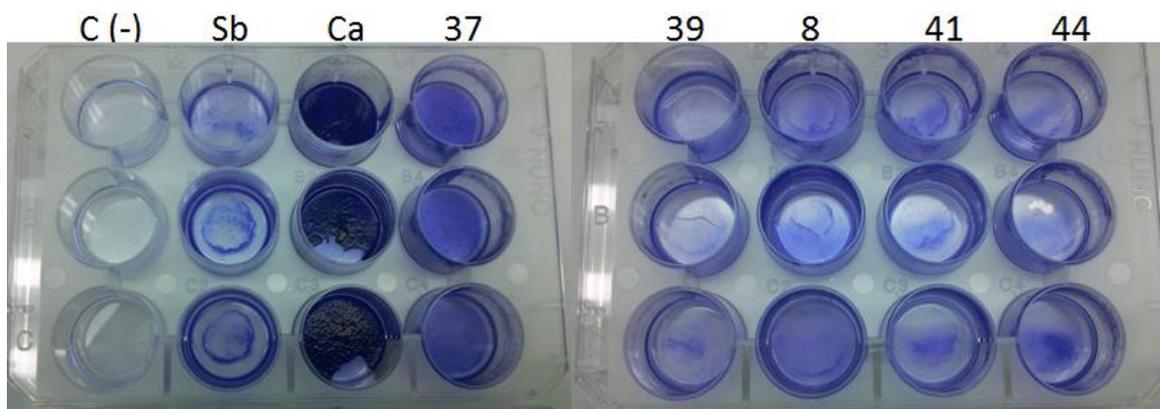
**Tabla 9.** Formación de biopelículas de 5 aislados, Sb y *C. albicans* ATCC 14053.

Aislado	% Biopelícula		
Ca	100.00 <sup>e</sup>	±	3.97
Sb	11.85 <sup>d</sup>	±	2.72
37	7.53 <sup>c</sup>	±	1.18
39	6.65 <sup>abc</sup>	±	2.84
8	6.38 <sup>bc</sup>	±	2.71
41	6.91 <sup>ab</sup>	±	1.23
44	5.62 <sup>a</sup>	±	1.79
Blanco	0.00	±	0.00

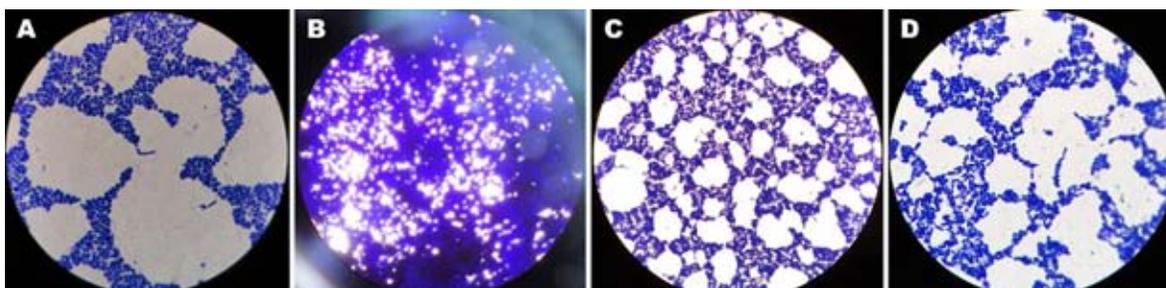
Cuantificación por el método de cristal violeta. Resultados expresados como media  $\pm$  desviación estándar. Resultados expresados como porcentaje respecto a los controles positivo (*C. albicans* ATCC 14053) y negativo (medio sin inóculo). Los superíndices indican los grupos homogéneos obtenidos mediante la prueba de Tukey ( $\alpha=0.05$ ).



**Figura 10.** Formación de biopelícula de 6 cepas de *C. albicans*. C1-C3: aislados clínicos de la colección del cepario de la Facultad de Química, UNAM. Cultivos en YPD incubados a 37 °C durante 48 h. Células teñidas con cristal violeta.



**Figura 11.** Formación de biopelícula. Columna 1: control negativo, 2: Sb, 3: *Candida albicans* ATCC 14053, 4: aislado 37; 5: aislado 39; 6: aislado 8; 7: aislado 41; 8: aislado 44. Cultivos en YPD incubados a 37 °C durante 48 h. Células teñidas con cristal violeta.



**Figura 12.** Observaciones microscópicas de biopelículas formadas por A: Sb; B: *C. albicans* ATCC 14053; C: *Pichia kudriavzevii*; D: *Clavispora lusitanae*. Aumento total 1000X.

Como se puede observar en la figura 12, las biopelículas formadas por *P. kudriavzevii* y *C. lusitaniae* tienen una estructura definida y no tienen hifas o pseudohifas, lo cual puede ser un buen indicio, ya que éste es otro factor de virulencia asociado con *C. albicans*. Las biopelículas de los controles tienen las mismas características, sin embargo en el caso de *C. albicans* ATCC 14053 el crecimiento es muy abundante y no permite distinguir bien la estructura ni la morfología de las células.

Con base en los resultados obtenidos se puede concluir que los aislados 37 y 39 (*Clavispora lusitaniae*) y 8, 41 y 44 (*Pichia kudriavzevii*) son capaces de formar biopelícula en superficies de poliestireno en menor proporción que *S. boulardii* y *C. albicans*. Ambos microorganismos ya habían sido reportados como formadores de biopelícula ya sea en su forma sexual, asexual o ambas.

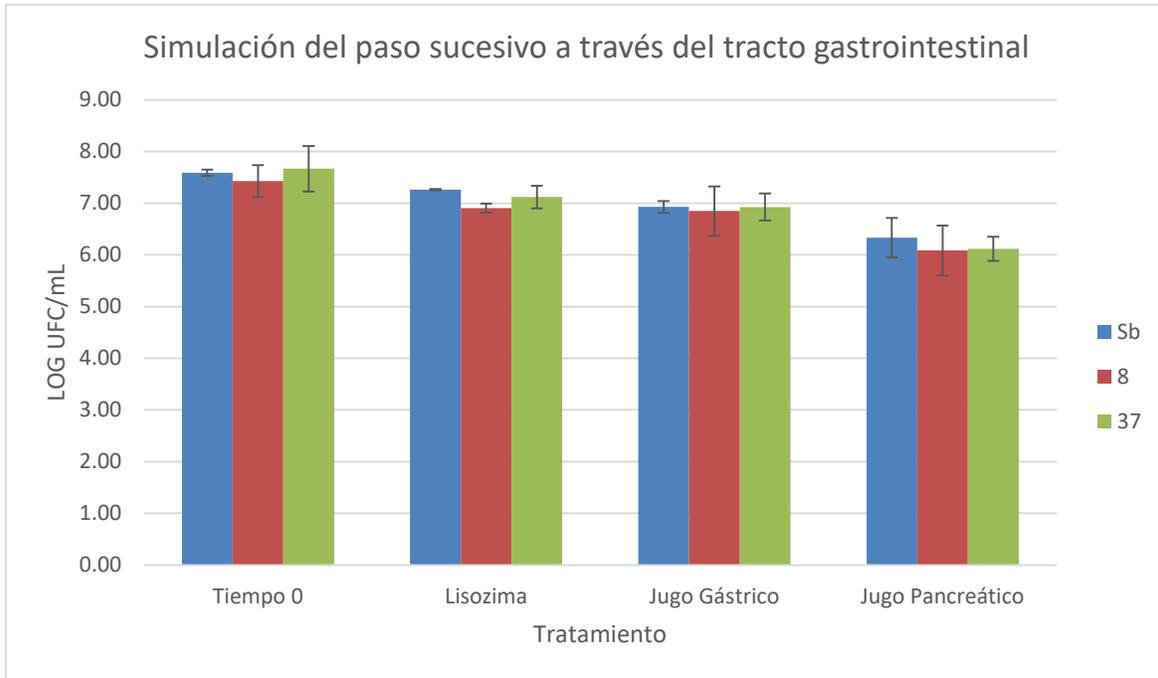
### **9.8 Simulación del paso sucesivo a través del tracto gastrointestinal**

El objetivo de esta prueba es simular las condiciones a las que se enfrenta un probiótico al ser ingerido. La primera barrera es la lisozima que se encuentra en la saliva de la boca. Posteriormente se enfrenta a las condiciones del estómago: pH ácido y pepsina. Una vez superada esa barrera pasa al duodeno, donde aumenta el pH y hay pancreatina (una mezcla de lipasas, amilasas y proteasas) y sales biliares. Los resultados de la prueba se muestran en la figura 13, donde se grafican las cuentas iniciales y después de cada tratamiento.

El tratamiento con lisozima disminuyó las cuentas de Sb en 0.33 ciclos logarítmicos, y las de 8 y 37 en 0.52 y 0.55 ciclos, respectivamente (Tabla 25, Anexo 13.4.8). Esta enzima hidroliza las uniones  $\beta$  1-4 entre los residuos de ácido N-acetilmurámico y N-acetil-D-glucosamina en un peptidoglicano, componente principal de la pared celular de las bacterias (sobre todo de las bacterias Gram positivas). Las levaduras por otro lado, no contienen este compuesto como parte de su pared. Ésta se forma principalmente de quitina, fosfopéptidomanano y fosfolipomanano. La diferencia en la composición de la pared celular puede explicar por qué las cuentas de las levaduras no disminuyeron drásticamente, además de que el tiempo de exposición fue muy corto, pues sólo se imitaron las condiciones del paso por la boca.

Posteriormente, el jugo gástrico artificial redujo las cuentas 0.34, 0.06 y 0.19 ciclos logarítmicos para Sb, 8 y 39, respectivamente en comparación con las cuentas del tratamiento con lisozima. La pepsina es una proteasa que se secreta en el estómago. Actúa principalmente sobre enlaces peptídicos de naturaleza hidrófoba, preferentemente aromáticos (Dunn, 2001). Esta enzima y el pH del estómago son la principal barrera del cuerpo humano para prevenir que los patógenos puedan llegar al intestino, además de que se encarga de degradar los macro componentes de los alimentos para que puedan ser absorbidos en el intestino. Las condiciones

probadas redujeron de manera similar que la lisozima las cuentas de las levaduras probadas. Previamente se observó que los aislados 8 y 37 son capaces de resistir el pH del estómago, por lo que la reducción de cuentas se atribuye a la pepsina, la cual probablemente degradó las proteínas de la pared celular.



**Figura 13.** Concentración de levaduras durante la simulación del tránsito gastrointestinal. Resultados promedio de tres experimentos independientes con dos réplicas cada uno (n = 6).

La mayor reducción en cuentas se observó en el tratamiento con jugo pancreático artificial. Este tratamiento incluyó pancreatina, una mezcla de amilasa, lipasa y proteasa que se producen en el páncreas y se secretan en el duodeno; y sales biliares, que son los ácidos biliares producidos en el hígado conjugados con taurina o glicina. Las enzimas mencionadas degradan almidón, lípidos y proteínas. Las sales biliares se componen principalmente de 3 ácidos: desoxicólico, glicocólico y tauricólico. Su función principal es permitir la digestión de grasas actuando como emulsificantes. Todos estos factores fueron capaces de lisar las células causando una disminución en las cuentas microbianas de 0.59, 0.76 y 0.81 ciclos logarítmicos para Sb, 8 y 39, respectivamente.

Los 3 tratamientos juntos disminuyeron las cuentas 1.26 ciclos logarítmicos para Sb, 1.34, para la cepa 8 y 1.55 para la cepa 37. Esto representa una pérdida de viabilidad de más del 90 %; sin embargo, considerando que los probióticos comerciales se administran en dosis de  $1 \times 10^9$  UFC/porción (Settani & Moschetti, 2010), esto implica que más de  $1 \times 10^7$  UFC o 10 millones de células por porción

llegarían viables al intestino. Cabe mencionar que no se encontró diferencia estadísticamente significativa ( $\alpha=0.05$ ) entre las cuentas de los dos aislados y Sb al final del experimento. A pesar de que el crecimiento en el intestino depende también de la microbiota presente y hasta de las células intestinales humanas, con el método usado fue posible determinar que los aislados seleccionados fueron capaces de resistir las condiciones con cuentas estadísticamente similares al control: Sb. Esto da pauta para seguir investigando el posible efecto probiótico que las levaduras seleccionadas puedan tener.

Durante el proceso de elaboración tradicional del atole agrio de dobla se lleva a cabo una cocción al final, la cual elimina casi todas las levaduras viables en la bebida (Esquivel 2012, Valderrama 2012). Para evitar esto, se podrían adicionar las levaduras después de la cocción o se podría elaborar una bebida en condiciones controladas para evitarla, pues se ha visto que durante la fermentación espontánea crecen coliformes y enterobacterias que también son eliminados durante este proceso (Esquivel 2016). Sin embargo, eliminar la cocción podría afectar la viscosidad del producto final, pues no ocurriría la gelatinización del almidón.

Además del efecto probiótico que pudieran ejercer las levaduras, también podrían ejercer un efecto benéfico para la salud de quien consume el atole agrio de dos maneras. La primera es a través de la producción de metabolitos como carotenoides, vitaminas, enzimas, aminoácidos, entre otros. La segunda es mediante el efecto prebiótico que pudieran tener los polisacáridos y oligosacáridos provenientes de la degradación de la pared celular durante la cocción, los cuales no son digeridos en la parte superior del tracto gastrointestinal y promueven el crecimiento de la microbiota intestinal benéfica (Hutkins *et al.*, 2016). A partir de los años 80's se comenzaron a utilizar las levaduras como suplemento alimenticio para ganado. Se pueden utilizar de diferentes maneras: Levaduras vivas liofilizadas; extracto de levadura, que es la porción soluble de cultivos auto lisados; o como cultivos líquidos (llamados *Yeast Culture* en inglés) que son una mezcla de células vivas y muertas (Roto *et al.*, 2015). Estas últimas pueden ser el caso del atole agrio, donde las levaduras se mueren durante la cocción, pero no son separadas del producto final. Roto y colaboradores (2015) hicieron una revisión sobre el efecto de levaduras y sus derivados sobre la microbiota intestinal de aves de corral. Encontraron que algunos de los componentes de la pared celular como oligosacáridos de manosa se unen a bacterias patógenas, previniendo que éstas se adhieran al intestino. Otro compuesto proveniente de la degradación de la pared celular son los  $\beta$ -glucanos, los cuales tienen un efecto inmuno modulador, activan fagocitos y células *killer*, activan la producción de linfocitos B y T y aumentan la producción de citoquinas (Hoffman *et al.*, 1993).

Perricone *et al.* (2014) encontraron 2 cepas de *S. cerevisiae* aisladas de masas ácidas capaces de resistir condiciones gastrointestinales simuladas en un experimento similar al que se realizó en este trabajo. Utilizaron las mismas enzimas, pero con pequeñas variaciones de tiempo. Estas cepas fueron capaces también de formar biopelícula. Li-Shui *et al.* (2010) reportaron 2 cepas de *Pichia kudriavzevii* (Pk BY10 y Pk BY15) aisladas de leche cruda resistentes a sales biliares y jugo gástrico, que además fueron mostraron adherencia a células HT-29 y fueron capaces de asimilar colesterol. Lohith & Appaiah (2014) reportaron que *P. kudriavzevii* P2 resiste condiciones simuladas de jugos gástrico y pancreático en comparación con Sb. Pedersen *et al.* (2012) aislaron *Candida krusei* (forma asexual de *P. kudriavzevii*) de Fura, una bebida fermentada de mijo hecha en África. La cepa f10h4 de esta especie fue capaz de crecer en presencia de sales biliares y a pH 2.5 en mayor proporción que Sb.

Greppi *et al.*, (2015) reportaron 5 cepas de *P. kudriavzevii* aisladas de diversos alimentos fermentados en África capaces de producir fitasa, una enzima que degrada el fitato, un agente quelante de cationes metálicos que reduce su biodisponibilidad. Esta característica les confiere propiedades probióticas a las levaduras pues ayudan a que los metales  $Fe^{3+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  y  $Mg^{2+}$  sean fácilmente absorbidos en el intestino. La nixtamalización del maíz también hace esta función; sin embargo, el atole de dobla se elabora a base de maíz tierno, por lo que la presencia de levaduras que produzcan fitasa aumentaría su aporte nutricional. Ogunremi *et al.*, 2015 reportaron también 2 cepas de *P. kudriavzevii* con actividad de fitasa, resistentes a condiciones del estómago y capaces de reducir colesterol. Éstas fueron aisladas de *burukutu*, *kunun-zaki* y *ogi*, tres alimentos fermentados africanos elaborados a base de cereal (maíz, sorgo o mijo). Se encontró que además tienen actividad de proteasa, lipasa y esterasa; fueron capaces de resistir una simulación del intestino utilizando pepsina y pancreatina; mostraron capacidad de autoagregación y coagregación con patógenos; adherencia a hidrocarburos, actividad antioxidante y reducción de colesterol. Tiago *et al.* (2009) estudiaron 103 levaduras no-*Saccharomyces* aisladas de diversos alimentos con pruebas *in vitro* (crecimiento a 37 °C, actividad antimicrobiana) e *in vivo* (colonización del tracto GI de ratones y pruebas de reto contra *C. difficile*). Encontraron que *P. kluyveri* cepa 898 tienen potencial probiótico al obtener resultados favorables en todas las pruebas.

Los alimentos fermentados son una buena fuente para buscar probióticos, pues la microbiota que participa es compleja y a muchos de éstos se les atribuyen beneficios a la salud de quien los consume. Los métodos *in vitro* son el primer paso para buscar probióticos, ya que se pueden hacer con un gran número de microorganismos y nos dan una idea si pueden ser benéficos para la salud, aunque

estos resultados no se pueden extrapolar a condiciones *in vivo*. Sólo Sb se ha estudiado en casos clínicos, donde se ha demostrado su efectividad en comparación con placebo en pacientes con distintos tipos de diarrea y enfermedades de colon irritable (Czerucka *et al.*, 2007; Lukaszewicz, 2012). No se han hecho pruebas clínicas con levaduras que no sean Sb. Sin embargo, se han hecho pruebas con ratones donde se observa que *Pichia kluyveri* puede colonizar el intestino sin causar daño patológico y es capaz de prevenir infecciones *in vivo* con *C. difficile* (Tiago *et al.*, 2009).

Todas estas evidencias indican que las levaduras aisladas de diversos alimentos fermentados tienen un gran potencial para ser utilizadas como probióticos. Los resultados de este trabajo permitieron seleccionar 2 aislados: *Pichia kudriavzevii* 8 y *Clavispora lusitaniae* 37 que fueron catalogadas como potencialmente probióticas.

## 10 Conclusiones

En el estudio microbiológico de 3 lotes de atole agrio producidos en los años de 2010, 2011 y 2012 se encontró la presencia de las 24 aislados de levadura correspondientes a las especies *Candida intermedia* (37.5 %), *Pichia kudriavzevii* (20.83 %), *Clavispora lusitaniae* (16.67 %), *Candida parapsilosis* (4.17 %), *Pseudozyma parantarctica* (4.17 %), *Ustilago esculenta* (4.17 %), *Ustilago longissima* (4.17 %) y *Moesziomyces bullatus* (4.17 %), siendo las primeras 3 los microorganismos dominantes en la bebida.

Las especies *Pichia kudriavzevii* y *Clavispora lusitaniae* crecieron en mayor proporción que *Saccharomyces boulardii* en medio líquido a 37 °C, a pH 2.5 y en presencia de sales biliares.

Los aislados 37 y 39 (*Clavispora lusitaniae*) y 8, 41 y 44 (*Pichia kudriavzevii*) fueron capaces de formar biopelícula, aunque en menor proporción que Sb. De los aislados estudiados 8 y 37 formaron estadísticamente ( $\alpha=0.05$ ) la mayor cantidad de biomasa, obteniéndose resultados de 6.38 % y 7.53 % con respecto a *Candida albicans*, respectivamente.

Ninguno de los aislados exhibió actividad antimicrobiana contra los patógenos: *E. coli* O157:H10 (EHEC), *Salmonella enterica* Typhimurium ATCC 14028, *Listeria monocytogenes* CFQ-103 (FQ), *S. aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* ATCC 11778 y *Candida albicans* ATCC 14053.

Los aislados 8 (*Pichia kudriavzevii*) y 37 (*Clavispora lusitaniae*) poseen propiedades que las catalogan como potencialmente probióticas *i.e.* crecimiento a 37 °C, resistencia a pH 2.5, 1.5 % de sales biliares, enzimas digestivas y formación de biopelícula. Sin embargo, no inhibieron el crecimiento de ninguno de los patógenos probados.

## 11 Perspectivas

Para continuar evaluando el potencial probiótico de los aislados seleccionados se propone hacer los siguientes experimentos:

- Identificar los aislados utilizando métodos moleculares con una resolución taxonómica a nivel de cepa.
- Realizar pruebas *in vitro* de autoagregación, coagregación con patógenos, asimilación de colesterol y ensayos de adherencia a líneas celulares (e.g. CACO-2).

Si se obtienen resultados positivos para las pruebas anteriores, proceder con pruebas *in vivo*:

- Verificar la seguridad de los aislados administrándolos a ratones y determinar que no suceda ninguno de los siguientes casos (en comparación con placebo): diarrea, invasión de tejido o translocación al torrente sanguíneo. Además, deben ser eliminadas una vez que se detiene su administración.
- Hacer pruebas de reto en ratones inoculados con microorganismos patógenos como *Clotridum difficile* o *E. coli*.

En caso de que los resultados de dichas pruebas sean favorables y que se haya demostrado que las cepas seleccionadas no posean ninguna característica que las pueda catalogar como patógenas, se podría proponer hacer pruebas clínicas con humanos.

## 12 Referencias

Aguirre, M., & Collins, M. D. (1993). Lactic acid bacteria and human clinical infection. *Journal of applied bacteriology*, 75, 95-107.

Allen, W. D., Linggood, M. A., & Porter, P. (1996). Probiotic. *US pat.* 589 (5), 168, 1-12.

Arce, G. (2007). *Levaduras aisladas del atole agrio de maíz elaborado en San Andrés Tzicuilan, Cuetzalán, Puebla, México*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM.

Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibsouda, S. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: a review. *Journal of pharmaceutical analysis*, 6 (2), 71-79.

Bajaj, B. K., Raina, S., & Singh, S. (2013). Killer toxin from a novel killer yeast *Pichia kudriavzevii* RY55 with idiosyncratic antibacterial activity. *Journal of basic microbiology*, 53, 645-656.

Barnett, J. A., Payne, R. W., & Yarrow, D. (2000). *Yeasts: Characteristics and identification*. 3a ed. University press, Cambridge.

Bevan, E. A., & M. Makower. (1963). The physiological basis of the killer character in yeast. *Proc. XIth Int. Congr. Genet*, 1, 202-203.

Bevan, E. A., & Somers, J.M. (1969). Somatic segregation of the killer (k) and neutral (n) cytoplasmic genetic determinants in yeast. *Genet. Res*, 14, 71-77.

Blandino, A., Al Aseeri, M. E., Pandiella, S. S., Cantero, D., & Webb, C. (2003). Cereal-based fermented foods and beverages. *Food research int*, 36, 527-543.

Boekhout, T.; Robert, V., eds. (2003). *Yeasts in Food: Beneficial and Detrimental aspects*. Behr's Verlag. p. 322.

Bourcier, T., Touzeau, O., Thomas, F., Chaumeil, C., Baudrimont, M., Borderie, V., & Laroche, L. (2003). *Candida parapsilosis* keratitis. *Cornea*, 22, 51–5.

Brion, C., Pflieger, D., Souali-Crespo, S., Friedrich, A., & Schacherer, J. (2016). Differences in environmental stress response among yeasts is consistent with species-specific lifestyles. *Molecular biology of the cell*, 27 (10), 1694-1705.

Bussey, H. (1991). K1 killer toxin, a pore-forming protein from yeast. *Molec biol*, 5 (10), 2339-2343.

Butel, M.J. (2014). Probiotics, gut microbiota and health. *Médecine et maladies infectieuses*, 1-8.

Buts, J.P., Bernasconi, P., Vaerman, J.P., & Dive, C. (1990). Stimulation of secretory IgA and secretory component of immunoglobulins in small intestine of rats treated with *Saccharomyces boulardii*. *Digestive diseases and sciences*, 35 (2), 251-256.

Calderone, R. A., & Fonzi, W. A. (2001). Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends microbiol*, 9 (7), 327-335.

Castañón, L. R. (2016, Enero). *Candidiasis o candidosis*. Tomado de: <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/micologia/candidosis.html>.

Castagliuolo, I., Riegler, M. F., Valenick, L., LaMont J.T., & Pothoulakis, C. (1999). *Saccharomyces boulardii* protease inhibits the effects of *Clostridium difficile* toxins A and B in human colonic mucosa. *Infect immun*, 67 (1), 302–7.

Castro, F. (2006). *Colapsos ambientales, transiciones culturales*. México, D.F.: UNAM Colección postgrado.

Chan, G. F., Gan, H. M., Ling, H. L., & Rashid, N. A. A. (2012). Genome sequence of *Pichia kudriavzevii* M12, a potential producer of bioethanol and phytase. *Eukaryotic cell*, 1300–1301.

Chandra, J., Kuhn, D., Mukherjee, P., Hoyer, L., McCormick, T., & Ghannoum, M. (2001). Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. *Journal of bacteriology*, 183 (18), 5383-5394.

Chavan, J. K., & Kadam, S. S. (1989). Critical reviews in food science and nutrition. *Food science*, 28, 348–400.

Chi, M., Li, G., Liu, Y., Liu, G., Li, M., Zhang, X., Sun, Z., Sui, Y., & Liu, J. (2015). Increase in antioxidant enzyme activity, stress tolerance and biocontrol efficacy of *Pichia kudriavzevii* with the transition from a yeast-like to biofilm morphology. *Biological control*, 90, 113-119.

Cocconceli, P.S. Coordinator. (2013). *Functional aspects of Latinamerican fermented foods*. Final report. Marie Curie Actions, project Microandes.

Czerruca, D., Piche, T., & Rampal, P. (2007). Review article: Yeast as probiotics – *Saccharomyces boulardii*. *Alimentary pharmacology and therapeutics*, 26, 767-778.

Dashkevich, M. P., & Feighner, S. D. (1989). Development of a differential medium for bile salt hydrolase-active *Lactobacillus* spp. *Appl Environ Microbiol*, 55, 11-16.

Desai J. V., & Mitchell A. P. (2015). *Candida albicans* biofilm development and its genetic control. *Microbiol spectr*, 3 (3).

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 J microbiol biotechnol*, 30, 43–53.

Donlan, R. M. (2002). Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerging infectious diseases*, 8 (9), 881-890.

Dunn, BM (2001). Overview of pepsin-like aspartic peptidases. *Current protocols in protein science*, 21 (23).

Esquivel, A. K. (2012). *Estudio de las enterobacterias presentes en el atole agrio de Villahermosa, Tabasco*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, UNAM.

Esquivel, A. K. (2016). *Presencia y sobrevivencia de bacterias patógenas en el atole agrio de Villahermosa, Tabasco*. Tesis de Maestría. Facultad de Química, UNAM.

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, 329-337.

Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. FAO. (1993). El Maíz en la nutrición humana en Colección FAO: *Alimentación y nutrición*, 25.

Fakruddin, Md., Nur Hossain, Md., & Ahmed, M.M. (2017). Antimicrobial and antioxidant activities of *Saccharomyces cerevisiae* IFST062013, a potential probiotic. *BMC Complementary and alternative medicine*, 17 (64), 1-11.

Fijan, S. (2014). Microorganisms with claimed probiotic properties: an overview of recent literature. *Int J environ res public health*, 11, 4745-4767.

Gadaga, T.H., Mutukumira, A.N., Narvhus, J.A., & Feresu, S.B. (1999). A review of traditional fermented foods and beverages from Zimbabwe. *International journal of food microbiology*, 53, 1-11.

García-Hernández, Y., Rodríguez, Z., Brandao, L. R., Rosa, C. A., Nicoli, J. R., Iglesias, A. E. Pérez-Sánchez, T., Salabarría, R. B., & Halaihel, N. (2012). Identification and in vitro screening of avian yeasts for use as probiotic. *Research in veterinary science*, 93, 798–802.

Gedek B. R. (1999). Adherence of *Escherichia coli* serogroup O 157 and the *Salmonella typhimurium* mutant DT 104 to the surface of *Saccharomyces boulardii*. *Mycoses*, 42 (4), 261-264.

Giles-Gómez, M., Sandoval-García, J. G., Matus, V., Campos-Quintana, I., Bolívar, F., & Escalante, A. (2016). In vitro and in vivo probiotic assessment of *Leuconostoc mesenteroides* P45 isolated from pulque, a Mexican traditional alcoholic beverage. *Springer plus*, 5:708.

Gillooly, M., Bothwell, T. H., Charlton, R. W., Torrance, J. D., Bezwoda, W. R., Macphail, A.P., Deman, D. P., Novelli, L., Morrau, D., & Mayet, F. (1984). Factors affecting the adsorption of iron from cereals. *British journal of nutrition*, 51, 37–46.

Greppi, A., Rantsiou, K., Padonou, W., Honhouigan, J., Jepsen, L., Jakobsen, M., & Cocolin, L. (2013). Determination of yeast diversity in ogi, mawè, gowé and tchoukoutou by using culture-dependent and -independent methods. *International journal of food microbiology*, 165, 84–88.

Greppi, A., Krych, L., Constantini, A., Rantsiou, K., Hounhouigan, D. J., Arneborg, N., Cocolin, L., & Jepsen, L. (2015). Phytase-producing capacity of yeasts isolated from traditional African fermented food products and PHYPk gene expression of *Pichia kudriavzevii* strains. *Int J of food microbiology*, 205, 81-89.

Guyot, J. P. (2012). Cereal-based fermented foods in developing countries: ancient foods and modern research. *Int J of food sci & tech*, 47, 1109-1114.

Haard, N. F., Odunfa, S. A., Lee, C.-H., Quintero-Ramírez, R., Lorence-Quinones, A., & Wachter-Rodarte, C. (1999). Fermented cereals. A global perspective. *FAO. Agricultural services bulletin*, 138.

Hall-Stoodley L., Costerton J. W., & Stoodley P. (2004). Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nature reviews microbiology*, 2 (2), 95-108.

Hammes, W. P., Brandt, M. J., Francis, K. L., Rosenheim, J., Seitter, M. F. H., & Vogelmann, S. A. (2005). Microbial ecology of cereal fermentations. *Trends in Food Science and Technology*, 16, 4-11.

Hayduck, F. (1909). Über einen Hefengiftstoff in Hefe. *Wochenschr. brau*, 26, 677-679.

Hatoum, R., Labrie, S., & Fliss, I. (2012). Antimicrobial and probiotic properties of yeasts: from fundamental to novel applications. *Frontiers in microbiology*, 421 (3), 1-12.

Herrera, T. & Ulloa, S. (1971). Study of *Candida kruzei* and *Trichosporon cutaneum* isolated from pozol. *Revista latinoamericana de microbiología*, 13 (4), 255-261.

Hoffman, O. A., Olson, E. J., & Limper, A. H. (1993). Fungal beta-glucans modulate macrophage release of tumor necrosis factor-alpha in response to bacterial lipopolysaccharide. *Immunol lett*, 37, 19-25.

Hurley, R., De Louvois, J., & Mulhall, A. (1987). Yeasts as human and animal pathogens. *The Yeasts* (Rose AH & Harrison JS, eds), 207–281. Academic Press, London.

Hutkins, R. W., Krumbeck, J. A., Bindels, L. B., Cani, P. D., Fahey, G. Jr., Goh, Y. J., Hamaker, B., Martens, E. C., Mills, D. A., Rastal, R. A., Vaughan, E., & Sanders, M. E. (2016). Prebiotics: why definitions matter. *Curr opin biotechnol*, 37, 1-7.

Jespersen, L., Halm, M., Kpodo, K., & Jacobson, M. (1994). Significance of yeasts and moulds occurring in maize dough fermentation for kenkey production. *International journal of food microbiology*, 24, 239-248.

Jespersen, L. (2003). Occurrence and taxonomic characteristics of strains of *Saccharomyces cerevisiae* predominant in African indigenous fermented foods and beverages. *FEMS Yeast research*, 3, 191-200.

Junqueira, J. C., Fuchs, B. B., Muhammed, M., Coleman, J. J., Suleiman, J. M., Vilela, S. F. G., Costa, A. C. B. P., Rasteiro, V. M. C., Jorge, A. O. C., & Mylonakis, E. (2011). Oral *Candida albicans* isolates from HIV-positive individuals have similar in vitro biofilm-forming ability and pathogenicity as invasive *Candida* isolates. *BMC Microbiology*, 11, 247.

Khetarpaul, N., & Chauhan, B. M. (1990). Effect of fermentation by pure cultures of yeasts and lactobacilli on the available carbohydrate content of pearl millet. *Tropical science*, 31, 131-139.

Koehler, A. P., Chu, K. C., Houang, E. T. S., & Cheng, A. F. B. (1999). Simple, reliable, and cost-effective yeast identification scheme for the clinical laboratory. *J clin microbiol*, 37 (2), 422-426.

Kosse, D., Seiler, H., Amann, R., Ludwig, W., & Sherer, S. (1997). Identification of yoghurt-spoiling yeasts with 18S rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Systematic and applied microbiology*, 20 (3), 468-480.

Kurtzman, C. P., & Fell, J. W. (2005). in: *The yeast handbook*, Gábor, P., de la Rosa, C. L., eds. Biodiversity and ecophysiology of yeasts. Berlin: Springer, 11-30.

Kurtzman C. P., & Fell J. W. (2006). Yeast systematics and phylogeny - implications of molecular identification methods for studies in ecology. Biodiversity and ecophysiology of yeasts, *The Yeast Handbook*. Springer.

Kurtzman C. P., & Fell J. W. (2011). *The yeasts: a taxonomic study*, 5a ed. Elsevier, Amsterdam.

Lappe, P., & Ulloa, M. (1989) *Estudios microbianos y químicos del tesgüino tarahumara*, publicación especial, Instituto de Biología, UNAM. P9.

Lappe, P., & Ulloa, M. (1993). Microbiología del pulque. En: Wachter, C., & Lappe, P (Eds), *Alimentos fermentados indígenas de México*. Universidad Nacional Autónoma de México, Programa Universitario de Alimentos, México, D.F., pp 75-79.

Li-Shui, C., Ying, M., Jean-Louis, M., Sheng-Hua, H., Li-Jun, C., & Hai-Mei, L. (2010). Screening for the potential probiotic yeast strains from raw milk to assimilate cholesterol. *Dairy science and technology*, 90 (5), 537-548.

Lohith, K., & Appaiah, K. A. (2014). In vitro probiotic characterization of yeasts of food and environmental origin. *International journal of probiotics and prebiotics*. 9 (3), 87-92.

Lukaszewicz, M. (2012). *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* - Probiotic Yeast. *Probiotics*, 16, 385-396.

Maciel, N., Piló, F., Freitas, L., Gomes, F., Johann, S., Nardi, R., Lachance, M. A., & Rosa, C. (2013). The diversity and antifungal susceptibility of the yeasts isolated from coconut water and reconstituted fruit juices in Brazil. *International journal of food microbiology*, 160, 201-205.

Madigan, M., & Martinko, J. (Eds). (2005). *Brock biology of microorganisms* (11th ed.). Prentice Hall.

Mager, W. H., & Ferreira, P. M. (1993). Stress response of yeast. *Biochem J*, 290 (1), 1-13.

Mangelsdorf, P. C. & Reeves, R. G. (1939). The origin of Indian corn and its relatives. *Bulletin No. 574 Texas agric. exp. stn. college station, Texas*, EUA.

Marieb, E. N. & Hoehn, K. (2010). *Human anatomy & physiology*. San Francisco: Benjamin Cummings.

Mattila-Sandholm, T., Myll, P., Crittenden, R., Mogensen, G., Fond, R., & Saarelaa, M. (2002). Technological challenges for future probiotic foods. *International dairy journal*, 12, 173-182.

Molin, S., & Tolker-Nielsen, T. (2003). Gene transfer occurs with enhanced efficiency in biofilms and induces enhanced stabilization of the biofilm structure. *Current opinion in biotechnology*, 14 (3), 255-261.

Moreno-Terrazas, C. R. D. (2005). *Determinación de las características microbiológicas, bioquímicas, fisicoquímicas y sensoriales para la estandarización del proceso de elaboración de tepache*. Tesis doctoral. Universidad Autónoma Metropolitana, México, D. F.

Nava-Guzmán, A., Lappe, P., Wachter, C., Vázquez, R., & Ruiz-Terán, F. (2000). Microbial and biochemical changes during the fermentation of a sour maize gruel prepared in Cuetzalan, Puebla, México. En: Van Dikjen, J. P. and Scheffers, W. A. (Eds), *Abstracts of the tenth international symposium on yeasts, ISY 2000, the rising power of yeasts in science and industry*. Delft University Press, Papenda, Arnhem, The Netherlands.

Navarro-García, F., Sánchez, M., Nombela, C., & Pla, J. (2001). Virulence genes in the pathogenic yeast *Candida albicans*. *FEMS Microbiology reviews*, 25, 245-268.

Nout, M. J. R., & Motarjemi, Y. (2007). Assessment of fermentation as a household technology for improving food safety: a joint FAO/WHO workshop. *Food control*, 8, 221-226.

Ogunremi, O. R., Sanni, A. I., & Agrawal, R. (2015). Probiotic potential of yeasts isolated from some cereal-based Nigerian traditional fermented food products. *Journal of applied microbiology*, 1-12.

Okagbue, R. N. (1995). Microbial biotechnology in Zimbabwe: current status and proposals for research and development. *Journal of applied science in southern africa*, 1, 148–158.

Palma, M. L., Zamith-Miranda, D., Martins, F. S., Bozza, F. A., Nimrichter, L., Montero-Lomeli, M., Marques, E. T. A., & Douradinha, B. (2015). Probiotic *Saccharomyces cerevisiae* strains as biotherapeutic tools: is there room for improvement? *Appl microbiol biotechnol*, 99, 6563–6570.

Pannanusorn, S., Fernandez, V., & Römling, U. (2012). Prevalence of biofilm formation in clinical isolates of *Candida* species causing bloodstream infection. *Mycoses*, 56, 264-272.

Papon, N., Courdavault, V., Clastre, M., & Bennet, R. J. (2013). Emerging and emerged pathogenic candida species: beyond the *Candida albicans* paradigm. *PLoS pathog*, 9 (9), 1-4.

Pasteur, L., & J. F. Joubert. (1877). Charbon et septicemie. *C. R. Soc. Biol. Paris*, 85, 101–115.

Pedersen, L. L., Owusu-Kwarteng, J., Thorsen, L., & Jepsen, L. (2012). Biodiversity and probiotic potential of yeasts isolated from Fura, a West African spontaneously fermented cereal. *International journal of food microbiology*, 159, 144-151.

Perricone, M., Bevilacqua, A., Corbo María Rosario, Sinigaglia M. (2014) Technological characterization and probiotic traits of yeasts isolated from Altamura sourdough to select promising microorganisms as functional starter cultures for cereal-based products. *Food microbiology*, 26-35.

Posteraro, B., Sanguinetti, M., Romano, L., Torelli, R., Novarese, L., & Fadda, G. (2005). Molecular tools for differentiating probiotic and clinical strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Int. J. of Food microbiology*, 103 (3), 295-304.

Puupponen-Pimiä, R., Aura, A. M., & Mattila-Sandholm, T. (2012). Development of functional ingredients for gut health. *Trends in food science and technology*, 13, 3-11.

Pfeiler E., & Klaenhammer T. (2007). The genomics of lactic acid bacteria. *Trends in microbiology*, 15, 546-553.

Prado, F. C., Parada, J. L., Pandey, A., & Socol, C. (2008). Trends in non-dairy probiotic beverages. *Food research international*, 41, 111-123.

Ranadheera, R. D. C. S., Baines, S. K., & Adams, M. C. (2010). Importance of food in probiotic efficacy. *Food research international*, 43, 1-7.

Reddy, N. R., & Pierson, M. D. (1994). Reduction in antinutritional and toxic components in plant foods by fermentation. *Food research international*, 27, 281-290.

Rijkers, G. T., De Vos, W. M., Brummer, R. J., Morelli, L., Corthier, G., & Marteau, P. (2011). Health benefits and health claims of probiotics: bridging science and marketing. *British journal of nutrition*, 106 (9), 1291-1296.

Roostita, L. B., Fleet, G. H., Wendry, S. P., Apon, Z. M., & Gemilang, L. U. (2011). Determination of yeasts antimicrobial activity in milk and meat products. *Advance journal of food science and technology*, 3 (6), 442-445.

Roto, S. M., Rubinelli, P. M., & Ricke, S. C. (2015). An introduction to the avian gut microbiota and the effects of the yeast-based prebiotic-type compounds as potential feed additives. *Frontiers in veterinary science*, 2 (28), 1-18.

Sahota, P., Pandove, G., & Dhillon, T. S. (2009). Growth kinetics of yeast for production of low alcoholic self-carbonated beverage from carrot: amla juice. *Scientia acta xaveriana*, 1 (1), 17-33.

Salminen S., Bouley C., Boutron-Ruault M. C., Cummings J. H., Franck A., Gibson G. R., Isolauri E., Moreau M. C., Roberfroid M., & Rowland, I. (1998). Functional food science and gastrointestinal physiology and function. *Br J Nutr*. 1998, 80 (Suppl. 1), S147-S171.

Santiago-Urbina, J., Arias-García, J. A., & Ruiz-Terán, F. (2015). Yeast species associated with spontaneous fermentation of Taberna, a traditional palm wine from southeast of Mexico. *Ann microbiol*, 65, 287-296.

Sazonov, G., Joseleau, D., & D'Ari, R. (2007). Escherichia coli Physiology in Luria-Bertani Broth. *Journal of bacteriology*, 189 (23), 8746-8749.

Sheng-Yuan, R., Jung-Yien, C., Yi-Chung, H., & Po-Ren, H. (2010). Catheter-related fungemia caused by *Candida intermedia*. *International journal of infectious diseases*, 14 (2), 147-149.

Settanni, L., & Moschetti, G. (2010). Non-starter lactic acid bacteria used to improve cheese quality and provide health benefits. *Food microbiology*, 27, 691-697.

Solieri, L., Bianchi, A., Mottolose, G., Lemmetti, F., & Giudici, P. (2014). Tailoring the probiotic potential of non-starter Lactobacillus strains from ripened Parmigiano Reggiano cheese by in vitro screening and principal component analysis. *Food microbiology*, 38, 240-249.

Sougioultzis, S., Simeonidis, S., Bhaskar, K. R., Chen, X., Anton, P. M., & Keates, S. (2006). *Saccharomyces boulardii* produces a soluble anti-inflammatory factor that inhibits NF- $\kappa$ B-mediated IL-8 gene expression. *Biochemical and biophysical research communications*, 343 (1), 69-76.

Steinkraus, K. H. (1998). Bio-enrichment: production of vitamins in fermented foods. In J. B. Wood (Ed.), *Microbiology of fermented foods* (pp. 603–619). London: Blackie Academic and Professional.

Stewart, R. B., & Getachew, A. (1962). Investigations on the nature of Injera. *Economic botany*, 16, 127.

Tiago, F. C. P., Martins, F. S., Rosa, C. A., Nardi, R. M. D., Cara, D. C., & Nicoli, J. R. (2009). Physiological characterization of non-Saccharomyces yeasts from agro-industrial and environmental origins with possible probiotic function. *World J microbiol biotechnol*, 25, 657-666.

Tsui C., Kong E. F., & Jabra-Rizk M. A. (2016). Pathogenesis of *Candida albicans* biofilm. *Pathog dis*, 74 (4).

Ulloa, M., Herrera, T., & Lappe, P. (1987). *Fermentaciones tradicionales indígenas de México*. Serie de investigaciones sociales. Instituto nacional indigenista, 16, 13:20.

Valderrama-Rouy, P., & Ramírez-Suárez, C. (1993). Alimentos de maíz y fermentados en Cuetzalan, Puebla. En: Wachter, C., & Lappe, P (Eds), *Alimentos fermentados indígenas de México*. Universidad Nacional Autónoma de México, Programa Universitario de Alimentos, México D. F., pp. 63-67.

Van de Zande, L., & Bijlsma, R. (1995). Limitations of the RAPD technique in phylogeny reconstruction in *Drosophila*. *J. Evol. Biol*, 8, 645-656.

Vieira-Dalode, G., Jespersen, L., Hounhouigan, J., Moller, P. L., Nago, C. M. & Jakobsen, M. (2007). Lactic acid bacteria and yeasts associated with gowé´ production from sorghum in Benin. *Journal of applied microbiology*, 103, 342-349.

Vijendra, M., & Prasad D. M. (2005). Application of in vitro methods for selection of *Lactobacillus casei* strains as potential probiotics. *Journal of food microbiology*, 103, 110-112.

Wachter, C., Cañas, A., Cook, P. E., Bárzana, E., & Owens, J. D. (1993). Sources of microorganisms in pozol, a traditional Mexican fermented maize dough. *World journal of microbiology and biotechnology*, 9, 226-274.

Wachter, C., Cañas, A., Bárzana, E., Lappe, P., Ulloa, M., Owens, D. (2000). Microbiology of indian and mestizo pozol fermentations. *Food microbiology*, 17, 251-256.

Walker, K., Skelton, H., & Smith, K. (2002). Cutaneous lesions showing giant yeast forms of *Blastomyces dermatitidis*. *Journal of cutaneous pathology*, 29 (10), 616-618.

Watson, S. A. (1987). Structure and composition. En Watson, S.A., & Ramstad, P.E. Eds. *Corn: chemistry and technology*, 53-82. St Paul, EUA. Am. Assoc. Cereal Chem.

White T. J., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J. (1990). PCR protocols. A guide to methods and applications. En *Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics*, 315-322. Eds. M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky & T. J. White. San Diego: Academic Press.

Zubaidy, Z., & Khidhr, K. (2014). Isolation and identification of *Saccharomyces cerevisiae* var *boulardii* and its uses as a probiotic (in vitro). *Raf J sci*, 25, 1-11.

## 13 Anexos

### 13.1 Claves originales de las cepas

**Tabla 10.** Claves originales de los aislados utilizados en este estudio. Muestreo: a: Valderrama, 2012. B: Esquivel, 2012. Pureza (+ positivo, - negativo).

Clave original	Código	Muestreo	Fermentación (h)	Pureza
IS2H1	1	2010 <sup>a</sup>	2	+
IS4H3	2	2010	4	-
IS6H3	3	2010	6	-
IS10H2	4	2010	10	+
IS10H3	5	2010	10	-
IS12H1	6	2010	12	+
IS24H1	7	2010	24	+
IS24H2	8	2010	24	+
IIS0H2	9	2010	0	+
IIS6H2	10	2010	6	+
IIS8H2	11	2010	8	-
IIS10H2	12	2010	10	+
IIS12H3	13	2010	12	-
IIS24H1	14	2010	24	-
IIS24H2	15	2010	24	+
IL4H1	16	2010	4	+
IL6H1	17	2010	6	+
IIL3H3	18	2010	3	+
IIL5H1	19	2010	5	+
IIL5H3	20	2010	5	+
IIL6H3	21	2010	6	-
S0H3	22	2011 <sup>b</sup>	0	+
S0H4	23	2011	0	-
S6H1	24	2011	6	+
S6H2	25	2011	6	-
S8H2	26	2011	8	+
S10H1	27	2011	10	-
S10H5	28	2011	10	+
L0H2	29	2011	0	+
L1H3	30	2011	1	+
L2H3	31	2011	2	+
L3H3	32	2011	3	+
L4H2	33	2011	4	+
L4H3	34	2011	4	-
L6H2	35	2011	6	+

<b>Clave original</b>	<b>Código</b>	<b>Muestreo</b>	<b>Fermentación (h)</b>	<b>Pureza</b>
L12H2	36	2011	12	+
ACPt24L10-5C	37	Mayo 2012	24	-
ACPt24L10-5C*	38	2012	24	-
ACPt24L10-5E	39	2012	24	+
ACPt24L10-5E*	40	2012	24	-
t24Smicelio11sep12 (2)	41	Sep 2012	24	+
t24S10-511sep12(6)	42	2012	24	+
t24Smicelio11sep12 (7)	43	2012	24	+
t24S10-511sep12(11)	44	2012	24	+

## 13.2 Medios de cultivo

- BHI sobrecapa: BHI 15 % (m/v) (Oxoid CM1136), fosfato monobásico de sodio 0.4 % (m/v) (JT Baker 3818), fosfato dibásico de sodio 1.0 % (m/v) (JT Baker 4062), Agar 0.7 % (m/v) (Bacto™ Agar 214010). Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 min.
- BHI tamponado: BHI 3.7 % (m/v) (Oxoid CM1136), fosfato monobásico de sodio 0.43 % (m/v) (JT Baker 3818), fosfato dibásico de sodio 1.0 % (m/v) (JT Baker 4062). Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 min.
- Extracto de Malta: Extracto de malta (Bioxon 180) 5 % (m/v), Agar 1.5 % (m/v) (Bacto™ Agar 214010). Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 min.
- GELPA: Dextrosa 2 % (m/v) (Difco™ 215530), Extracto de levadura 0.5 % (m/v) (Difco™ 212750), Peptona 1 % (m/v) (Difco™ 211677), Agar 1.5 % (m/v) (Bacto™ Agar 214010). Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 min.
- KTP: Extracto de levadura 1 % (m/v) (Difco™ 212750), Peptona 2 % (m/v), (Difco™ 211677) Dextrosa 2 % (m/v) (Difco™ 215530). Disolver los componentes en 95 mL de Buffer de fosfato citrato pH 5 y agregar 5 mL de glicerol. Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 min.
- WL nutrient medium (Difco™ 242420). Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 min.
- YM: YM Broth (Difco™ 271120), Agar 1.5 % (m/v) (Bacto™ Agar 214010). Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 min.
- YNB 1 X: Se prepararon viales con 4.5 mL de a) agua destilada estéril, b) sales biliares (Oxoid LP 0055) 0.55 % (m/v) y c) sales biliares 1.65 % (m/v) (Oxoid LP 0055), se esterilizaron en autoclave a 121 °C por 15 min y se les agregó la solución de YNB 10X en condiciones asépticas.
- YNB 10X: (Difco™ 239210), Dextrosa 5 % (m/v) (Difco™ 215530). Esterilizar por filtración con membrana de 0.22 µm.
- YPD acidificado: YPD adicionado de HCl 1 M. pH final 2.50 ± 0.05. Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 min.
- YPD sobrecapa: Extracto de levadura 1 % (m/v), Peptona (Difco™ 211677) 2 % (m/v), Dextrosa 2 % (m/v) (Difco™ 215530), Agar 0.7 % (m/v) (Bacto™ Agar 214010). Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 min.
- YPD: Extracto de levadura 1 % (m/v) (Difco™ 212750), Peptona 2 % (m/v) (Difco™ 211677), Dextrosa 2 % (m/v) (Difco™ 215530). Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 min.

### 13.3 Reactivos

- Buffer de fosfatos 0.1 M pH 8: Para preparar esta solución se tienen que preparar primero 2 soluciones: A,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.2 M (JT Baker 4062); B,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0.2 M (JT Baker 3818). Para preparar 200 mL mezclar 94.7 mL de la solución A y 5.3 mL de la solución B y aforar con agua destilada.
- Buffer de fosfato-citrato 50 mM pH 5: Para preparar esta solución se tienen que preparar primero 2 soluciones: A, ácido cítrico 0.1 M (JT Baker 0110); B, fosfato de sodio dibásico 0.2 M (JT Baker 4062). Para preparar 100 mL mezclar 24.3 mL de la solución A y 25.7 mL de la solución B y aforar con agua destilada.
- Buffer de ruptura para extracción de ADN: 2 % (m/v) Tritón X-100 (Sigma Aldrich X100), SDS 1 % (m/v) (Sigma Aldrich L3771), 100 mM NaCl (JT Baker 3628), 10 mM Trizma<sup>(R)</sup> base (Sigma Aldrich T1503), EDTA (JT Baker 8993) pH 8.
- Buffer TE: 10 mM Trizma<sup>(R)</sup> base (Sigma Aldrich T1503), 1 mM EDTA (JT Baker 8993).
- Clorohexidina (Sigma Aldrich C-9394) 0.2 % (m/v).
- Enzimas de restricción: *Hae III* Invitrogen (15205-016), *Hinf I* Invitrogen (15223-019), *Hha I* Invitrogen (25212010).
- Glicerol (JT Baker 2136-01) 15 % (m/v).
- Jugo gástrico: Pepsina (Sigma P6887).
- Jugo pancreático Pancreatina (Sigma P7545).
- PBS: NaCl 0.8 % (m/v) (JT Baker 7647), KCl 0.02 % (m/v) (JT Baker 7447),  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.144 % (m/v) (JT Baker 7782),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.024 % (m/v) (JT Baker 7778), pH 7.4.
- PCI: Phenol:Chloroform:Isoamyl Alcohol (25:24:1) (Sigma Aldrich P3803).
- RNAsa: RNAsa A (Sigma Aldrich R-4875)
- Sales biliares: Oxoid (LP0055).
- TBE 1X: Trizma<sup>(R)</sup> base (Sigma Aldrich T1503 0.1 M, Ácido bórico, 0.1 M, EDTA 2 mM (JT Baker 8993), pH 8.

## 13.4 Información complementaria

### 13.4.1 Observaciones levaduras

**Tabla 11.** Observaciones de las levaduras puras en medio YPD líquido y sólido, y observaciones microscópicas. Crecimiento: inferior (I) o superior (S). Producción de gas: - negativo, + positivo (intensidad). Tamaño: Colonias chicas (CH), medianas (M) o grandes (G). Textura: Butirosa (B), cremosa (CR) o membranosa (M). Color: Blanco (B), cremoso (CR) o blanco grisáceo (B/G). Borde: Entero (E), Rizoide (RZ). Elevación: Morfología: clasificación arbitraria (A-G).

Clave	Líquido		Sólido						Microscópicas
	Crecimiento	Gas	Tamaño	Textura	Color	Borde	Elevación	Morfología	Forma
1	I	-	M	CR	CR	E	C	A	Redonda
4	I	+++	M	CR	CR	E	C	A	Redonda
6	I	+++	M	CR	CR	E	C	A	Redonda
7	I/S	+++	M	CR	CR	E	C	A	Redonda
8	I	+++	M	B	B/G	E	C	C	Alargada
9	I	+	CH	B	B	E	C	B	Redonda
10	I	+++	M	CR	CR	E	C	A	Redonda
12	I/S	+++	M	CR	CR	E	C	A	Redonda
15	I	+++	M	CR	CR	E	C	A	Redonda
18	I	+++	CH	B	B	E	C	A	Redonda
20	I/S	+++	CH	B	B	E	C	A	Redonda
24	-	-	G	B	B	E	P	D	Alargada
25	-	-	M	B	A	E	C	D	Alargada
28	-	-	-	M	B	RZ	P	E	-
32	-	-	CH	M	CR	E	PU	F	Alargada
36	-	-	CH	B	R	E	P	G	Alargada
37	I	++	CH	B	B	E	C	B	Redonda
38	I	+	CH	B	B	E	C	B	Redonda
39	I	+	CH	B	B	E	C	B	Redonda
40	I	+	CH	B	B	E	C	B	Redonda
41	I/S	++	M	B	B/G	E	C	C	Alargada
42	I/S	+++	M	B	B/G	E	C	C	Alargada
43	I/S	+++	M	B	B/G	E	C	C	Alargada
44	I/S	+++	M	B	B/G	E	C	C	Alargada

### 13.4.2 Secuencias de ADN

>Aislado Sb: *Saccharomyces cerevisiae*

TAGTACGGCGAGTGAGCGGCAAAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGTACCTTCGGTGCCCGAGTTG  
TAATTTGGAGAGGGCAACTTTGGGGCCGTTCCCTTGTCTATGTTCCCTTGAACAGGACGTCATA  
GAGGGTGAGAATCCCGTGTGGCGAGGAGTGCGGTCTTTGTAAAGTGCCTTCGAAGAGTCGA  
GTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAG  
ACCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAAGAACTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAG  
TACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGCATTGATCAGACATGGTGTGTTTGTGCCCTCTGCTCCT  
TGTGGGTAGGGGAATCTCGCATTTCAGTGGGCCAGCATCAGTTTTGGTGGCAGGATAAATCCA  
TAGGAATGTAGCTTGCCCTCGGTAAGTATTATAGCCTGTGGGAATACTGCCAGCTGGGACTGAG  
GACTGCGACGTAAGTCAAGGATGCTGGCATAATGGTTATATGCCGCCCGTCTTGAACAC

>Aislado 7: *Candida intermedia*

GCCTCGTACGGCGAGTGAGCGGCAAAAAGCTCAAATTTGAAATCCTTCGGGAGTTGTAATTTGT  
AGGTTGGGAGACCCCGCGGCTAGTGGCACCAAGTCCCTTGAACAGGGCGCCTTAGAGGGT  
GAGAGCCCCGTAGGTACCACAATACCGTCTTGTGTCTCCTCTCAAAGAGTCGAGTTGTTTGG  
GAATGCAGCTCAAAGTGGGTGGTAAATTCCATCTAAAGCTAAATACCGGCGAGAGACCGATAG  
CGAACAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAAGCACTTTGAAAAGAGAGTGAAACAGTACGTGAA  
ATTGTTGAAAGGGAAGGGCTTGCAAGCAGACACGGCCTTCGTGCCGGGCCAGCATCGTTTGC  
TAGGGGTGGATAAGGAACAAGGAATGTAGCTCCTCGGAGTATTATAGCCTTGCGCGATACACC  
CACTGGCGACCGAGGCCTGCGGTATTCTACCTAGGATGCTGGCGTAATGGTTGCAAGCCGC  
CCGTCTTGAANCACGGACCA

>Aislado 9: *Clavispora lusitaniae*

AGCGGCGAGTGAAGCGGCAAAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGCACTTTCAGTGTCCGAGTTGTA  
ATTTGAAGAAGGTATCTTTGGGTCTGGCTCTTGTCTATGTTTCTTGAACAGAACGTCACAGAG  
GGTGAGAATCCCGTGGGATGAGATGACCCAGACCTATGTAAGTTCCTTCGAAGAGTCGAGTT  
GTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGAC  
CGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAAGAACTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAGTA  
CGTGAATTTGTTGAAAGGGAAGGGCTTGAGATCAGACTTGGTATTTTGTATGTTACTCTTTCCG  
GGGTGGCCTCTACAGTTTACCGGGCCAGCATCAGTTTGGGCGGTAGGAGAATTGCAAAGAAA  
TGTGGCACTGCCTCGGTAGTGTGTTATAGTCTTTGTCGATACTGCCAGCCTAGACTGAGGACT  
GCGGCTTCGGCCTAGGATGTTGGCATAATGATCTTAANTCGCCCGTCTTGAACACGG

>Aislado 24: *Ustilago esculenta*

NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNTAGTACGGCGAGTGAAGAGGGAAGAGCCCAAGATTGAAAG  
CTGGCGTCTTCGGCGTCCGCATTGTAATCTCAAGAAGTGTGTTTCCGCTTCGGACCATGCCTAA  
GTCCCTTGAAAAAGGGCATCATAGAGGGTGATAATCCCGTACATGGCATGGAGCGCCCGAAG  
CTTTGTGATACGCTTTCTAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCAAATGGGTGGTAAATG  
CCATCTAAGGCTAAATATTGGGGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGATGAA  
AAGAACTTTGAAAAGAGAGTTAAACAGTACGTGAAATTGCCAAAAGGGAAGGGTAGGAGGTCA  
GAGATGCGGCCTGGGATTGAGCCTTGCTTTTGTGTTGGTGTGTTTTCCAGATTGCAGGCCAACG  
TCGGTTTTGGGCACTGGAGAAGGGTAGGAGGAACGTGGCACCTCTCGGGGTGTGTTATAGCC  
TCCTACTGGATACAGCGACCGAGACCGAGGACAGCAGCGTACTCGCAAGAGCGGGCCTTCGG  
GCACCTTTACGCTTANGGCGTTGGCATAATGGCCCTCTACCACCCGTCTTGAACACGGNNN

>Aislado 28: *Ustilago longissima*

NNNNNNNNNNNGNNNNNNNNNANNTACGGCGAGTGAAGAGGGAAGAGCCCAAGATTGAAAGC  
TGCGCTCTTCGGCGTCCGCATTGTAATCTCAAGAAGTGTTTTCCGCTTCGGACCATGCCTAAG  
TCCCTTGAAAAGGGCATCATAGAGGGTGATAATCCCGTACATGGCATGGAGCGCCCGAAGC  
TTTGTGATACGCTTTCTAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCAAATGGGTGGTAAATGC  
CATCTAAGGCTAAATATTGGGGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAA  
AGAAGTTTGAAAAGAGAGTTAAACAGTACGTGAAATTGCCAAAAGGGAAGGGTAGGAGGTCAG  
AGATGCGGCCTGGGATTCAGCCTTGCTTTTGCTTGGTGTTTTCCAGATTGCAGGCCAACGT  
CGTTTTTGGGCACTGGAGAAGGGTGAAGGAATGTGGCACCCCTCGGGGTGTGTTATAGCCT  
TCTACTGGATACAGCGACCGGGACCGAGGACAGCAGCGTACTCGCAAGAGCGGGCCTTCGG  
GCACCTTTACGCTTAGGGCGTTGGCATAATGGCCCTCTANCNCCCGTCTTGNAACACNACC  
ANN

>Aislado 32: *Moesziomyces bullatus*

NNNNNNNNNNNNNNNNNAGTACGGCGAGTGAGAGGGAAGAGCCCAAGATTGAAAGCTGGCGT  
CTTCGGCGTCCGCATTGTAATCTCAAGAAGTGTTTTCCGCTTCGGACCAAGCCTAAGTCCCTT  
GGAAAAGGGCATCATAGAGGGTGATAATCCCGTACATGGCTTGGAGCGCCCGAGGCTTTGTG  
ATACGCTTTCTAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCAAATGGGTGGTAAATGCCATCTA  
AGGCTAAATATTGGGGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAAGAAGT  
TTGAAAAGAGAGTTAAACAGTACGTGAAATTGCCAAAAGGGAAGGGTAGGAGGTCAGAGATGC  
GGCCTGGGATTCAGCCTTGCTTTTGCTTGGTGTTTTCCAGATTGCAGGCCAACGTGGTTTTT  
GGGCACTGGAGAAGGGTAGGAGGAACGTGGCACCCCTCGGGGTGTGTTATAGCCTCCTACTG  
GATACAGCGACCGAGACCGAGGACAGCAGCGTACTCGCAAGAGCGGACCCTCGGGTACCTTT  
ACGCTTAGGGCGTTGGCATAATGGCCCTCTACCACCCGTCTTGAANNACGGACCA

>Aislado 36: *Pseudozyma parantartica*

NNNNNNNNNNNNNTNCNNAGTACGGCGAGTGAGAGGGAAGAGCCCAAGATTGAAAGCTGGCG  
TCTTCGGCGTCCGCATTGTAATCTCAAGAAGTGTTTTCCGCTTCGGACCATGCCTAAGTCCCTT  
GGAAAAGGGCATCATAGAGGGTGATAATCCCGTACATGGCATGGAGCGCCCGAAGCTTTGTG  
ATACGCTTTCTAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCAAATGGGTGGTAAATGCCATCTA  
AGGCTAAATATTGGGGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAAGAAGT  
TTGAAAAGAGAGTTAAACAGTACGTGAAATTGCCAAAAGGGAAGGGTAGGAGGTCAGAGATGC  
GGCCTGGGATTCAGCCTTGCTTTTGCTTGGTGTTTTCCAGATTGCAGGCCAACGTGGTTTTT  
GGGCACTGGAGAAGGGTAGGAGGAACGTGGCACCTCTCGGGGTGTGTTATAGCCTCCTACTG  
GATACAGCGACCGAGACCGAGGACAGCAGCGTACTCGCAAGAGCGGGCCTTCGGGCACCTTT  
ACGCTTAGGGCGTTGGCATAATGGCCCTCTACCACCCGTCTTGAACACGGACCA

>Aislado 37: *Clavispora lusitaniae*

NNNNNNNNNNNNNNNNNNTACGGCGAGTGAAGCGGCAAAGCTCAAATTTGAAATCCTGCG  
GGAATTGTAATTTGAAGTTTTCGTGGTCTGAGTCGGCCGCGCCCAAGTCCATTGGAACATGGC  
GCCTGGGAGGGTGAGAGCCCCGTATGGCGCACGCCGACTCTTTGCACCGCGGCTCCGACGA  
GTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCATCTAAAGCTAAATATTGGC  
GAGAGACCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAAGCACTTTGAAAAGAGAGTGA  
AACAGCACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGCTTGCAAGCAGACACGGTTTTACCGGGCCAG  
CGTCAAAAAGGGGGGGGGGAAAAGAAGGAAGAATGTGGCGCGTGCCTTCGGGTTCCGCGTG  
TTATAGCTTTCTCTAATACCCCATGTTTGTGAGGCCTGCGATTCTAGGACGCTGGCGTAAT  
GTTTGAAGCCGCCCGTCTTGAACACGGACCAANA

>Aislado 44: *Pichia kudriavzevii*

NNNNANNNNNNNNNNGCCTCNGTAGCGGCGAGTGAAGCGGCAAGAGCTCAGATTTGAAATCG  
 TGCTTTGCGGCACGAGTTGTAGATTGCAGTTGGAGTCTGTGTGGAAGGCGGTGTCCAAGTC  
 CCTTGGAACAGGGCGCCAGGAGGGTGAGAGCCCCGTGGGATGCCGGCGGAAGCAGTGAG  
 GCCCTTCTGACGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCCAAGCGGGTGGTAAATTCCATCTAA  
 GGCTAAATACTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACTGTGAAGGAAAGATGAAAAGCACTT  
 TGAAAAGAGAGTGAAACAGCACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGTATTGCGCCCCGACATGG  
 GGATTGCGCACCGCTGCCTCTCGTGGGCGGCGCTCTGGGCTTTCCCTGGGCCAGCATCGGTT  
 CTTGCTGCAGGAGAAGGGGTTCTGGAACGTGGCTCTTCGGAGTGTTATAGCCAGGGCCAGAT  
 GCTGCGTGCGGGGACCGAGGACTGCGGCCGTGTAGGTCACGGATGCTGGCAGAACGGCGCA  
 ACACCGCCCCGTCTTGAACCACGGACCA

### 13.4.3 Cuenta en placa 37 °C

**Tabla 12.** Resultados de cuenta en placa de los aislados crecidos en medio líquido YPD a 37 °C durante 72 h. Resultados expresados en LOG UFC/mL, promedio de dos determinaciones independientes (n = 2).

Aislado	Tiempo		Aislado	Tiempo	
	0 h	72 h		0 h	72 h
Sb	6.18	9.26	25	*1.00	7.41
1	5.99	7.4	28	3.57	*5.00
4	5.86	6.53	32	*1.00	*1.00
6	5.95	5.53	36	4.45	6.46
7	5.91	6.56	37	5.15	9.74
8	5.53	10.49	38	6.04	8.51
9	5.84	8.38	39	5.96	8.84
10	5.95	*3.00	40	6.11	8.81
12	5.97	6.62	41	5.54	8.64
15	5.9	*3.00	42	5.59	8.86
18	5.89	*3.00	43	6.15	*11.18
20	5.87	4.08	44	6.2	*11.18
24	5.04	6.23			

### 13.4.4 Análisis estadístico pH y SB

**Tabla 13.** Análisis de varianza a 2 vías de los resultados de crecimiento en medio líquido YPD ajustado a pH 2.5 (HCl) de 9 cepas y Sb en el tiempo 0 horas (n = 6).

	Suma de cuadrados	GL	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	7574546666666.670	9	841616296296.296	4.849	.002
Dentro de grupos	3471333333333.330	20	173566666666.667		
Total	1104588000000.000	29			

**Tabla 14.** Análisis de varianza a 2 vías de los resultados de crecimiento en medio líquido YPD ajustado a pH 2.5 (HCl) de 9 cepas y Sb en el tiempo 3 horas (n = 6).

Origen	Tipo III de suma de cuadrados	GL	Cuadrático promedio	F	Sig.
Modelo corregido	1566100000000,008 <sup>a</sup>	11	1423727272727.270	.682	.739
Interceptación	38377633333333.000	1	38377633333333.000	183.759	.000
Cepas	1560033333333.300	9	1733370370370.370	.830	.598
Repeticiones	60666666666.667	2	30333333333.333	.015	.986
Error	3759266666666.700	18	2088481481481.480		
Total	43703000000000.000	30			
Total corregido	5325366666666.700	29			

a. R al cuadrado = ,294 (R al cuadrado ajustada = -,137)

**Tabla 15.** Análisis de varianza a 2 vías de los resultados de crecimiento en medio líquido YPD ajustado a pH 2.5 (HCl) de 9 cepas y Sb en el tiempo 24 horas (n = 6).

	Suma de cuadrados	GL	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	15229987416666700000000000.000	9	16922208240740700000000000.000	6.585	.000
Dentro de grupos	51398250000000000000000000.000	20	256991250000000000000000.000		
Total	20369812416666700000000000.000	29			

**Tabla 16.** Clasificación de los 9 aislados y Sb considerando la cantidad de UFC en medio líquido YPD ajustado a pH 2.5 con HCl, incubado a 37 °C (UFC/mL) para los 3 tiempos de fermentación según la Prueba de Duncan.

Aislado	Tiempo de fermentación (horas)											
	0				3				24			
43	500000,0	±	145258,4	a	500000,0	±	145258,4	a	440000000000,0	±	244335834457,4	a
42	580000,0	±	147986,5	a	580000,0	±	147986,5	a	783333333333,3	±	583466651432,1	a
44	643333,3	±	400790,9	a	643333,3	±	400790,9	a	370000000000,0	±	245560583156,2	a
41	880000,0	±	283548,9	ab	880000,0	±	283548,9	a	520000000000,0	±	322335229225,7	a

<b>8</b>	910000,0	±	329089,7	ab	910000,0	±	329089,7	a	340000000000,0	±	232594066992,3	a
<b>37</b>	1266666,7	±	57735,0	abc	1266666,7	±	57735,0	a	783333333333,3	±	4660829682935,6	b
<b>Sb</b>	1300000,0	±	100000,0	abc	1300000,0	±	100000,0	a	141666666666,7	±	59651767227,2	a
<b>38</b>	1633333,3	±	404145,2	bc	1633333,3	±	404145,2	a	208333333333,3	±	1500277752062,4	a
<b>39</b>	1733333,3	±	650640,7	c	1733333,3	±	650640,7	a	803333333333,3	±	616143922580,9	a
<b>40</b>	2033333,3	±	862167,8	c	2033333,3	±	862167,8	a	323333333333,3	±	850490054811,5	a

\* Letras diferentes en cada tiempo de fermentación indican diferencia significativa en la cantidad de UFC a pH ácido entre los 9 aislados y Sb.

**Tabla 17.** Análisis de varianza a 2 vías de los resultados de crecimiento en medio líquido YNB adicionado de 0.5 % de glucosa y 1.5 % de sales biliares de 9 cepas y Sb en el tiempo 0 horas (n = 6).

Origen	Tipo III de suma de cuadrados	gl	Cuadrático promedio	F	Sig.
Modelo corregido	12574759999999,996 <sup>a</sup>	12	1047896666666.670	3.558	.003
Interceptación	128737439999999.000	1	128737439999999.000	437.068	.000
Cepas	9169659999999.990	9	1018851111111.110	3.459	.006
Repeticiones	3405100000000.000	3	1135033333333.330	3.853	.020
Error	7952800000000.000	27	294548148148.148		
Total	14926500000000.000	40			
Total corregido	20527560000000.000	39			

a. R al cuadrado = ,613 (R al cuadrado ajustada = ,440)

**Tabla 18.** Análisis de varianza a 2 vías de los resultados de crecimiento en medio líquido YNB adicionado de 0.5 % de glucosa y 1.5 % de sales biliares de 9 cepas y Sb en el tiempo 3 horas (n = 6).

Origen	Tipo III de suma de cuadrados	gl	Cuadrático promedio	F	Sig.
Modelo corregido	59314120000000,010 <sup>a</sup>	12	4942843333333.330	2.869	.011
Interceptación	668061022499997.000	1	668061022499997.000	387.727	.000
Cepas	51848652500000.000	9	5760961388888.890	3.344	.007
Repeticiones	7465467500000.000	3	2488489166666.670	1.444	.252
Error	46521557500000.000	27	1723020648148.150		
Total	773896700000000.000	40			
Total corregido	105835677500000.000	39			

a. R al cuadrado = ,560 (R al cuadrado ajustada = ,365)

**Tabla 19.** Análisis de varianza a 2 vías de los resultados de crecimiento en medio líquido YNB adicionado de 0.5 % de glucosa y 1.5 % de sales biliares de 9 cepas y Sb en el tiempo 24 horas (n = 6).

Origen	Tipo III de suma de cuadrados	gl	Cuadrático promedio	F	Sig.
Modelo corregido	3710716440000000,000 <sup>a</sup>	12	309226370000000.000	28.262	.000
Interceptación	119698916490000000.000	1	119698916490000000	10940.116	.000
Cepas	3661700010000000.000	9	406855556666667.000	37.185	.000
Repeticiones	49016430000000.000	3	16338810000000.000	1.493	.239
Error	295414670000000.000	27	10941284074074.100		
Total	123705047600000000.000	40			
Total corregido	4006131110000000.000	39			

a. R al cuadrado = ,926 (R al cuadrado ajustada = ,893)

**Tabla 20.** Clasificación de los 9 aislados y Sb considerando la cantidad de células en caldo YNB con 0.5 % (m/v) de glucosa y 1.5 % (m/v) de sales biliares para los 3 tiempos de fermentación según la Prueba de Duncan.

Aislado	Tiempo de fermentación (horas)											
	0			3			24					
44	1237500,0	±	480234,3	a	2862500,0	±	801431,0	a	62500000,0	±	2376271,6	e
43	1262500,0	±	292617,5	a	2825000,0	±	775134,4	a	60800000,0	±	3432200,5	e
42	1287500,0	±	852814,0	a	3837500,0	±	2945724,3	a	58300000,0	±	2376271,6	d e
8	1625000,0	±	512347,5	ab	3000000,0	±	441588,0	a	55125000,0	±	2320021,6	c d
38	1725000,0	±	922225,6	ab	4020000,0	±	1320908,8	ab	50520000,0	±	3699945,9	c
41	1725000,0	±	829156,2	ab	3775000,0	±	1747617,4	a	62500000,0	±	683130,1	e
Sb	1930000,0	±	164519,5	abc	3690000,0	±	598999,2	a	33860000,0	±	3160675,0	a
40	1950000,0	±	588784,1	abc	4700000,0	±	840634,7	abc	44700000,0	±	2350886,4	b
37	2415000,0	±	185741,8	bc	5910000,0	±	982852,9	bc	50760000,0	±	6607632,0	c
39	2782500,0	±	730542,0	c	6247500,0	±	1024609,7	c	67970000,0	±	3608453,0	f

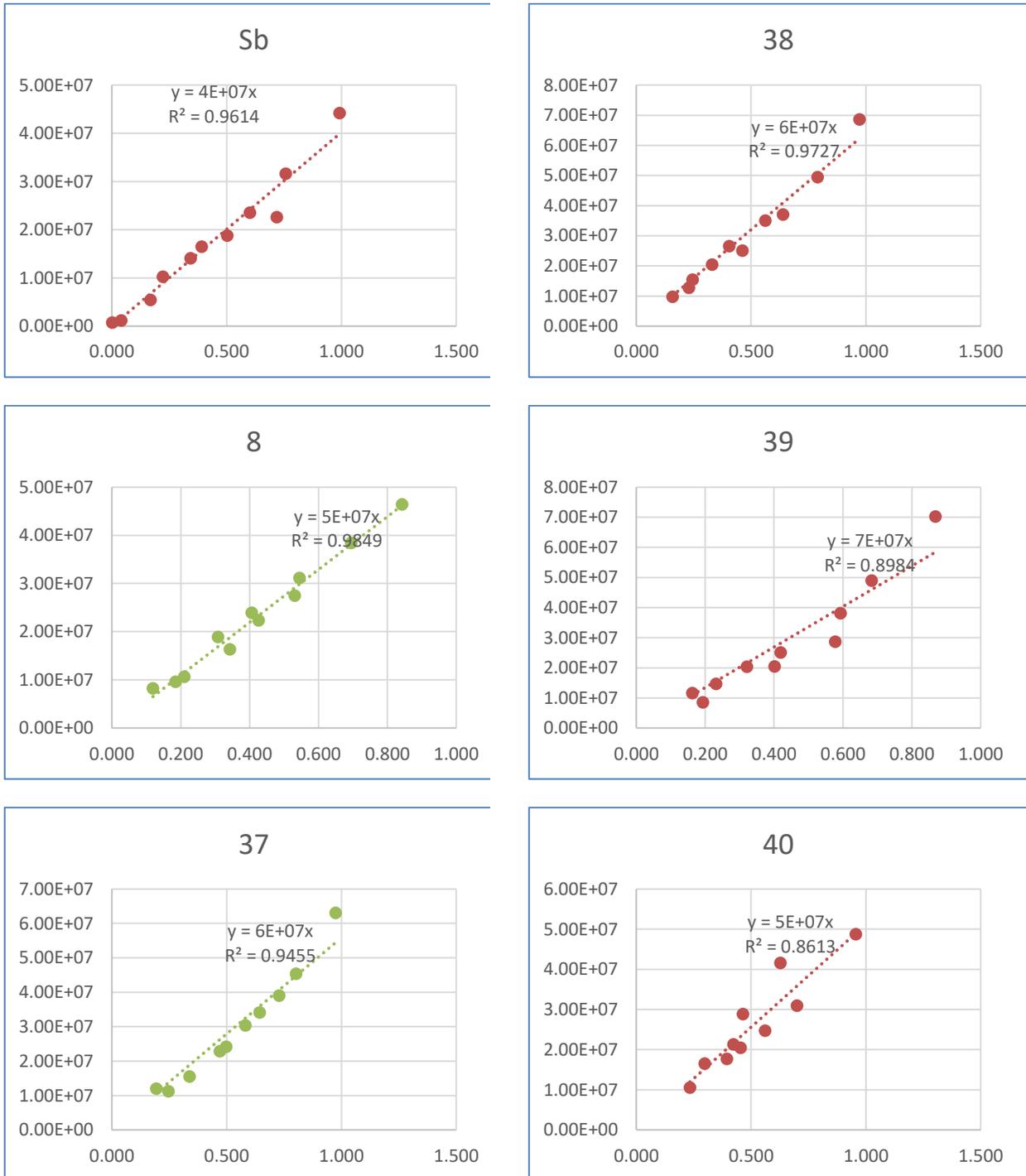
### 13.4.5 0.5 % sales biliares

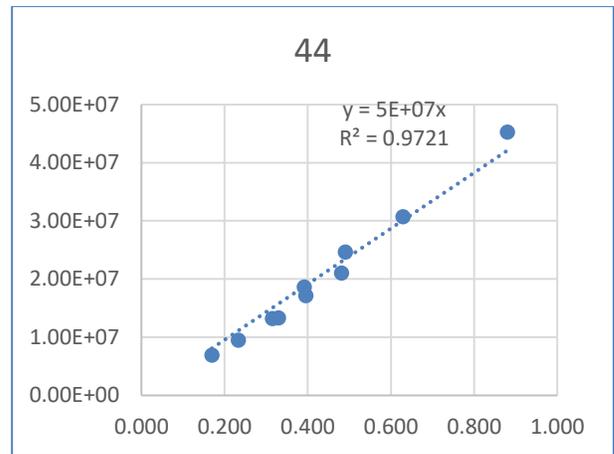
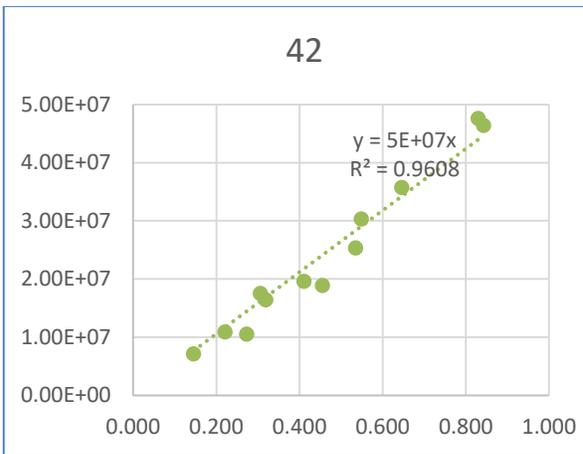
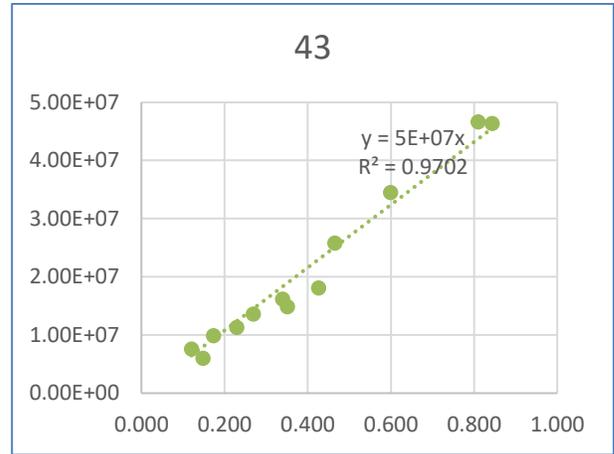
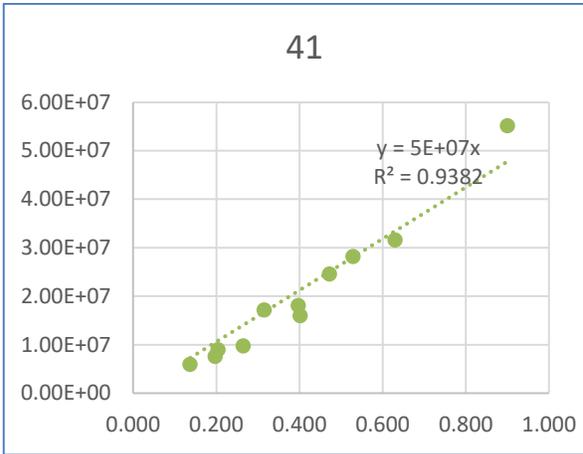
**Tabla 21.** Resultados sales biliares 0.5 % expresados en células/ mL. Promedio de 2 experimentos independientes cada uno con 2 réplicas (n = 4).

<b>Cepa</b>	<b>Tiempo 0 h</b>			<b>Tiempo 3 h</b>			<b>Tiempo 24 h</b>		
Sb	2340000	±	346410.2	4710000	±	775886.6	33540000	±	1738505
8	1512500	±	209662.4	3337500	±	188745.9	53600000	±	2292015
37	2640000	±	642495.1	7140000	±	1220819	53310000	±	7010421
38	2805000	±	502891.6	6270000	±	270555	55860000	±	2761739
39	2970000	±	221810.7	6915000	±	657951.4	58230000	±	5387430
40	3270000	±	198997.5	7935000	±	637573.5	60270000	±	3189044
41	2225000	±	396862.7	3975000	±	434932.9	60825000	±	4521338
42	1875000	±	504149.4	3637500	±	249583	57150000	±	2824299
43	2262500	±	957753.4	4412500	±	2238815	65175000	±	6845619
44	1925000	±	554526.8	3600000	±	362859	60700000	±	4009988

### 13.4.6 Curvas de crecimiento células vs. Densidad óptica

**Figura 14.** Curvas de calibración células contra densidad óptica de 9 aislados y Sb. Células contadas con un hemacitómetro (Newbauer) y densidad óptica (600 nm).





### 13.4.7 Análisis estadístico formación de biopelícula

**Tabla 22.** Análisis de varianza a 2 vías de los resultados de formación de biopelícula de 5 cepas y Sb en el tiempo 24 horas (n = 6).

Fuente	Suma de Cuadrados	GL*	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	2.89288000	6	0.48214700	2985.08	0
Intra grupos	0.00565317	35	0.00016152		
Total (Corr.)	2.89853	41			

\*GL: Grados de libertad

**Tabla 23.** Resultados del análisis estadístico de la prueba de formación de biopelícula. Prueba de rangos múltiples de Tukey HSD ( $\alpha=0.05$ ). Resultados promedio de 2 pruebas independientes con 3 réplicas cada una (n=6).

Cepa	Casos	Media	Grupos Homogéneos
44	6	0.0413333	A
41	6	0.0433333	AB
39	6	0.0505000	ABC
8	6	0.0643333	BC
37	6	0.0701667	C
Sb	6	0.1010000	D
Ca	6	0.8098330	E

**Tabla 24.** Resultados de formación de biopelícula en medio YPD con 8 % glucosa.

Cepa	Absorbancia (490 nm)			%		
		±			±	
Ca	2.452	±	0.278	100.00	±	11.34
Sb	0.347	±	0.141	14.15	±	5.75
37	2.304	±	0.2	93.96	±	8.16
39	2.108	±	0.267	85.97	±	10.89
8	0.388	±	0.267	15.82	±	10.89
41	0.525	±	0.06	21.41	±	2.45
44	0.579	±	0.11	23.61	±	4.49

Cuantificación por el método de cristal violeta. Resultados expresados como media  $\pm$  desviación estándar. Resultados expresados como porcentaje respecto a los controles positivo (*C. albicans* ATCC 14053) y negativo (medio sin inóculo). Los superíndices indican los grupos homogéneos obtenidos mediante la prueba de Tukey ( $\alpha=0.05$ ).

### 13.4.8 Simulación del paso sucesivo a través del tracto gastrointestinal

**Tabla 25.** Resultados de cuenta en placa de la simulación del paso sucesivo a través del tracto gastrointestinal de 2 aislados y Sb.

Cepa	T0	Lisozima	Jugo gástrico	Jugo pancreático
Sb	7.65	7.26	6.81	6.77
Sb	7.53	7.26	7.04	6.11
Sb	7.58	7.28	6.93	6.11
8	7.78	7.00	6.61	6.64
8	7.20	6.84	7.40	5.83
8	7.30	6.88	6.53	5.79
37	7.72	7.36	6.76	6.38
37	8.08	7.04	7.23	6.04
37	7.20	6.95	6.79	5.93

**Tabla 26.** Análisis de varianza a 2 vías de los resultados de del paso sucesivo a través del tracto gastrointestinal de 2 aislados y Sb (n = 3).

Fuente de variación	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	F	P-value	F crit
Muestras	0.236196	2	0.118098	1.329864	0.289289	3.554557
Columnas	4.199898	2	2.099949	23.64688	9.2E-06	3.554557
Entre grupos	0.080637	4	0.020159	0.227007	0.919694	2.927744
Intra grupos	1.598481	18	0.088804			
Total	6.115211	26				