



CENTRO DE INVESTIGACIONES  
BIOLOGICAS DEL NOROESTE, S.C.

---

Programa de Estudios de Posgrado

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTAGÓNICA DE  
LEVADURAS MARINAS PARA EL CONTROL DE  
HONGOS FITOPATÓGENOS EN GRANO DE MAÍZ Y  
SU POTENCIAL PROBIÓTICO E  
INMUNOESTIMULANTE EN CAPRINOS

TESIS

Que para obtener el grado de

Doctor en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales  
(Orientación en Biotecnología)

Presenta

**NOÉ DE JESÚS MEDINA CÓRDOVA**

La Paz, Baja California Sur, Noviembre de 2017

## ACTA DE LIBERACIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 12 horas del día 24 del mes de Agosto del 2017, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos Humanos del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

**"EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTAGÓNICA DE LEVADURAS MARINAS PARA EL CONTROL DE HONGOS FITOPATÓGENOS EN GRANO DE MAÍZ Y SU POTENCIAL PROBIÓTICO E INMUNOESTIMULANTE EN CAPRINOS"**

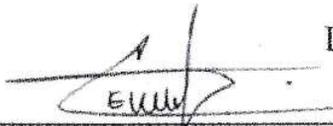
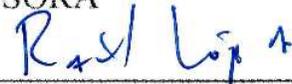
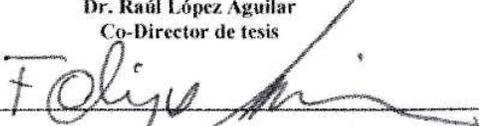
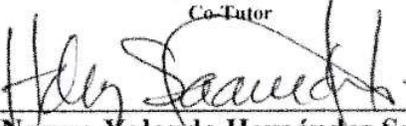
Presentada por el alumno:

**NOÉ DE JESÚS MEDINA CÓRDOVA**

Aspirante al Grado de DOCTOR EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACIÓN DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACIÓN EN Biotecnología

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACIÓN DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

### LA COMISIÓN REVISORA

 <hr/> Dr. Carlos Angulo Valadez Co-Director de Tesis	 <hr/> Dr. Raúl López Aguilar Co-Director de tesis
 <hr/> Dra. Thelma Castellanos Cervantes Co-Tutor	 <hr/> Dr. Felipe Ascencio Valle Co-Tutor
 <hr/> Dr. Ángel Campa Córdova Co-Tutor	
 <hr/> Dra. Norma Yolanda Hernández Saavedra, Directora de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos Humanos	

## **CONFORMACIÓN DE COMITÉS**

### **Comité tutorial**

Dr. Carlos Angulo Valadez  
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.  
Co-Director

Dr. Raúl López Aguilar  
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.  
Co-Director

Dra. Thelma Castellanos Cervantes  
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.  
Co-Tutor

Dr. Felipe Ascencio Valle  
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.  
Co-Tutor

Dr. Ángel Campa Córdova  
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.  
Co-Tutor

### **Comité revisor de tesis**

Dr. Carlos Angulo Valadez  
Dr. Raúl López Aguilar  
Dra. Thelma Castellanos Cervantes  
Dr. Felipe Ascencio Valle  
Dr. Ángel Campa Córdova

### **Jurado de examen**

Dr. Carlos Angulo Valadez  
Dr. Raúl López Aguilar  
Dra. Thelma Castellanos Cervantes  
Dr. Felipe Ascencio Valle  
Dr. Ángel Campa Córdova

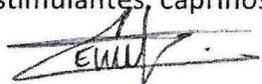
### **Suplentes**

Dr. Ricardo Vázquez Juárez  
Dr. Rogelio Ramírez Serrano

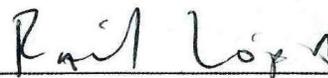
## Resumen

Los granos de cereales se contaminan con hongos micotoxigénicos cuando su manejo es inadecuado, disminuyendo la calidad de los granos y afectando la salud de los animales que los consumen. Aunado a esto, el uso excesivo de antimicrobianos para el control de fitopatógenos y enfermedades infecciosas en los sistemas de producción de caprinos es una preocupación por los residuos presentes en los productos y en el ambiente. Como alternativa a estas problemáticas se encuentra el control biológico y los probióticos e inmunoestimulantes. Estudios previos demuestran que la levadura marina *Debaryomyces hansenii* es un microorganismo antagonista de hongos fitopatógenos y un probiótico para especies acuícolas. Sin embargo, su actividad antagónica no se ha evaluado contra hongos fitopatógenos en granos de maíz (*Zea mays* L.) y tampoco su potencial probiótico e inmunoestimulante en caprinos. Por ello, el objetivo general del presente proyecto fue evaluar el efecto de *D. hansenii* como agente bioprotector contra hongos fitopatógenos en grano de maíz y determinar su potencial probiótico e inmunoestimulante en caprinos. *In vitro* se determinó la capacidad antagónica y los mecanismos de acción de siete cepas de *D. hansenii* contra cuatro cepas de hongos aislados de grano de maíz mediante ensayos de inhibición radial, compuestos difusibles en agar, compuestos volátiles y metabolitos secretorios. El potencial probiótico de *D. hansenii* se determinó mediante ensayos *in vitro* de tolerancia a pH ácido, tolerancia a sales biliares, y capacidad de adhesión al intestino de cabra. El potencial inmunoestimulante se determinó en leucocitos de sangre periférica de caprino utilizando lisados celulares y  $\beta$ -glucanos obtenidos de las siete cepas de *D. hansenii*. Para ello se determinó la viabilidad celular, actividad fagocítica, explosión respiratoria, producción de óxido nítrico y la actividad de enzimas antioxidantes. *D. hansenii* (DhhBCS003) exhibió una actividad inhibitoria de los hongos fitopatógenos de hasta un 98.3%, 55.6%, 54.4% y 39% en los diferentes bioensayos empleados. Así mismo, el contenido de fumonisinas se redujo significativamente (59.8%). Por otra parte, todas las cepas de *D. hansenii* mostraron tasas de supervivencia elevadas (>90%) en presencia de bilis de caprino así como en ambientes ácidos. Además, todas las cepas se adhirieron al intestino de caprinos. Finalmente, los lisados y  $\beta$ -glucanos de las cepas DhhBCS001, DhhBCS003, DhhBCS004 y DhhBCS005 estimularon los diferentes parámetros inmunológicos evaluados sin afectar la viabilidad de los leucocitos de sangre periférica de caprinos. Con base en los resultados obtenidos, la cepa DhhBCS003 es un agente bioprotector potencial contra hongos fitopatógenos en grano de maíz y una levadura candidata por su potencial probiótico y propiedades inmunoestimulantes para su evaluación *in vivo* en caprinos.

**Palabras Clave:** Maíz, *Debaryomyces hansenii*, hongos fitopatógenos, probióticos, inmunoestimulantes, caprinos.



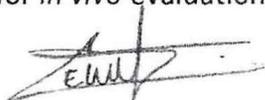
Vo. Bo. Dr. Carlos Eliud Angulo Valadez  
Co-Director de tesis



Vo. Bo. Dr. David Raúl López Aguilar  
Co-Director de tesis

## Summary

Cereal grains are contaminated with mycotoxigenic fungi when their handling is inadequate, decreasing the quality of grains and affecting animal health that consumes them. Besides, the excessive use of antimicrobials for the control of phytopathogens and infectious diseases in caprine production systems is a concern due residues in animal products and in the environment. The biological control and probiotics and immunostimulants are an alternative to these problems. Previous studies showed that the marine yeast *Debaryomyces hansenii* is an antagonistic microorganism of phytopathogenic fungi and a probiotic for aquaculture species. However, its antagonistic activity has not been evaluated against phytopathogenic fungi in maize grain (*Zea mays* L.) and neither its probiotic as well as its immunostimulant potential in goats. Thus, the general objective of this project was to evaluate the effect of *D. hansenii* as a bioprotective agent against phytopathogenic fungi in maize grain and determine its probiotic and immunostimulant potential in goats. The antagonistic capacity and mechanisms of action of seven strains of *D. hansenii* against four strains of fungi isolated from maize grain were determined *in vitro* by radial inhibition, diffusible compounds in agar, volatile compounds and secretory metabolites assays. The probiotic potential of *D. hansenii* was determined by *in vitro* assays of tolerance to acid pH, tolerance to bile salts, and adhesion capacity to goat intestine. The immunostimulant potential was determined in peripheral blood leukocytes from goats using cell lysates and  $\beta$ -glucans obtained from seven strains of *D. hansenii*. For this, cell viability, phagocytic activity, respiratory burst, nitric oxide production and activity of antioxidant enzymes were determined. *D. hansenii* (DhhBCS003) exhibited an inhibitory activity of phytopathogenic fungi of up to 98.3%, 55.6%, 54.4% and 39% in the different preformed bioassays. Likewise, the content of fumonisins was significantly reduced (59.8%). Moreover, all *D. hansenii* strains showed high survival rates (> 90%) in acidic environments as well as in the presence of goat bile. In addition, all strains were adhered to goat's intestine. Finally, lysates and  $\beta$ -glucans of the strains DhhBCS001, DhhBCS003, DhhBCS004 and DhhBCS005 stimulated the different immunological parameters evaluated without affecting the viability of caprine peripheral blood leukocytes. Based on all results, the strain DhhBCS003 is a potential bioprotective agent against phytopathogenic fungi in maize grain and candidate yeast for its probiotic potential and immunostimulant properties for *in vivo* evaluation in goats.



---

Vo. Bo. Dr. Carlos Eliud Angulo Valadez  
Co-Director de tesis



---

Vo. Bo. Dr. David Raúl López Aguilar  
Co-Director de tesis

## *Dedicatoria...*

*A mis grandes amores, mi compañera de vida Ana, y mi mayor motivación Emiliano, Valentina y Noé, quienes me han enseñado el verdadero valor de la vida...*

*A mis padres Kiko y Maty, y a mis hermanos Chema y Erik, quienes forjaron mis principios para ser lo que soy ahora...*

*A toda mi familia, porque a pesar de las distancias, siempre han estado apoyándome...*

## Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el apoyo brindado a través de su programa de becas para la realización de este trabajo (Beca No. 236230).

Al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C., sus autoridades, directivos y personal administrativo por el apoyo para realizar esta investigación a través de la línea estratégica de Agrotecnología y Recursos Energéticos (ZA3) financiada por CONACYT (INFR-2014-01/225924 y PDCPN2014-01/248033 (Dr. C. Angulo), y INFR-2013-01/204434 (Dr. F. Ascencio), y por permitirme formar parte de una institución de tanto prestigio.

A mis Co-Directores de tesis, Dr. Carlos Angulo Valadez y Dr. Raúl López Aguilar, y tutores, Dra. Thelma Castellanos Cervantes, Dr. Felipe Ascencio Valle y Dr. Ángel Campa Córdova, por su paciencia y tiempo invertido en mi formación y desarrollo académico, así como sus importantes contribuciones a este trabajo.

A la Dra. Martha Reyes Becerril, Técnico responsable del Laboratorio de Patogénesis Microbiana, a quien agradezco el gran apoyo en el desarrollo de las técnicas inmunológicas y análisis de citometría de flujo.

Al Tec. Arturo Sierra-Beltrán y a la M.C. Rubí Martínez por su asistencia técnica en la determinación de toxinas y en los ensayos de antagonismo *in vitro*.

Al M.C. Ángel Carrillo, Técnico responsable del Laboratorio de Ecología Microbiana Molecular.

Al Tec. Ariel Cruz, Técnico responsable del Laboratorio de Microscopía Electrónica, por su valiosa aportación en la captura de imágenes.

A la I.BQ. María Dolores Rondero Astorga, Técnico responsable del Laboratorio de Análisis Químico Proximal.

Al MVZ Manuel Melero Astorga, por permitirme tomar muestras sanguíneas de su rebaño caprino para el aislamiento de leucocitos empleados en los ensayos inmunológicos.

A los compañeros y amigos del Grupo de Inmunología & Vacunología (GIV), así como del Laboratorio de Patogénesis Microbiana, Miriam, Mario, Betty, Kika, Crystal, Goyo, Rodolfo, Verónica, Asdrúbal, Paola, Nancy, Memo, aprendí mucho de todos y les agradezco inmensamente que hayan formado parte de esta etapa tan importante en mi vida.

A la señora Ana María Onofre Ruelas, así como la familia Loyo Onofre que siempre confiaron en mí y con quienes he compartido muy bellos momentos.

## Contenido

Resumen.....	III
Summary .....	IV
Dedicatoria .....	V
Agradecimientos .....	VI
Contenido.....	VII
Lista de figuras.....	X
Lista de tablas .....	XI
<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>2. ANTECEDENTES .....</b>	<b>3</b>
2.1 Cultivo de maíz ( <i>Zea mays</i> L.).....	3
2.2 Uso de levaduras en el control de hongos patógenos .....	5
2.3 Generalidades de la cabra doméstica.....	7
2.4 Sistema inmune de caprinos.....	9
2.4.1 Anatomía y función del sistema inmune.....	10
2.4.2 Inmunidad innata .....	11
2.4.3 Inmunidad adquirida o adaptativa.....	14
2.5 Los probióticos en la nutrición animal.....	16
2.6 Uso de inmunoestimulantes.....	18
2.7 <i>Debaryomyces hansenii</i> .....	23
<b>3. JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>26</b>
<b>4. HIPÓTESIS.....</b>	<b>26</b>
<b>5. OBJETIVO GENERAL .....</b>	<b>27</b>
5.1 Objetivos particulares .....	27
<b>6. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>27</b>
6.1 Evaluación del efecto antagónico de la levadura marina <i>D. hansenii</i> contra hongos patógenos, mecanismos de acción, calidad nutricional y producción de micotoxinas en grano de maíz ( <i>Zea mays</i> L.).....	27
6.1.1 Origen de la levadura .....	27
6.1.2 Hongos patógenos.....	27
6.1.3 Identificación molecular .....	28
6.1.4 Semilla de maíz.....	29
6.1.5 Postulados de Koch .....	29
6.1.6 Prueba de patogenicidad.....	29
6.1.7 Ensayo de inhibición radial de hongos patógenos de maíz	

en medio sólido .....	29
6.1.8 Efecto de compuestos difusibles en agar de <i>D. hansenii</i> sobre el crecimiento de hongos patógenos en medio sólido.....	30
6.1.9 Efecto antifúngico de compuestos volátiles producidos por <i>D. hansenii</i> .....	31
6.1.10 Efecto del sobrenadante libre de células de <i>D. hansenii</i> sobre el crecimiento de hongos patógenos de maíz .....	31
6.1.11 Efecto antagónico de <i>D. hansenii</i> contra hongos patógenos en grano de maíz.....	32
6.1.12 Efecto de <i>D. hansenii</i> sobre la producción de fumonisinas en grano de maíz.....	32
6.2 Determinación de las potenciales propiedades probióticas e inmunoestimulantes de <i>D. hansenii</i> en leucocitos de sangre periférica de caprino. ....	33
6.2.1 Origen de las levaduras .....	33
6.2.2 Tamizaje <i>in vitro</i> de las levaduras seleccionadas como candidatas para su uso como probióticos.....	34
6.2.2.1 Tolerancia a pH ácido .....	34
6.2.2.2 Tolerancia a sales biliares.....	34
6.2.2.3 Ensayo de adhesión al tracto gastrointestinal .....	35
6.2.3 Ensayos inmunológicos.....	35
6.2.3.1 Preparación de lisados celulares .....	35
6.2.3.2 Extracción de $\beta$ -glucanos .....	35
6.2.3.3 Caracterización estructural de $\beta$ -glucanos.....	36
6.2.3.4 Aislamiento de leucocitos de sangre periférica de caprino.....	36
6.2.3.5 Estimulación de leucocitos .....	37
6.2.3.6 Ensayo de viabilidad celular de leucocitos.....	37
6.2.3.7 Evaluación de la actividad fagocítica de leucocitos de caprino.....	38
6.2.4 Actividades enzimáticas antioxidantes y respuestas al estrés oxidativo y nitrosativo .....	38
6.2.4.1 Explosión respiratoria de leucocitos de sangre periférica de caprino.....	38
6.2.4.2 Ensayo de producción de óxido nítrico (ON) de leucocitos de caprino .....	39
6.2.4.3 Superóxido dismutasa y catalasa en leucocitos de caprino .....	39
6.2.4.4 Actividad de mieloperoxidasa (MPO) en leucocitos de caprino .....	40
6.3 Análisis estadístico .....	40
<b>7. RESULTADOS .....</b>	<b>41</b>
7.1 Evaluación del efecto antagónico de la levadura marina <i>D. hansenii</i> contra hongos patógenos, mecanismos de acción, calidad nutricional y producción de micotoxinas en grano de maíz ( <i>Zea mays</i> L.).....	41
7.1.1 Prueba de patogenicidad de los aislados en semillas de maíz .....	41
7.1.2 Identificación de los hongos aislados de maíz .....	41
7.1.3 Ensayo de inhibición radial de hongos patógenos de maíz en	

medio sólido.....	42
7.1.4 Efecto de compuestos difusibles en agar de <i>D. hansenii</i> sobre el crecimiento de hongos patógenos en medio sólido .....	43
7.1.5 Efecto antifúngico de compuestos volátiles producidos por <i>D. hansenii</i> .....	44
7.1.6 Efecto del sobrenadante libre de células de <i>D. hansenii</i> sobre el crecimiento de hongos patógenos de maíz .....	45
7.1.7 Efecto antagónico de <i>D. hansenii</i> contra hongos patógenos en grano de maíz.....	46
7.1.8 Efecto de <i>D. hansenii</i> sobre la producción de fumonisinas en grano de maíz.....	49
7.2 Determinación de las potenciales propiedades probióticas e inmunoestimulantes de <i>D. hansenii</i> en leucocitos de sangre periférica de caprino .....	50
7.2.1 Tolerancia a pH ácido y sales biliares .....	50
7.2.2 Ensayo de adhesión intestinal .....	51
7.2.3 Ensayos inmunológicos.....	52
7.2.3.1 Espectros de NMR y rendimientos de $\beta$ -glucanos de distintas cepas de <i>D. hansenii</i> .....	52
7.2.3.2 Ensayo de viabilidad celular .....	53
7.2.3.3 Actividad fagocítica .....	54
7.2.4 Actividades enzimáticas antioxidantes y respuestas al estrés oxidativo y nitrosativo .....	55
7.2.4.1 Explosión respiratoria.....	55
7.2.4.2 Producción de óxido nítrico (ON) .....	56
7.2.4.3 Superóxido dismutasa y catalasa .....	57
7.2.4.4 Mieloperoxidasa (MPO).....	59
<b>8. DISCUSIÓN .....</b>	<b>60</b>
<b>9. CONCLUSIONES .....</b>	<b>69</b>
<b>10. LITERATURA CITADA .....</b>	<b>70</b>
<b>11. ANEXOS.....</b>	<b>87</b>

## Lista de figuras

<b>Figura 1.</b> Usos de la producción de maíz por sector en E.U.A.....	3
<b>Figura 2.</b> Mecanismos de defensa del organismo frente a la infección.....	10
<b>Figura 3.</b> Función de los órganos linfoides en caprinos. ....	11
<b>Figura 4.</b> Células responsables de la inmunidad innata. ....	13
<b>Figura 5.</b> Componentes de la pared celular de levaduras y hongos .....	21
<b>Figura 6.</b> Prueba de patogenicidad en granos de maíz .....	41
<b>Figura 7.</b> Productos de PCR de los cuatro aislados.....	42
<b>Figura 8.</b> Inhibición radial de <i>D. hansenii</i> contra hongos patógenos en medio sólido .....	43
<b>Figura 9.</b> Efecto de compuestos difusibles en agar .....	44
<b>Figura 10.</b> Efecto antagónico de compuestos volátiles.....	45
<b>Figura 11.</b> Efecto antagónico del sobrenadante libre de células .....	46
<b>Figura 12.</b> Micrografías de formación de <i>biofilm</i> (FBF) .....	49
<b>Figura 13.</b> Producción de fumonisinas de <i>F. proliferatum</i> y <i>F. subglutinans</i> .....	50
<b>Figura 14.</b> Capacidad de adhesión a epitelio intestinal de cabra.....	51
<b>Figura 15.</b> Espectros de NMR de los glucanos particulados insolubles en agua .....	53
<b>Figura 16.</b> Efecto de $\beta$ -glucanos y lisados sobre la viabilidad (%) de leucocitos.....	54
<b>Figura 17.</b> Capacidad fagocítica de leucocitos de sangre periférica caprina.....	55
<b>Figura 18.</b> Generación de especies reactivas de oxígeno.....	56
<b>Figura 19.</b> Producción de óxido nítrico (ON) .....	57
<b>Figura 20.</b> Actividad de superóxido dismutasa.....	58
<b>Figura 21.</b> Actividad catalasa .....	59
<b>Figura 22.</b> Actividad de mieloperoxidasa (MPO).....	60

**Lista de tablas**

<b>Tabla I.</b>	Microorganismos más utilizados como probióticos en los animales y el hombre.....	17
<b>Tabla II.</b>	Colección de levaduras aisladas del Golfo de California perteneciente al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. (CIBNOR).....	33
<b>Tabla III.</b>	Actividad antagónica de <i>D. hansenii</i> contra <i>M. circinelloides</i> , <i>Aspergillus</i> sp., <i>F. proliferatum</i> y <i>F. subglutinans</i> en grano de maíz ( <i>Zea mays</i> L.). Los resultados están expresados como incidencia de la enfermedad (%), después de siete días de incubación a 25 °C .....	47
<b>Tabla IV.</b>	Actividad antagónica de <i>D. hansenii</i> en grano de maíz ( <i>Zea mays</i> L.). Los resultados están expresados como crecimiento micelial, después de siete días de incubación a 25 °C .....	48
<b>Tabla V.</b>	Índice de crecimiento y porcentaje de supervivencia de <i>D. hansenii</i> bajo condiciones de estrés (pH ácido y presencia de sales biliares) .....	51

## 1. INTRODUCCIÓN

Por mucho tiempo, los caprinos le han proveído al hombre de sus productos, que le han permitido a éste mejorar su bienestar y economía. La relevancia productiva y social de esta especie en el mundo, principalmente contribuye a las clases sociales del entorno rural (Cepeda, 2008), aunque también existen sistemas de producción caprina con tecnología moderna. De acuerdo al número de cabezas que reportó la FAO para el 2016, la población mundial de caprinos osciló alrededor de 1'005,603,003 cabezas, con una producción de 5,300,336 toneladas de carne y 17,846,118 millones de toneladas de leche (FAO, 2014). Europa, a pesar de no tener una alta población caprina, está en los primeros lugares de producción de leche debido a la tecnificación de sus explotaciones y las razas utilizadas.

En México, la mayor parte de estos sistemas de producción se ubican en zonas de poca importancia agrícola. De esta manera, la alimentación de los animales se basa en el pastoreo y ramoneo en el agostadero durante la mayor parte del año, por lo tanto, la alimentación se convierte en la principal limitante ya que depende de las lluvias y puede ser crítica en los meses más secos (febrero a agosto dependiendo de la región). Una sequía crítica causa la muerte de muchos animales por inanición o por enfermedad infecciosa/parasitaria ya que su sistema inmune se encuentra débil por falta de nutrientes. Aunado a las pérdidas económicas de la población caprina, se suma el hecho de que los animales que sobreviven pueden no reproducirse ese año por su condición física y por lo tanto no hay producción de leche y cabrito para el siguiente año (Cepeda, 2008).

El maíz (*Zea mays* L.) es uno de los cultivos agrícolas más importantes como parte fundamental en la dieta de humanos, así como componente básico para la elaboración de alimentos balanceados en los sistemas de producción animal en muchas regiones de Asia, África y América (Thompson *et al.*, 2013). Sin embargo, este se expone a contaminación con una amplia variedad de fitopatógenos tanto en su proceso productivo como durante su almacenamiento, sobre todo cuando el manejo del grano es inadecuado lo que favorece las condiciones para su desarrollo, tal es el caso de los hongos fitopatógenos (Magan y Aldred, 2007; Mylona *et al.*, 2014; Nicolaisen *et al.*, 2008). Recientemente, ha cobrado importancia

el biocontrol de hongos toxigénicos en productos alimenticios mediante el uso de levaduras antagonicas con la finalidad de reemplazar o reducir el uso de fungicidas sintéticos (Bautista-Rosales *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2013ab; Nally *et al.*, 2013; Spadaro *et al.*, 2013).

*Debaryomyces hansenii* ha sido reportada como una levadura antagonica eficiente contra hongos patógenos en distintos productos alimenticios, incluidos productos lácteos (Liu y Tsao, 2009), productos cárnicos curados (Andrade *et al.*, 2014; Simoncini *et al.*, 2014), y embutidos fermentados (Núñez *et al.*, 2015). Sin embargo, el potencial de *D. hansenii* como levadura antagonica contra hongos fitopatógenos en grano de maíz no ha sido explorado.

En la última década el uso de probióticos en nutrición animal ha llamado la atención de la comunidad científica como una alternativa viable para optimizar la composición de las dietas, reducir el uso de antibióticos y optimizar los costos de producción (Fajardo *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2012; Tellez *et al.*, 2012; Yu *et al.*, 2008). Los mecanismos de acción descritos a través de los cuales los probióticos ejercen sus efectos son principalmente a través de la competencia por receptores que permiten la adhesión y colonización del intestino, competencia por ciertos nutrientes, producción de compuestos antimicrobianos, inactivación de toxinas y metabolitos producidos por patógenos, y la estimulación del sistema inmune del huésped, considerado este último como el más importante (Fajardo *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2012; Tellez *et al.*, 2012).

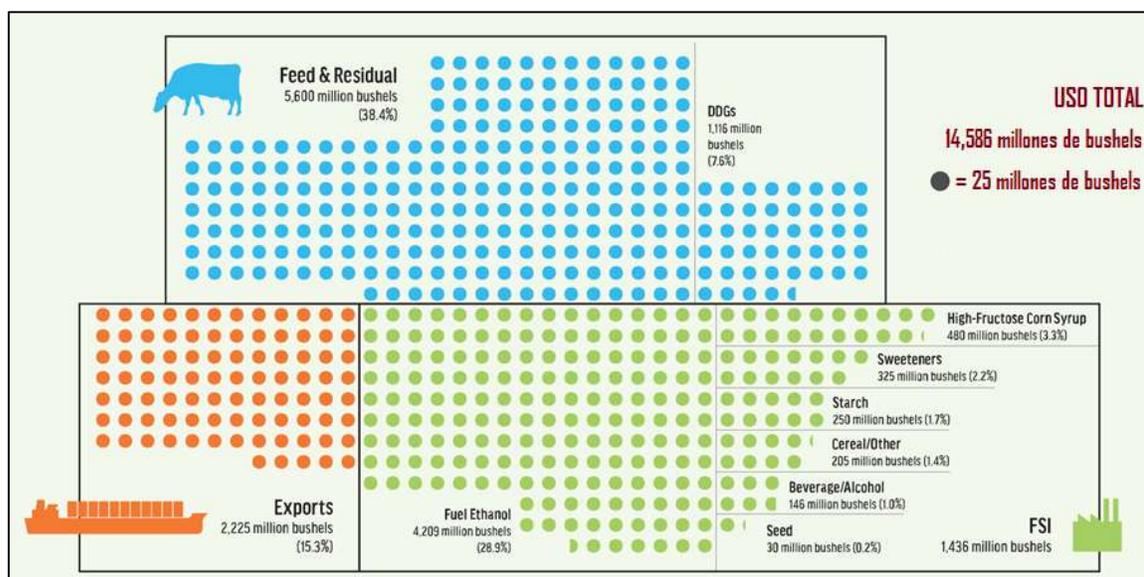
Se han realizado trabajos con cepas de levaduras de los géneros *Saccharomyces*, *Debaryomyces*, *Torulaspota*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, y *Candida*, que han demostrado poseer potencial probiótico e inmunoestimulante debido a su habilidad para sobrevivir a las condiciones del tracto gastrointestinal y adherirse a diferentes células epiteliales intestinales de mamíferos, además, éstas presentan propiedades inmunoestimulantes gracias a que poseen componentes como  $\beta$ -glucano, manoproteínas, quitina y ácidos nucleicos. Por lo anterior, en el presente trabajo se evaluó a la levadura marina *D. hansenii* como potencial agente bioprotector contra hongos fitopatógenos en grano de maíz (*Zea mays* L.), se determinaron sus mecanismos de acción y su efecto sobre la producción de micotoxinas, además, se comprobó sus potenciales propiedades probióticas, así como la

capacidad inmunoestimulante de sus componentes estructurales en leucocitos de sangre periférica de caprinos.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Cultivo de maíz (*Zea mays* L.)

Por su alto valor nutricional, el maíz (*Zea mays* L.) es uno de los cultivos agrícolas más importantes como parte fundamental en la dieta de humanos, así como para la producción de energía, y como componente básico para la elaboración de alimentos balanceados en sistemas de producción animal en muchas regiones alrededor del mundo, siendo este último su principal destino (Fig. 1) (Thompson *et al.*, 2013). En 2016 la FAO reportó una producción mundial de maíz de 1'016,736,092 toneladas, en ese mismo año en México se reportó una producción de 23,273,257 toneladas.



**Figura 1.** Usos de la producción de maíz por sector en E.U.A. (millones de bushels) (USDA, ERS Feed Outlook, enero de 2017).

Independientemente de su uso, gran parte del maíz producido se almacena con el fin de abastecer su demanda a lo largo del año, esto expone al producto a una pérdida de atributos tales como las propiedades nutricionales, viabilidad de las semillas, la calidad sanitaria del

grano y su valor comercial, además, debido a que es un producto rico en almidón, el maíz es uno de los cereales más susceptibles al desarrollo de hongos toxigénicos tanto en campo como durante su almacenamiento (Di Domenico *et al.*, 2015). Se conocen muchos factores ecológicos que pueden afectar a la seguridad de almacenamiento del grano de maíz, entre ellos, el contenido de humedad juega el papel principal, actualmente se sugiere que la cosecha del grano después de la madurez fisiológica sea con una humedad de alrededor del 24% para limitar la contaminación por micotoxinas, y un contenido de humedad por debajo del 14% se considera obligatorio para un almacenamiento seguro (Giorni *et al.*, 2015).

Sin embargo, el grano de maíz está expuesto a contaminación con una amplia variedad de fitopatógenos y su manejo inadecuado favorece las condiciones para su crecimiento, tal es el caso de los hongos micotoxigénicos (Battilani *et al.*, 2008; Magan y Aldred, 2007; Mylona *et al.*, 2014; Nicolaisen *et al.*, 2008). Los hongos patógenos asociados con el maíz, principalmente cepas toxigénicas de *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium* (Battilani *et al.*, 2008; Giorni *et al.*, 2015), pueden desarrollarse y producir micotoxinas, tales como aflatoxinas, deoxinivalenol y fumonisinas bajo condiciones propicias poscosecha, lo que representa un riesgo de salud importante para humanos y animales domésticos. Por ejemplo, en Estado Unidos, el costo económico debido a estas tres micotoxinas (aflatoxinas, fumonisinas y deoxinivalenol) se estima en USD 900 millones por año. Los efectos en animales después de la ingestión de estos compuestos fúngicos varían, presentándose enfermedad aguda, que se manifiesta con alta morbilidad y muerte a crónica, disminución de la resistencia a patógenos y por lo tanto una reducción considerable en la productividad animal. Sin embargo, el mayor problema asociado con el consumo de micotoxinas no son los episodios de enfermedad aguda, sino más bien, el bajo nivel de micotoxinas ingeridas que pueden causar una serie de trastornos metabólicos, fisiológicos e inmunológicos (Grenier y Applegate, 2013). Esto ha generado la necesidad de la búsqueda de métodos de control de hongos micotoxigénicos en este cereal utilizando métodos físicos, químicos y biológicos o combinaciones de estos (Mylona *et al.*, 2014).

## 2.2 Uso de levaduras en el control de hongos patógenos

Las pérdidas poscosecha, tanto en frutos como granos y semillas, pueden ser bastante significativas si la manipulación, procesamiento y las condiciones de almacenamiento no son las óptimas. Estas pueden llegar a representar hasta un 25% del total de la producción en países industrializados, y más del 50% en países en desarrollo (Liu *et al.*, 2013).

Las especies fúngicas son responsables de la mayoría de las más importantes enfermedades pre y poscosecha (Hernández-Montiel *et al.*, 2010). Muchas especies de *Penicillium* y *Aspergillus* son potencialmente peligrosas para los consumidores, debido a que tienen la capacidad de producir micotoxinas tales como ocratoxinas, patulina, aflatoxinas o ácido ciclopiazónico, estos metabolitos fúngicos han demostrado poseer efectos nefrotóxicos, hepatotóxicos, inmunosupresores, mutagénicos y carcinogénicos (Andrade *et al.*, 2014; Fiori *et al.*, 2014; Núñez *et al.*, 2015; Simoncini *et al.*, 2014; Zhu *et al.*, 2015).

La aplicación de tratamientos químicos es el principal medio de control para estas enfermedades (Lu *et al.*, 2014; Zhou *et al.*, 2014a). Sin embargo el aumento de la preocupación pública por los efectos negativos a la salud y contaminación ambiental asociada a los pesticidas usados en la agricultura, además del desarrollo de resistencia a los fungicidas por parte de los patógenos, ha incrementado la búsqueda de estrategias de control alternativas (Bautista-Rosales *et al.*, 2014; Lahlali *et al.*, 2014; Oro *et al.*, 2014; Zhou *et al.*, 2014b). Esto ha motivado a la investigación enfocada al desarrollo de métodos de control que demuestren ser eficaces y económicamente factibles (Spadaro *et al.*, 2013).

El auge de la biotecnología en los últimos años, ha hecho que el control biológico sea una de las alternativas más estudiadas para el control de enfermedades en plantas, al utilizar microorganismos antagonistas a patógenos, siendo considerada una alternativa viable al uso de productos químicos (Hernández-Montiel *et al.*, 2011).

Son muchos los agentes de control biológico que han sido investigados y aplicados ampliamente contra diferentes hongos patógenos, destacando por su capacidad antagónica bacterias y levaduras. Sin embargo, el uso de levaduras parece ir en aumento debido a que presentan ventajas respecto a los demás antagonistas, como son su rápida colonización y

supervivencia por periodos prolongados en las superficies vegetales. Entre las especies estudiadas más destacadas se encuentran *Rhodotorula glutinis*, *Candida oleophila*, *C. sake*, *Kloeckera apiculata*, *Debaryomyces hansenii*, *Pichia membranifaciens*, *P. anomala*, *P. guillermondii*, *Cryptococcus albidus*, entre otras (Bautista-Rosales *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2013; Nally *et al.*, 2013).

Las levaduras por definición son hongos unicelulares, usualmente de forma ovalada, con estados vegetativos que se reproducen predominantemente por gemación o fisión, dando por resultado un crecimiento unicelular (Rosa y Peter, 2006). Son microorganismos eucariotas ampliamente distribuidos en los entornos naturales, incluyendo la flora microbiana normal de los humanos, en plantas, en partículas suspendidas en el aire, y en muchos otros nichos ecológicos. Las levaduras son importantes en muchos ecosistemas complejos, y frecuentemente son las primeras colonizadoras en sustratos ricos en nutrientes (Hatoum *et al.*, 2012).

Muchas especies de levadura poseen requerimientos nutricionales muy simples, son capaces de colonizar superficies secas durante largos períodos de tiempo y pueden crecer rápidamente en sustratos de bajo costo en biorreactores, características que son relevantes en la selección de agentes para el control biológico (Nally *et al.*, 2012). Además, son el mayor componente de la comunidad microbiana epífita en las superficies vegetales y están muy bien adaptados fenotípicamente a este nicho. Por lo tanto, tienen la capacidad de colonizar efectivamente estas superficies y competir por nutrientes y espacio (Guo *et al.*, 2014).

Son varios los mecanismos de acción que están involucrados en el proceso de control biológico, aunque el papel funcional de la mayoría de ellos aún no ha sido completamente explorado (Armando *et al.*, 2013). Estos mecanismos generalmente se basan en la habilidad del agente biocontrol para adherirse a sitios específicos y establecerse ya sea en el huésped o en células patógenas y competir por espacio y nutrientes, su habilidad para secretar sustancias específicas antimicrobianas, o su habilidad para inducir resistencia (Lu *et al.*, 2013; Lutz *et al.*, 2013).

Calvo-Garrido *et al.* (2014) evaluaron la eficacia de *Candida sake* CPA-1 ( $5 \times 10^7$  células/mL) aplicada junto con un aditivo, contra *Botrytis cinérea* en uvas. Los resultados mostraron una reducción significativa en la severidad de la enfermedad de hasta un 75% a 82% comparada con el control. Los resultados confirman la eficacia de la levadura *Candida sake* para el control de *Botrytis cinérea* en uvas.

En otro trabajo se evaluó la eficacia de tres levaduras antagónicas, *M. pulcherrima* cepa MACH1, *M. pulcherrima* cepa GS9 y *Metschnikowia fructicola* cepa AL27, contra *Penicillium expansum* y la acumulación de patulina en cuatro variedades de manzana. La cepa AL27 fue más efectiva que MACH1 y GS9 en el control de la podredumbre azul y en la reducción de la acumulación de patulina. El efecto de la cepa AL27 fue similar al de los fungicidas químicos normalmente utilizado para estos patógenos. Por otra parte, estudios *in vitro* demostraron que AL27 reduce la germinación de conidios y la longitud del tubo germinativo de *P. expansum* más que las otras cepas (Spadaro *et al.*, 2013).

Oro *et al.* (2014) evaluaron la efectividad como control biológico de *Metschnikowia pulcherrima* Disva 267, *Wickerhamomyces anomalus* Disva 2 y *Saccharomyces cerevisiae* Disva 599, contra *Monilinia laxa*, el hongo causante de la “podredumbre morena” en cerezas, usando tres concentraciones distintas ( $1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$  y  $1 \times 10^8$  células/mL). *M. pulcherrima* redujo significativamente la incidencia y la severidad de la enfermedad en las tres concentraciones, *W. anomalus* fue efectiva a la concentración de  $1 \times 10^7$  células/mL, y *S. cerevisiae* redujo la incidencia de la enfermedad a la concentración de  $1 \times 10^8$  células/mL. *M. pulcherrima* y *W. anomalus* sobrevivieron y colonizaron durante dos semanas las superficies de las cerezas almacenadas en frío, mientras que *S. cerevisiae* no sobrevivió. Estos resultados demuestran que *M. pulcherrima* Disva 267 y *W. anomalus* Disva 2 poseen potencial para su uso como control biológico.

### **2.3 Generalidades de la cabra doméstica**

Entre otras características de la especie, las cabras tienen un marcado carácter lechero, son animales muy selectivos en su alimentación prefiriendo las especies vegetales arbustivas,

además poseen una gran capacidad de aprovechamiento del agua. Los caprinos han contribuido con su carne y leche como fuente de alimentación, y su piel y pelo como vestimenta al desarrollo del ser humano (Cepeda, 2008).

Hoy en día es innegable la relevancia productiva y social de la caprinocultura a nivel mundial, ya que de ella se obtienen productos de alto valor comercial. Los caprinos se crían bajo un amplio rango de condiciones climáticas, sin embargo, la mayor parte de su población (88%) se localiza en Asia y África, principalmente en zonas áridas y semiáridas. En el Norte de México, Noreste de Brasil, las zonas áridas de la India, se presenta una situación similar, lo que ha sugerido que los caprinos son una especie muy adaptada a estos ambientes (Alexandre y Mandonnet, 2005). La cabra criolla tiene un excelente desempeño comparada con otros rumiantes debido a su tamaño reducido, alta eficiencia digestiva, requerimientos metabólicos bajos, capacidad para reducir su metabolismo, eficiencia en la utilización y reciclaje de nitrógeno; también, posee una eficiencia alta de aprovechamiento del agua; y finalmente, su alta capacidad de adaptación a una gran variedad de climas ha permitido su amplia distribución, especialmente en lugares donde no es posible el desarrollo de otras especies de ganado (Silanikove, 2000).

La mayor proporción de los caprinos se crían bajo sistemas de producción extensivos (90-95%), estos sistemas se caracterizan por el uso de razas criollas, instalaciones rústicas, limitado manejo sanitario, limitado manejo reproductivo, y su alimentación se basa en el pastoreo en agostadero (Shinde *et al.*, 2000). Sin embargo, algunos países de la Unión Europea como Francia, España y Grecia, a pesar de no presentar una elevada población de caprinos se ubican en los primeros lugares de producción de leche, debido principalmente al uso de razas especializadas, un alto grado de tecnificación en sus explotaciones, y a los avances tecnológicos que han mostrado en el campo de la nutrición y alimentación animal (FAO, 2014; Cepeda-Palacios, 2008).

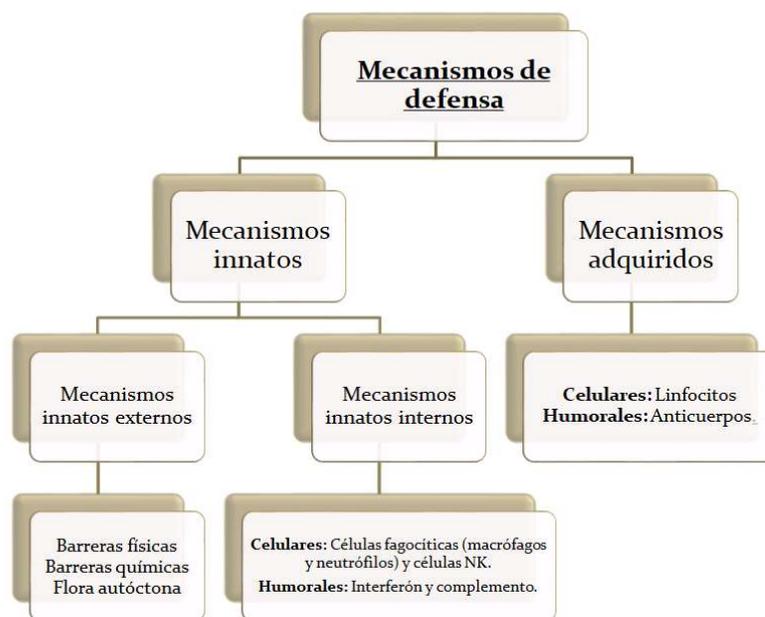
Por otra parte, en nutrición animal generalmente se utilizan aditivos con 3 fines fundamentales: a) mejorar el sabor, consistencia u otras características físicas de la dieta, b) la prevención de ciertas enfermedades, y c) aumentar la eficiencia productiva de los

animales, para lo cual se emplean un amplio rango de aditivos distintos, en esta última categoría se incluyen los agentes promotores del crecimiento, donde los aditivos antibióticos han sido los más utilizados, y aunque el uso de antibióticos como promotores del crecimiento ha contribuido en gran medida a mejorar los rendimientos productivos así como al control de enfermedades en animales de granja, su uso excesivo ha sido un factor importante en el desarrollo de resistencia a los antibióticos y la persistencia de residuos de antibióticos en productos de origen animal. Esto ha conducido a algunos países miembros de la Unión Económica Europea y países asiáticos como Corea del Sur a prohibir el uso de antibióticos como aditivos en las dietas de especies de granja (Fajardo *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2012; Tellez *et al.*, 2012; Yu *et al.*, 2008). Esto ha generado un área activa de investigación para el desarrollo de nuevas tecnologías con efectos similares a los antibióticos pero sin el riesgo que estos representan. En la última década el uso de probióticos e inmunoestimulantes como aditivos en las dietas de animales de granja ha empezado a llamar la atención de la comunidad científica como una alternativa viable para optimizar su composición, reducir el uso de antibióticos, y con ello optimizar también los costos de producción.

#### **2.4 Sistema inmune de caprinos**

Es un sistema biológico complejo que se encuentra distribuido por todos los órganos y fluidos vasculares e intersticiales, excepto el cerebro, se concentra en órganos especializados como la médula ósea, el bazo, el timo, los nódulos linfáticos, entre otros. El sistema inmune es el responsable de conferir inmunidad al actuar de forma coordinada todos sus componentes, por lo tanto, es esencial para la vida, está presente en invertebrados y alcanza su máxima complejidad en los primates y seres humanos (Tizard, 2009). Las células y moléculas que lo componen llegan a la mayor parte de los tejidos por el torrente sanguíneo que pueden abandonar a través de las paredes de los capilares y al que pueden regresar por el sistema linfático. Debido a que la resistencia eficaz a las infecciones es crítica, el organismo no puede depender de un solo mecanismo de defensa, sino que

deben estar disponibles distintos mecanismos para que esta sea efectiva y segura. Algunos actúan a nivel de superficie corporal para rechazar a los invasores, y otros actúan en el interior del organismo para destruir los microorganismos que han superado la defensa exterior (Tizard, 2009). El sistema inmune es capaz de detectar a los agentes infecciosos a través de una familia de proteínas conocidas como receptores similares a Toll o TLR (toll-like receptors) los cuales funcionan como patrones de reconocimiento capaces de unirse a modelos moleculares estructurales específicos presentes en microorganismos bacterianos principalmente, mas no en células de vertebrados (Aderem y Ulevitch, 2000; Check, 2004; Medzhitov, 2001). La respuesta inmune se puede dar a través de dos vías, mecanismos innatos que proporcionan una protección inicial rápida y mecanismos adquiridos o adaptativos que proporcionan una inmunidad eficaz prolongada, debido a que poseen la capacidad de recordar la exposición previa a invasores externos y montar una respuesta más rápida y eficaz durante la exposición posterior al invasor, lo que asegura la supervivencia de un animal frente a un desafío microbiano continuo (Fig. 2) (Tizard, 2009).

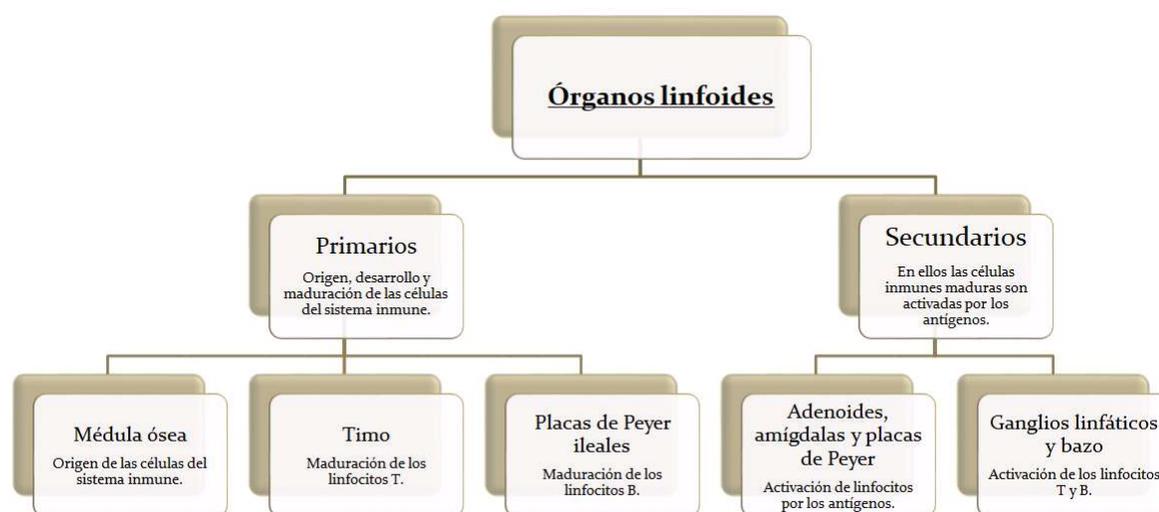


**Figura 2.** Mecanismos de defensa del organismo frente a la infección.

#### 2.4.1 Anatomía y función del sistema inmune

El sistema inmune en pequeños rumiantes está integrado por diferentes órganos linfoides,

que se dividen en primarios y secundarios (Seva *et al.*, 1999). En la mayoría de los mamíferos los órganos linfoides primarios son el timo y la médula ósea, sin embargo, en pequeños rumiantes algunos autores incluyen como órgano linfóide primario a las placas de Peyer ileales por su importante papel en el desarrollo de células B (Landsverk *et al.*, 1991). Los órganos linfoides primarios son de origen ecto-endodérmico y constituyen el lugar más importante de la linfopoyesis. El órgano linfóide primario para linfocitos T en todas las especies es el timo, mientras que para linfocitos B es la médula ósea, la bolsa de Fabricio en aves, y las placas de Peyer ileales en rumiantes (Fig. 3).



**Figura 3.** Función de los órganos linfoides en caprinos.

Los linfocitos B y T migran y colonizan con posterioridad los órganos linfoides secundarios (Abernethy y Hay, 1992; Landsverk *et al.*, 1991; Van Ewijk, 1991). Los órganos linfoides secundarios se originan más tarde que los primarios a partir del mesodermo, persisten durante toda la vida del animal e incluyen nódulos linfáticos, bazo y tejido linfóide asociado a las mucosas. En los órganos secundarios los linfocitos interactúan entre sí y con los antígenos (Ag), extendiendo la respuesta inmunitaria (Tizard, 2009).

#### 2.4.2 Inmunidad innata

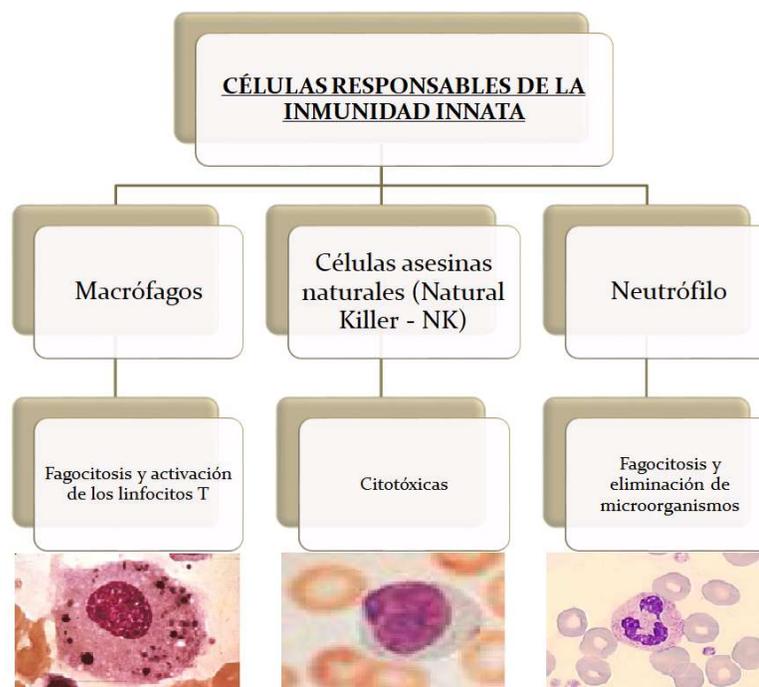
El mundo está lleno de una diversa gama de microorganismos que incluyen bacterias, virus,

hongos, protozoos y helmintos (gusanos). Muchos de estos microorganismos ven el cuerpo animal como una rica fuente de nutrientes y un lugar para refugiarse, por lo tanto, tratarán de invadir los tejidos animales, esto es normalmente prevenido, o por lo menos controlado, por sus mecanismos de defensa. Sin embargo, algunos microorganismos han evolucionado para invadir y proliferar con éxito el cuerpo animal evadiendo su sistema inmune, si estos son capaces de producir enfermedad (virulencia), son llamados patógenos (Tizard, 2009). Las defensas inespecíficas o mecanismos innatos están presentes en el organismo de forma natural y son de dos tipos: unos impiden la entrada del agente invasor (mecanismos innatos externos) y otros lo combaten una vez que ha penetrado (mecanismos innatos internos). Los primeros incluyen a las barreras físicas, como la piel, que gracias a la capa de queratina que sufre continuas descamaciones, evita que penetren o proliferen colonias de microorganismos. Así, sólo los espirilos con su efecto de barrena pueden atravesar las mucosas (Tizard, 2009).

Las barreras químicas, incluye a los orificios naturales tapizados por mucosas que segregan mucus con la finalidad de englobar partículas extrañas para su expulsión. El moco posee además sustancias que engañan a ciertos virus, haciéndoles creer que ya han penetrado dentro de la célula, el virus suelta su ácido nucleico que se pierde en el exterior. Además, estos fluidos contienen sustancias antimicrobianas; por ejemplo la saliva contiene lisozima, el semen espermina, entre otros. Las secreciones de sustancias que modifican el pH dificultan la supervivencia de los gérmenes. Un ejemplo es el HCl del estómago que no tiene una función digestiva sino antimicrobiana (Tizard, 2009). Por último las barreras biológicas, que incluye a los microorganismos presentes de manera natural en ciertas partes del organismo animal, por ejemplo, las bacterias que conforman la flora intestinal que impiden que otros microorganismos se instalen, segregando sustancias o estableciendo competencia por los nutrientes disponibles (Tizard, 2009). En caso de que el agente extraño logre evadir los obstáculos anteriores, intervienen los mecanismos innatos internos (celulares y humorales). La inmunidad innata interna se basa en el hecho de que los microorganismos invasores difieren químicamente de los componentes normales del

cuerpo. Los animales poseen células que pueden reconocer las moléculas comúnmente asociadas con microorganismos invasores y matarlos (Tizard, 2009).

El cuerpo animal puede enfocar sus mecanismos innatos de defensa en sitios de invasión microbiana en un complejo conjunto de reacciones llamadas inflamación. La respuesta inflamatoria es parte de la inmunidad innata y se presenta cuando los tejidos son lesionados por bacterias, traumas, toxinas, calor o cualquier otra causa. En el proceso se libera histamina, bradiquinina, serotonina por el tejido dañado promoviendo la secreción de líquido en los tejidos y la acumulación de células fagocíticas (neutrófilos y macrófagos) con la capacidad de destruir a la mayoría de organismos invasores (Fig. 4), lo que deriva en una inflamación localizada. Esto ayuda a delimitar y aislar la sustancia extraña del contacto con otros tejidos corporales (Tizard, 2009). Las células asesinas naturales (Natural Killer - NK) son células linfoides que provocan la muerte de microorganismos, células infectadas, células tumorales o células ajenas, uniéndose a ellas y secretando perforina, una proteína que como su nombre lo indica, crea agujeros en la membrana de las células atacadas ocasionándoles la muerte, son células citolíticas (Fig. 4) (Tizard, 2009).



**Figura 4.** Células responsables de la inmunidad innata.

El interferón está compuesto por moléculas de naturaleza proteica secretadas por células infectadas por virus, que al ser captadas por las células adyacentes, las estimulan a sintetizar enzimas antivirales evitando la proliferación del virus a través de la inhibición de la replicación del genoma vírico, inhibiendo la síntesis de proteínas o activando a las células NK para destruir a las células infectadas. El Complemento está formado por complejos macromoleculares de proteínas que se sintetizan en el hígado y que circulan por la sangre donde constituyen un 15% de la fracción de inmunoglobulina del suero. Consta de un conjunto de moléculas plasmáticas, cuya función es potenciar la respuesta inflamatoria, facilitar la fagocitosis y dirigir la lisis de células, incluyendo la apoptosis. El complemento es uno de los componentes fundamentales de la respuesta inmunitaria en la defensa ante un agente invasor (Tizard, 2009).

### **2.4.3 Inmunidad adquirida o adaptativa**

Los linfocitos (y otros leucocitos) expresan gran número de moléculas diferentes sobre su superficie, que son denominadas marcadores o antígenos (Ag) de diferenciación, necesarias en el reconocimiento de las distintas poblaciones celulares. El sistema de nomenclatura para denominar a estas moléculas es el de Ag CD (cluster of differentiation). La aplicación de técnicas con utilización de anticuerpos monoclonales (AcMo) produjo un rápido progreso en la definición y caracterización de los Ag de diferenciación leucocitarios en numerosas especies. En los últimos años se ha producido un gran número de AcMo específicos frente a Ag de diferenciación bovinos y ovinos, algunos de los cuales han sido probados, reaccionando frente a linfocitos de sangre periférica y de secciones de órganos linfoides en congelación en cabra (Navarro *et al.*, 1996; Seva *et al.*, 1998; Pallarés *et al.*, 1999). Estos estudios han permitido reconocer las diferentes poblaciones linfocitarias del sistema linfoide caprino, compuesto por linfocitos B y T.

Los linfocitos B son los responsables de la respuesta inmune humoral, origen de las células plasmáticas que son capaces de producir Ac dirigidos frente a Ag específicos, aunque frente a determinados Ag las células B necesitan la ayuda de células T para que se produzca una

respuesta frente a ellos (Szakal *et al.*, 1989). Los linfocitos B maduros expresan Ig en su superficie, aunque son mayoritariamente IgM<sup>+</sup> e IgD<sup>+</sup> pueden aparecer en menores proporciones células IgG<sup>+</sup> e IgE<sup>+</sup> (Venkitaraman *et al.*, 1991), observándose además en mucosas y placas de Peyer una proporción elevada de células IgA<sup>+</sup> (Brandtzaeg y Korsrud, 1984; HogenEsch y Felsburg, 1992). Los linfocitos T son los responsables de la respuesta inmune celular, reaccionan específicamente contra virus y desempeñan un papel auxiliar fundamental en la respuesta frente a infecciones bacterianas (Marrack y Kapler, 1986). Se clasifican en dos grandes grupos de acuerdo a las cadenas heterodímeras presentes en su receptor de células T (TCR) localizado en la superficie de membrana,  $\alpha/\beta$  (TCR-2) o  $\gamma/\delta$  (TCR-1) (Hein y Mackay, 1991; Mackay *et al.*, 1987). Los linfocitos T  $\alpha/\beta$  presentan en su superficie el receptor CD2, molécula que ha sido identificada mediante AcMo en rumiantes (Baldwin *et al.*, 1988; Mackay *et al.*, 1987). Los linfocitos T  $\alpha/\beta$  pueden ser de diferente clase, de acuerdo al marcador de superficie que expresen, CD4 o CD8. El porcentaje de células mononucleares de sangre periférica que expresan el receptor CD4 es el 15-35 % en bovino (Emery *et al.*, 1988) y el 25-40 % en ovino (Seva *et al.*, 1999). Se han descrito dos poblaciones distintas de células T CD4 o cooperadoras (T helper), Th1 y Th2 (Mosmann *et al.*, 1986). Las primeras producen IL-2 e IFN- $\gamma$ , que activan las funciones efectoras citotóxicas de las células T y multiplican la capacidad fagocítica de los macrófagos respectivamente. Son capaces de responder de manera óptima al Ag presentado por macrófagos y desarrollan un importante papel en la vigilancia inmunológica frente a patógenos intracelulares (Mosmann y Coffman, 1989).

La subpoblación Th2 produce IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13 que están implicadas en la activación de las células B y por lo tanto en la inmunidad humoral (Mosmann *et al.*, 1986). El receptor de superficie CD8 se presenta en las células mononucleares de sangre periférica en menor proporción que el receptor CD4 (Emery *et al.*, 1988). Los linfocitos CD8<sup>+</sup> constituyen en bovinos el 14-19 % y en ovinos el 17% de las células mononucleares de sangre (MacHugh y Sopp, 1991). El marcador de superficie CD8 lo presentan las células T que tienen funciones citotóxicas y supresoras (Bierer *et al.*, 1989). El receptor de las células

T g/d (TCR-1) en rumiantes constituye una gran subpoblación dentro de las células T, circulan continuamente entre la sangre, tejidos linfoides, epitelio y linfa. El sistema linfoide de ovejas, terneros y cerdos presenta gran número de células T g/d en contraste con el sistema linfoide humano y de ratón. Su función parece estar relacionada con la protección de superficies epiteliales, presentando un importante papel en la regulación del sistema inmune (Hein y Mackay, 1991; Seva *et al.*, 1999).

## **2.5 Los probióticos en la nutrición animal**

En la última década el uso de probióticos en la alimentación animal empezó a llamar la atención de la comunidad científica, como una alternativa viable como aditivo en las dietas animales para optimizar su composición, minimizar el uso de antibióticos, y disminuir costos de producción (Tabla I). De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS), los probióticos son microorganismos vivos que cuando son suministrados en cantidades adecuadas, promueven beneficios en la salud del organismo hospedero (FAO/WHO, 2006). Los microorganismos probióticos ejercen un efecto benéfico en el rendimiento productivo del hospedero a través de la modificación de la microflora intestinal (Fajardo *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2012; Tellez *et al.*, 2012; Yu *et al.*, 2008). Los mecanismos de acción descritos a través de los cuales los probióticos ejercen su efecto son principalmente por medio de la competencia por los receptores que permiten la adhesión y colonización de la mucosa intestinal, competencia por determinados nutrientes, producción de sustancias antimicrobianas, estimulación de la inmunidad de la mucosa y sistémica del huésped (Caja *et al.*, 2003). En la actualidad, el diseño de alimentos probióticos se ha enfocado en su mayoría al empleo de especies de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* (Bouchard *et al.*, 2013; O'Hara *et al.*, 2006; Patel *et al.*, 2016; Toki *et al.*, 2009), mientras que el uso de levaduras como microorganismos probióticos ha sido más limitado (Gil-Rodríguez *et al.*, 2015).

**Tabla I.** Microorganismos más utilizados como probióticos en los animales y el hombre.

Microorganismos	Género	Especies
<b>Bacterias lácticas no esporuladas (Gram+)</b>	Lactobacilos ( <i>Lactobacillus</i> )	<i>L. acidophilus</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. rhamnosum</i> , <i>L. GG</i> , <i>L. delbrueckii bulgaricus</i> , <i>L. reuteri</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. lactis</i> , <i>L. cellobiosus</i>
	Bífidobacterias ( <i>Bifidobacterium</i> )	<i>B. bifidum</i> , <i>B. longum</i> , <i>B. thermophilus</i> , <i>B. infantis</i> , <i>B. adolescents</i> , <i>B. animalis</i>
	Estreptococos ( <i>Streptococcus</i> )	<i>S. thermophilus</i> , <i>S. lactis</i> , <i>S. cremoris</i> , <i>S. salivarius</i> , <i>S. intermedius</i> , <i>S. leuconostoc</i>
	Enterococos ( <i>Enterococcus</i> )	<i>E. faecali</i> , <i>E. faecium</i>
	Lactococos ( <i>Lactococcus</i> )	<i>L. lactis</i>
	Pediococos ( <i>Pediococcus</i> )	<i>P. acidilactici</i>
	Leuconostoc ( <i>Leuconostoc</i> )	<i>L. mesenteroides</i>
<b>Bacterias lácticas esporuladas (Gram+)</b>	Sporolactobacilos ( <i>Sporolactobacillus</i> )	<i>S. inulinus</i>
<b>Bacterias no lácticas esporuladas</b>	Bacilos ( <i>Bacillus</i> )	<i>B. subtilis</i> , <i>B. coagulans</i> , <i>B. clausii</i> , <i>B. cereus</i> (var. <i>toyoi</i> ), <i>B. licheniformis</i> ,
	Bacterias propiónicas ( <i>Propionibacterium</i> )	<i>P. freudenreichii</i>
<b>Levaduras</b>	Sacaromicetos ( <i>Saccharomyces</i> )	<i>S. cerevisiae</i> <sup>R</sup> , <i>S. Boulardii</i> <sup>R</sup>

Notas: <sup>R</sup> Especial interés en rumiantes (adaptado de Caja *et al.*, 2003)

Sin embargo, más recientemente algunas cepas de levaduras del género *Saccharomyces*, *Debaryomyces*, *Torulaspota*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, y *Candida* han demostrado poseer potencial probiótico debido a su capacidad para sobrevivir al tránsito gastrointestinal, y para adherirse a diferentes células del epitelio intestinal de mamíferos (Generoso *et al.*, 2010; Tiago *et al.*, 2009; Živković *et al.*, 2015). Estas también han expuesto potencial inmunoestimulante debido a que poseen componentes estructurales como  $\beta$ -glucanos (Wilson *et al.*, 2015), manoproteínas (Pietrella *et al.*, 2001), quitina (Brodaczewska *et al.*, 2015), nucleótidos (Waititu *et al.*, 2017) y poliaminas (Reyes-Becerril *et al.*, 2011a) capaces de estimular el sistema inmune mediante la inducción de la activación o incrementando la actividad de cualquiera de sus componentes.

Sotillo-Mesanza *et al.* (2009) añadieron en la dieta de un rebaño caprino un aditivo con la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, con el objetivo de valorar su efecto, concluyendo que el probiótico provocó un aumento del 7% en la producción de leche y un incremento en el porcentaje de grasa de la misma, a su vez aumentó el nivel de urea en leche y mejoró la condición corporal, también se observó un descenso en los valores del recuento de células somáticas, indicativo de un mejor estado sanitario de los animales.

Macedo-Barragán *et al.* (2009) evaluaron el efecto de la adición de un cultivo de levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*) y del tipo de ración sobre el comportamiento productivo y la degradabilidad *in vitro* de corderos en engorda intensiva, observando un incremento en la ganancia diaria de peso, consumo de materia seca y degradación de proteína cruda de los corderos. El desarrollo de trabajos de evaluación del potencial probiótico de levaduras en rumiantes es limitado, sin embargo, se ha demostrado el efecto positivo en el equilibrio de la microbiota ruminal, sobre la homeostasis intestinal, la mejora en la digestión de forraje y la estabilización del pH del rumen (Chaucheyras-Durand *et al.*, 2012).

## **2.6 Uso de inmunoestimulantes**

A finales de la década del 80 comenzaron a emplearse intencionalmente los inmunoestimulantes, sustancias que potencian el sistema inmunitario y que aumentan la

resistencia frente a enfermedades infecciosas (Rondón-Barragán, 2004). Los inmunoestimulantes son agentes profilácticos primarios los cuales pueden ser utilizados con el fin de incrementar la capacidad defensiva general del organismo y no como medicina curativa. Usados en un estado avanzado de la enfermedad pueden ser reconocidos por el organismo como una infección aparente y agravar los síntomas de la enfermedad existente, por lo menos por un corto periodo de tiempo (Rondón-Barragán, 2004). La inmunoterapia comprende los métodos que utilizan principios inmunológicos para prevenir la enfermedad (Rondón-Barragán, 2004). En humanos y medicina veterinaria, ha sido utilizada con el fin de estimular el crecimiento más no con el propósito de estimular los mecanismos de defensa. Muchos inmunoestimulantes son nutrientes habituales de la dieta como polisacáridos, lípidos o proteínas que han de ser suministrados en concentraciones superiores para producir efecto estimulante. Mientras, las vitaminas y minerales pertenecen al grupo de inmunomoduladores (Rondón-Barragán, 2004). Las limitaciones en la aplicación de la inmunoestimulación dependen del estado de desarrollo del sistema inmune, organismo blanco, tipo de inmunoestimulante usado y los procedimientos de administración (inyección intraperitoneal, oral, por inmersión etc.) (Rondón-Barragán, 2004). Es importante considerar la especificidad de los inmunoestimulantes por 2 razones (Rondón-Barragán, 2004), en primer lugar porque una estimulación del sistema inmune puede ser tan intensa, que puede lesionar o dado el caso destruir al hospedero. Esto es bien conocido en humanos, donde la activación causada por el lipopolisacárido bacteriano (LPS) en conjunto con una infección puede causar shock séptico y muerte. En segundo lugar, el conocimiento de las funciones de diferentes inmunoestimulantes puede ser usado para estimular partes del sistema inmune que sean indicadas en determinadas situaciones (especificidad). Entre los tipos de aditivos suministrados en dietas para animales con propiedades inmunoestimulantes se pueden mencionar los siguientes (Newman, 1999; Rondón-Barragán, 2004):

- a) Generadores de inmunidad pasiva (inmunoglobulinas [Ig], proteínas plasmáticas).
- b) Inmunoestimulantes a partir de elementos estructurales (LPS, lipopéptidos,

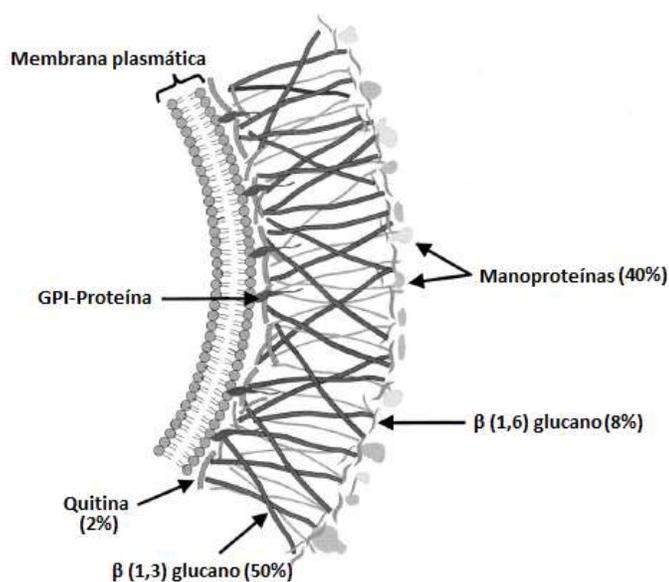
glicoproteínas capsulares, peptidoglucanos y muramilpéptidos) de la pared celular de bacterias, hongos, levaduras y sintéticos.

- c)  $\beta$ -1,3-glucanos de bacterias (Curdlan) y hongos micelares (Krestin, Lentinan, Schizophyllan, Scleoglucan, SSG, Vitastim).
- d)  $\beta$ -1,3/1,6-glucanos de la pared celular de levadura (Macrogard, Betafectina).
- e) Estimuladores de la respuesta inmunitaria (ácidos grasos, vitaminas, carotenoides, fracciones de proteína láctea y algunos microelementos).
- f) Estimuladores del crecimiento de la microflora intestinal benéfica (prebióticos u oligosacáridos).
- g) Bloqueadores de la adhesión de bacterias patógenas a la pared intestinal (derivados de manosa y algunos silicatos).
- h) Probióticos (sección anterior).
- i) Reguladores metabólicos (proteína antisecretora).
- j) Péptidos presentes en extractos de ciertos animales o fabricados por hidrólisis enzimática de proteínas de peces.
- k) Nucleótidos (de ADN bacteriano-CpG).
- l) Favorecedores de un ambiente intestinal adecuado (acidificantes, extractos de algunas plantas, antioxidantes, fungistáticos, enzimas y algunas arcillas).
- m) Algunos productos sintéticos (Bestatin, muramilpéptidos, FK-156, FK-565, Levamisol).

El efecto protector de estos compuestos depende de la enfermedad o patógenos contra los cuales se quiere prevenir y controlar. Así, por ejemplo, el caso de glucano inyectable ha mostrado mayor efectividad para la prevención de infecciones por la bacteria *Aeromona* sp que por *Yersinia* sp. (Robertsen, 1999). Una de las características descritas para la mayoría de los inmunoestimulantes es que su efecto es de corta duración y solo se prolonga por algunas semanas, por lo cual se requiere de una aplicación en forma repetida (Rondón-Barragán, 2004).

Los glucanos son polisacáridos estructurales de la pared de levaduras y hongos así como de algunos cereales, que poseen una potente función inmunoestimulante y consisten en monómeros de glucosa unidos entre sí mediante enlaces glucosídicos  $\beta$ -1,3 y  $\beta$ -1,6 (Fig. 5) (Estrada *et al.*, 1999; Rondón-Barragán, 2004). Además, funcionan como adyuvantes e inmunoestimulantes incrementando las actividades de macrófagos, células T, B y NK (asesinas naturales) (Estrada *et al.*, 1999). Se han probado diferentes preparaciones de glucanos: los  $\alpha$ -glucanos y distintos componentes obtenidas a partir de *Saccharomyces cerevisiae* entre las que destacan el zymosan, el péptido glucano  $\beta$ -1,3 y el VST (Rondón-Barragán, 2004).

Lee *et al.* (2002) evaluaron la respuesta *in vitro* e *in vivo* de los fagocitos (explosión respiratoria) en juveniles de pez lenguado (*Paralichthys olivaceus*) sometidos a una dieta suplementada con hongo *Paelomyces japonica*, mezclado con almidón. Ellos demostraron que este suplemento incrementó la magnitud de la explosión respiratoria. Sin embargo, concentraciones altas y bajas del hongo no tuvieron efectos significativos sobre los fagocitos. Los efectos se debieron a la presencia de polímeros,  $\beta$  (1,3)-D-glucanos.



**Figura 5.** Principales componentes de la pared celular de levaduras y hongos (modificado de Selitrennikoff CP, AEM 2001).

Jorgensen y Robertsen (1995), reportaron que el pre-tratamiento de macrófagos de salmón (*Salmo salar*) con glucanos de levadura puede preparar las células para incrementar la liberación de  $O_2^-$  (anión superóxido). Los  $\beta$ -1,3/1,6-glucanos se unen específicamente a una molécula receptor (Dectina-1) sobre la superficie de los fagocitos (Engstand *et al.*, 1992). El receptor para los  $\beta$ -1,3/1,6-glucanos ha sido conservado durante la evolución y es encontrado en todos los grupos animales desde los invertebrados, tales como el camarón, hasta el hombre (Rondón-Barragán, 2004). Cuando el receptor es acoplado por el  $\beta$ -1,3/1,6-glucano, las células se vuelven más activas en fagocitar, destruir y digerir bacterias y al mismo tiempo secretan citocinas, las cuales estimulan la formación de nuevos leucocitos (Rondón-Barragán, 2004). Los  $\beta$ -glucanos de levadura son conocidos como inmunoestimulantes con una alta capacidad para estimular la oxidasa de la explosión respiratoria de fagocitos de rodaballo (Castro *et al.*, 2004). Además, los  $\beta$ -1,3/1,6-glucanos incrementan la eficacia de las vacunas (Rondón-Barragán, 2004).

Estrada *et al.* (1999) demostró que al utilizar  $\beta$ -glucanos de avena en novillos de carne se incrementaron algunos parámetros inmunes como la proliferación de linfocitos (frente a antígenos específicos, tales como ovoalbúmina), y también que estos modulan las concentraciones de inmunoglobulina G y respuestas específicas relacionadas con esta, posterior a un tratamiento inmunosupresivo con dexametasona (0.1 mg/Kg). Además, demostró los efectos ambiguos *in vitro* en linfocitos bovinos aislados de sangre periférica, reflejados como una estimulación a bajas concentraciones y una respuesta supresiva a concentraciones elevadas. A diferencia del LPS y peptidoglucanos bacterianos, los  $\beta$ -1,3/1,6-glucanos no inducen producción de anticuerpos contra ellos mismos. Esto es una ventaja significativa debido a que el sistema inmune no gastaría energía en producir anticuerpos sobre un inmunoestimulante (Rondón-Barragán, 2004).

Al parecer, cuando son administrados oralmente, los  $\beta$ -1,3 glucanos estimulan receptores de células M dentro de las placas de Peyer en la mucosa intestinal, lo que provee una señal sistémica mediada por citocinas que es desencadenada por el sistema linfático asociado al intestino (GALT) o a mucosas (MALT), que estimula los componentes del sistema inmune

(Rondón-Barragán, 2004). Acevedo *et al.*, (2001), demostraron que la administración oral de  $\beta$ -1-3 glucano particulado en pollos jóvenes estimuló la respuesta inespecífica de células T, mediada por el receptor CD4 en la cual se evidencia una secreción de citocinas con actividad quimiotáctica para células fagocíticas. Los macrófagos peritoneales de ratones alimentados con  $\beta$ -1,3 glucanos doblaron su capacidad fagocítica (Rondón-Barragán, 2004). Por otra parte, la actividad de la lisozima se incrementó por administración intraperitoneal de glucano de levadura (Engstad *et al.*, 1992).

### **2.7 *Debaryomyces hansenii***

El género *Debaryomyces* de la familia Saccharomycetaceae fue aislada en un inicio de ambientes marinos, sin embargo, se ha encontrado en muchos otros hábitats con ambientes muy distintos (queso, carne, vino, cerveza, frutas, suelos, productos con alto contenido de azúcar, etc.). Son haploides, se reproducen vegetativamente por gemación multilateral, débil o nula capacidad de fermentación. Osmotolerante, halotolerante, xerotolerante, posee la capacidad de producir toxinas killer, asimila melobiosa, rafinosa, almidón e inositol (Breuer y Harms, 2006).

*Debaryomyces hansenii* puede considerarse cosmopolita, presenta una alta halotolerancia permitiéndole sobrevivir y reproducirse en ambientes de salinidad extrema (25% de NaCl). Es una levadura que pertenece a los ascomicetos, presenta un estado asexual o imperfecto, sus usos y aplicaciones incluyen la preparación de emulsiones alimenticias, el procesamiento y transformación de compuestos orgánicos aromatizantes, y de productos de interés farmacéutico como el xilitol. Varios autores mencionan su actividad antagónica sobre organismos como *Mucor circinelloides* o *Mucor plumbeus*, *Eurotium echinulatum*, *E. herbaborium*, *E. amstelodami*, o *E. chevalieri*, así como contra *Aspergillus niger*, *Chladosporium herbarum*, *Fusarium*, *Culmorum*, *Glicocladium roseum*, *Penicillium brevicompactum*, *P. corylophilum*, *P. cyclopium*, *P. decumbens*, *P. digitatum*, *P. expansum*, *P. glabrum*, *P. griseofulvum*, *P. janthinellum*, *Phoma glomerata*, *Scopulariopsis brevicaulis*, *Trichoderma koningii*, *Trichotecium roseum* y *Wallemia sebi*. A pesar de que esta levadura

no produce antibióticos, es capaz de inhibir el crecimiento de los patógenos a través de la competencia por nutrientes, producción de enzimas y producción de toxinas *killer* (Hernández-Montiel *et al.*, 2010).

Hernández-Montiel *et al.* (2011) evaluaron el potencial antagónico de cuatro cepas de *D. hansenii*, contra *Geotrichum citri-aurantii* en el fruto del limón mexicano, donde los resultados mostraron que las levaduras fueron eficientes para el control del patógeno en los frutos del limón. En otro trabajo se evaluó la actividad antifúngica de 280 aislados de *D. hansenii* obtenidos de carnes curadas, así como el modo de acción de los aislados más activos contra *Penicillium*. Un 13.9% de los aislados mostró actividad inhibitoria en los ensayos de inhibición radial. También se evaluaron los efectos en el crecimiento de *Penicillium* de los cultivos filtrados libres de células, así como de los compuestos volátiles de los aislados más activos. Los resultados mostraron que la inhibición en el crecimiento del patógeno probablemente sea debido al efecto sinérgico de varios factores, tales como la competencia por espacio y nutrientes y la producción de compuestos solubles o volátiles. Al final, cuatro de los aislados fueron probados en embutidos, dos de los cuales mostraron una reducción significativa en el crecimiento de *Penicillium verrucosum* (hongo ocratoxigénico), por lo tanto el uso de estos dos aislados de *D. hansenii* durante el proceso productivo de estos embutidos pudieran ser una posible herramienta para controlar el crecimiento de estos hongos toxigénicos en la industria de la carne (Núñez *et al.*, 2015). Bedolla-Torres (2009) evaluaron la acción inhibitoria de cepas de *Debaryomyces hansenii*, *Yarrowia lipolytica* y *Candida pseudointermedia*, sobre el crecimiento de hongos patógenos en forraje verde hidropónico (FVH), donde observaron que las levaduras inhiben el crecimiento del hongo hasta en un 80%, recomendándolas como una alternativa para contrarrestar este problema en la producción de FVH. Martínez-Camacho (2016), evaluó el potencial antagónico de *D. hansenii* (DhhBCS003) contra *Aspergillus flavus*, *Salmonella typhimurium* y *Escherichia coli* en cinco especies de microgreens: *Ocimum basilicum*, *Amaranthus cruentus*, *Eruca sativa*, *Brassica oleracea* var. *gemmifera* y *Anethum graveolens*. La aplicación de *D. hansenii* inhibió en un 80% ( $P < 0.05$ ) el crecimiento

bacteriano e inhibió un 70% en la germinación de esporas, exhibiendo a la levadura como un agente de biocontrol de amplio espectro. Por otra parte, también evaluó su funcionalidad como inmunoestimulante en *Gallus gallus domesticus*. Los estudios histomorfológicos arrojaron que la administración de *D. hansenii* no afectó de manera negativa la morfología gastrointestinal del organismo modelo. Para evaluar el papel en los sistemas digestivo e inmune se seleccionaron los genes AMY2A e IL8, respectivamente, y se observó una mayor expresión relativa significativa ( $P < 0.05$ ) de estos genes en tejido de duodeno. Lo anterior sugiere que el suministro de *D. hansenii* presentó un efecto inmunoestimulante en *G. gallus domesticus*.

Reyes-Becerril (2008) evaluó el efecto de la inclusión de la levadura marina *D. hansenii* en la dieta sobre la respuesta inmune de la Cabrilla sardinera y la Dorada, donde los resultados indicaron que la levadura mostro afinidad por el tracto gastrointestinal del pez, estimulo *in vitro* la respuesta inmune innata celular y humoral, y la actividad del sistema antioxidante *in vivo*. Treinta *Sparus aurata* fueron alimentadas con dietas suplementadas con 1.1% de *D. hansenii* cepa L2 ( $1 \times 10^6$  CFU/g) aislada de cítricos, los ensayos inmunológicos revelaron que esta cepa incremento el contenido de peroxidasa, actividad fagocítica, intermediarios reactivos de oxígeno y genes relacionados con la respuesta inmune (Reyes-Becerril *et al.*, 2011b). Angulo *et al.* (2017) evaluaron el potencial de la respuesta inmune antioxidante de *D. hansenii* cepa CBS004 en leucocitos de riñón cefálico y bazo de *Lutjanus peru* retados con *Vibrio parahaemolyticus*, los resultados indicaron que la levadura fue capaz de inhibir la apoptosis causada por *V. parahaemolyticus*, mejoró la capacidad fagocítica de los leucocitos, incremento la actividad de SOD y peroxidasa, así como la producción de ON y ROS.

*D. hansenii* es una levadura aislada de ambientes marinos con propiedades favorables para su producción masiva, como el requerir bajas concentraciones de fuentes de carbono para su crecimiento y desarrollo. Por otro lado, es posible considerar el aprovechamiento de las levaduras marinas en la producción de proteína unicelular para la formulación de dietas e incluso complementos alimenticios para animales de granja y humanos, además ha sido

evaluada por su habilidad para producir poliaminas, adherirse y crecer en el mucus intestinal de peces (Reyes-Becerril, 2008). Por otra parte, *D. hansenii* ha sido incluida en la lista de “Presunción Calificada de Seguridad” (QPS) por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (ESFA), lo que respalda su uso con fines industriales y comerciales.

### **3. JUSTIFICACIÓN**

La mayor parte del maíz que se cultiva en el mundo se destina a la elaboración de alimentos balanceados para la producción animal, sin embargo, durante su almacenamiento el grano de maíz es susceptible al desarrollo de hongos toxigénicos que afectan su calidad, además de representar un riesgo de salud en los animales que lo consumen. Por otra parte, el uso excesivo de antibióticos como aditivos para mejorar los rendimientos productivos y el control de enfermedades en animales de granja, ha contribuido al desarrollo de patógenos resistentes así como la persistencia de residuos de antibióticos en los productos de origen animal. Por ello se vuelve necesaria la búsqueda de alternativas de control de patógenos que además de ser efectivas, económicas y de fácil manejo, presenten características adicionales como propiedades inmunoestimulantes y probióticas que beneficien a las especies que lo consumen, siendo *D. hansenii* por sus antecedentes una buena alternativa para tal fin.

### **4. HIPÓTESIS**

Si *D. hansenii* es un microorganismo antagónico eficiente contra hongos fitopatógenos en una gran variedad de nichos distintos, además de ser un probiótico con actividad inmunoestimulante en diversas especies, entonces, *D. hansenii* actuará como agente de control biológico contra la incidencia de hongos fitopatógenos y el contenido de micotoxinas en el grano de maíz, así como un probiótico e inmunoestimulante para su uso en sistemas de producción caprina.

## 5. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de *D. hansenii* como agente bioprotector contra hongos fitopatógenos en grano de maíz y determinar su potencial probiótico e inmunoestimulante en caprinos.

### 5.1 Objetivos particulares

- Evaluar la capacidad antagónica de *D. hansenii* contra hongos fitopatógenos, sus mecanismos de acción y su efecto sobre la producción de micotoxinas en grano de maíz (*Zea mays* L.).
- Determinar las potenciales propiedades probióticas e inmunoestimulantes de *D. hansenii* en leucocitos de sangre periférica de caprino.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 Evaluación del efecto antagónico de la levadura marina *D. hansenii* contra hongos patógenos, mecanismos de acción, calidad nutricional y producción de micotoxinas en grano de maíz (*Zea mays* L.).

#### 6.1.1 Origen de la levadura

La levadura *D. hansenii* var. *hansenii* (DhhBCS003) utilizada en los bioensayos fue aislada en un inicio de ambientes marinos, y pertenece a la colección de levaduras del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. (CIBNOR) (Hernández-Saavedra, 1990). Esta se reactivó inoculando 100  $\mu$ L del cultivo inicial en 24 mL de medio de cultivo líquido YPD (extracto de levadura 10 g/L, dextrosa 20g/L, peptona 20 g/L) suplementado con antibiótico (cloranfenicol 1  $\mu$ L/mL) y se incubó a 28° C por 24h a 150 rpm (Hernández-Montiel, 2009).

#### 6.1.2 Hongos patógenos

Los hongos fueron tomados directamente de germinados de maíz en su etapa inicial,

producidos en el campo agrícola del CIBNOR, La Paz, B.C.S., de donde se aislaron en cajas de Petri con medio de cultivo Agar Papa-Dextrosa (39g/L, PDA, Difco®) y antibiótico (cloranfenicol 1 µL/mL) para microcultivo, posteriormente las cajas se incubaron a 28° C por 7 días para permitir su crecimiento. Después se tomaron porciones de micelio de los microcultivos para colocarlos en portaobjetos e identificarlos al microscopio, para ello se tomaron en cuenta criterios morfológicos como color y diámetro de hifas; presencia o ausencia de septos en las hifas; presencia de conidióforos libres o agrupados en cuerpos fructíferos (acervulos, esporodoquios, picnidios); tipo y forma de conidióforos; color, forma y tamaño de las esporas. Una vez identificados, se cultivaron en cajas de Petri con medio PDA, para ser mantenidos a 4 °C para su utilización en los bioensayos. Para la identificación molecular se tomaron 50 - 100 mg (3 - 4 asadas) de micelio y el DNA se obtuvo usando el método de Raeder y Broda (1985).

### **6.1.3 Identificación molecular**

Se obtuvieron las regiones ITS1-5.8s-ITS2 del rDNA mediante los iniciadores ITS1 (5' TCCGTAGGTGAACCCTGCGG 3') e ITS4 (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3'), de Sigma-Genosys (EUA). Para llevar a cabo las amplificaciones por PCR se utilizó un termociclador (Thermal Cycler 170-9701 Bio-Rad®), iniciando con un primer periodo de desnaturalización de 2 min a 95 °C, después 30 ciclos (desnaturalización de 1 min a 95 °C, alineamiento a 50 °C por 30 s y una elongación de 2 min a 72 °C), con una elongación final de 10 min a 72 °C. Posteriormente los productos obtenidos de la amplificación fueron separados por electroforesis en gel de agarosa al 1% (SIGMA®), se tiñeron con SYBR® Safe-DNA Gel Stain, se visualizaron en un fotodocumentador (ChemiDoc MP Bio-Rad®) y fueron secuenciados por la compañía GENEWIZ, Inc. La identificación molecular se realizó comparando la secuencia obtenida contra todas las secuencias nucleotídicas de hongos reportadas en la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) (Hernández-Montiel, 2009).

#### **6.1.4 Semilla de maíz**

Para evaluar el efecto antagónico de *D. hansenii* contra hongos patógenos en grano de maíz, se emplearon semillas sanas de maíz criollo, con un tamaño y forma estándar, sin daños por insectos o manchas producidas por hongos.

#### **6.1.5 Postulados de Koch**

Con la finalidad de corroborar que los hongos aislados fueron realmente patógenos en semillas de maíz, se realizaron los postulados de Koch, los cuales indican que para demostrar que un determinado organismo causa una enfermedad específica, es esencial que después de su aislamiento en cultivo puro, se re-inocule al mismo hospedero y sea capaz de iniciar la misma enfermedad por la que fue aislado, finalmente se tendrá que recuperar íntegro del hospedero enfermo.

#### **6.1.6 Prueba de patogenicidad**

Un lote de semillas de maíz criollo seleccionadas por uniformidad en tamaño y forma, así como por ausencia de defectos, se desinfectó con cal (2 g/L) durante 24 h, posteriormente el exceso de cal se eliminó enjuagando con agua destilada, después las semillas se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 10% durante 10 minutos en agitación constante, posteriormente se eliminó el exceso de hipoclorito de sodio enjuagando con agua destilada estéril. Las semillas higienizadas fueron inmersas durante 30 minutos en la suspensión de esporas ( $1 \times 10^4$  esporas /mL) de los cuatro aislados, usando agua destilada estéril como control. Las semillas se colocaron al azar en cajas de Petri (20 semillas/caja), las cuales fueron incubadas a  $25 \pm 1$  °C durante siete días y una humedad relativa de 65%-70%. Al final se observó la incidencia de la enfermedad causada por los hongos (Hernández-Montiel, 2009).

#### **6.1.7 Ensayo de inhibición radial de hongos patógenos de maíz en medio sólido**

El potencial antagónico de *D. hansenii* para inhibir el crecimiento fúngico de cuatro cepas

de hongos patógenos de maíz se determinó por un ensayo de inhibición radial en medio sólido de acuerdo a la metodología descrita por Núñez *et al.* (2015) usando medio PDA (39 g/L, Difco®). Cien microlitros de una suspensión de *D. hansenii* ajustada a una concentración de  $1 \times 10^8$  células/mL fueron inoculados en las placas con PDA, después de secarse, se inocularon 10  $\mu$ L de las suspensiones de cada hongo en el centro de cada placa ajustadas a una concentración de  $1 \times 10^6$  esporas/mL. Posteriormente se incubaron por siete días a 28° C, el crecimiento fúngico fue calculado midiendo el diámetro de cada colonia. La inhibición radial fue calculada utilizando la siguiente fórmula:

$$RI (\%) = \frac{C-T}{C} \times 100 \quad (1)$$

Donde C (control) fue el diámetro promedio de las colonias fúngicas en ausencia de *D. hansenii*, y T (tratamiento) fue el diámetro promedio de las colonias fúngicas en las placas co-cultivadas. El experimento se realizó por triplicado.

#### **6.1.8 Efecto de compuestos difusibles en agar de *D. hansenii* sobre el crecimiento de hongos patógenos en medio sólido**

Se prepararon cajas de Petri conteniendo medio PDA (39 g/L) adicionado con 1  $\mu$ L/mL cloranfenicol (50 mg/mL de alcohol al 70%). Después la levadura previamente reactivada (100  $\mu$ L en 24 mL de medio líquido YPD a 28 °C durante 24 h a 150 rpm) se ajustó a una concentración de  $1 \times 10^8$  células/mL utilizando una cámara de Neubauer (40x). Un disco micelial de 5 mm de cada aislado con 5 días de crecimiento a 28 °C en PDA, fue colocado a 2.5 cm del borde de las placas, y al lado opuesto a tres centímetros se inocularon 10  $\mu$ L de la suspensión con levadura. Las placas fueron selladas con parafilm e incubadas a 28 °C durante 7 días. Se midió el diámetro de los hongos el día 7. Cajas de Petri inoculadas solo con los hongos (sin levadura) fueron usadas como control. La actividad inhibitoria (AI) se expresó como el porcentaje del diámetro promedio de los hongos co-cultivados con *D. hansenii* comparado con los controles sin levadura, de la siguiente manera:

$$AI (\%) = \frac{C-T}{C} \times 100 \quad (2)$$

Donde C se refiere al diámetro promedio de las colonias incubadas como tratamiento

control sin levadura, y T (tratamiento) se refiere al diámetro promedio de las colonias co-cultivadas con la levadura. El ensayo se realizó por triplicado (Huang *et al.*, 2012; Lutz *et al.*, 2013; Matic *et al.*, 2014; Núñez *et al.*, 2015).

#### **6.1.9 Efecto antifúngico de compuestos volátiles producidos por *D. hansenii***

Se determinó el efecto antagónico de compuestos volátiles generados por *D. hansenii*, de acuerdo al método de cultivo “boca a boca” utilizando placas con medio PDA y unidas con parafilm (Lillbro, 2005). La placa superior fue inoculada colocando en el centro un disco micelial de 5 mm de diámetro de cada hongo aislado (con cinco días de crecimiento a 28 °C). En la placa inferior se sembraron por dispersión 100 µL de la suspensión celular de *D. hansenii* a una concentración de  $1 \times 10^8$  células/mL. Posteriormente las placas se colocaron boca a boca y fueron selladas con parafilm, para después incubarlas a 28 °C durante 7 días, el experimento se realizó por triplicado. Placas inoculadas con los aislados fúngicos sin levadura fueron utilizadas como control. La actividad inhibitoria se determinó midiendo el diámetro de las colonias el día 7 y aplicando la fórmula descrita en la sección anterior (Lutz *et al.*, 2013; Núñez *et al.*, 2015).

#### **6.1.10 Efecto del sobrenadante libre de células de *D. hansenii* sobre el crecimiento de hongos patógenos de maíz**

*D. hansenii* fue incubada en medio líquido YPD por 72 h a 28 °C, después el cultivo fue centrifugado a 3,000 xg durante 10 minutos, el sobrenadante fue después esterilizado por filtración (filtros de 0.22 µm). Después 50 µL del sobrenadante libre de células fueron cargados en tres sitios alrededor de un disco micelial de 5 mm de diámetro de cada aislado, previamente inoculados en el centro de cajas de Petri con medio PDA, por triplicado. Las placas fueron incubadas a 28 °C durante siete días. El crecimiento micelial se midió el día 7. Se aplicó la fórmula descrita con anterioridad para determinar la actividad inhibitoria (Andrade *et al.*, 2014).

#### **6.1.11 Efecto antagónico de *D. hansenii* contra hongos patógenos en grano de maíz**

Con la finalidad de evaluar el efecto antagónico de la levadura *Debaryomyces hansenii* sobre cuatro hongos patógenos aislados de germinados de maíz, un lote de semillas de maíz criollo seleccionadas por uniformidad en tamaño y forma, así como por ausencia de defectos, fue desinfectado con hidróxido de calcio (2 g/L) durante 24 h, posteriormente el exceso de hidróxido de calcio se eliminó enjuagando con agua corriente, después las semillas se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 10% durante 10 minutos en agitación constante, posteriormente se eliminó el exceso de hipoclorito de sodio enjuagando con agua destilada estéril. Las semillas estériles fueron inmersas durante 30 minutos en una suspensión de levadura previamente reactivada en medio líquido YPD (extracto de levadura 10g, dextrosa 20g, peptona 20g) ajustada a una concentración de  $1 \times 10^8$  células/mL. Después las semillas se dejaron secar por 10 minutos antes de sumergirlas durante 30 minutos en una suspensión de esporas ajustadas a  $1 \times 10^6$  esporas/mL, usando como control NaCl al 0.9%. Posterior a la inoculación, las semillas se colocaron al azar en cajas de Petri (20 semillas/caja), las cuales fueron incubadas a  $25 \pm 1$  °C en ausencia de luz durante siete días y una humedad relativa de 65-70%, utilizando dos tratamientos, el primero con aplicación diaria de la suspensión con levaduras, y el segundo con aplicación intercalada. Se evaluó diariamente el número de granos afectados, así como el crecimiento micelial y la incidencia de la enfermedad. Se realizaron tres repeticiones por cada tratamiento. Finalizado el ensayo se tomaron micrografías mediante microscopía electrónica de la superficie de los granos de maíz para corroborar el establecimiento de la levadura (Fiori *et al.*, 2014).

#### **6.1.12 Efecto de *D. hansenii* sobre la producción de fumonisinas en grano de maíz**

Una vez finalizado los ensayos de antagonismo en el grano de maíz, se determinó el contenido de fumonisinas por LC-MS/MS similar a como lo describió Mylona *et al.* (2014), utilizando AcN:H<sub>2</sub>O:Ácido acético (79:20:1) como solvente de extracción. Se añadió un gramo de cada tratamiento a tubos Falcon conteniendo 4 mL del solvente de extracción, y

se incubaron durante 24 h en un agitador (150 rpm) a 25 °C en condiciones de obscuridad. Los extractos fueron filtrados utilizando filtros (Minisart, Sartorius) de 0.22 µm en tubos nuevos. Finalmente las muestras fueron analizadas por Cromatografía Líquida – Espectrometría de Masas (LC – MS/MS).

## 6.2 Determinación de las potenciales propiedades probióticas e inmunoestimulantes de *D. hansenii* en leucocitos de sangre periférica de caprino.

Convencionalmente se utilizan un conjunto de criterios para seleccionar potenciales microorganismos probióticos. Los cuales incluyen una serie de pruebas de tolerancia a condiciones gastrointestinales, como la acidez y sales biliares, así como su capacidad de adherirse a la mucosa intestinal y de ese modo colonizar el intestino, estos criterios han sido considerados como requisitos previos (Trotta *et al.*, 2012).

### 6.2.1 Origen de las levaduras

Las cepas de *Debaryomyces hansenii* que fueron evaluadas en este trabajo provinieron de la colección de levaduras aisladas de ambientes marinos (Tabla II) pertenecientes al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. (CIBNOR) (Hernández-Saavedra, 1990).

**Tabla II.** Colección de levaduras aisladas del Golfo de California pertenecientes al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. (CIBNOR).

Levadura	Clave	Origen	Estación de muestreo	Profundidad de colecta
<i>Debaryomyces hansenii</i> var. <i>hansenii</i>	DhhBCS001	Marino	125.4	0 m
<i>Debaryomyces hansenii</i> var. <i>hansenii</i>	DhhBCS002	Marino	125.4	100 m
<i>Debaryomyces hansenii</i> var. <i>hansenii</i>	DhhBCS003	Marino	125.4	100 m
<i>Debaryomyces hansenii</i> var. <i>hansenii</i>	DhhBCS004	Marino	130.3	0 m
<i>Debaryomyces hansenii</i> var. <i>hansenii</i>	DhhBCS005	Marino	138.5	0 m
<i>Debaryomyces hansenii</i> var. <i>hansenii</i>	DhhBCS006	Marino	127.5	50 m
<i>Debaryomyces hansenii</i> var. <i>hansenii</i>	DhhBCS007	Marino	135.3	50 m

## 6.2.2 Tamizaje *in vitro* de las levaduras seleccionadas como candidatas para su uso como probióticos

Las levaduras seleccionadas fueron caracterizadas por su tolerancia a pH ácido y sales biliares, y adhesión al tracto gastrointestinal. Todas las suspensiones de levadura empleadas como inóculos fueron preparadas a partir de cultivos reactivados en caldo YPD a 28 °C durante 24 h y 150 rpm.

### 6.2.2.1 Tolerancia a pH ácido

Se evaluó la capacidad de las levaduras para sobrevivir en condiciones ácidas. Se resuspendieron 100 µL de cada suspensión de levadura ( $1 \times 10^8$  células/mL) en 4 mL de caldo YPD ajustado a un pH de 2.0, 2.5, 3.0 y 6.5 usando HCl 2M. Las suspensiones fueron incubadas a 28 °C y 150 rpm. Después de 24 h se añadieron 200 µL de cada cultivo a una placa de 96 pozos, y se midió la absorbancia en un lector de microplaca a 540 nm (García-Hernández *et al.*, 2012). El test se realizó por triplicado y el índice de crecimiento (%) se calculó empleando la siguiente fórmula:

$$IC (\%) = \frac{AbsTrat}{AbsCont} \times 100 \quad (3)$$

### 6.2.2.2 Tolerancia a sales biliares

Las suspensiones se ajustaron a una concentración de  $1 \times 10^8$  células/mL en PBS. Éstas fueron diluidas en forma seriada e inoculadas en placas con YPD agar conteniendo 0%, 0.3%, 0.6% y 0.9% (w/v) de sales biliares. La supervivencia (S) se determinó por conteo de unidades formadoras de colonia (UFC) para cada tratamiento después de 24 h de incubación a 28 °C (García-Hernández *et al.*, 2012). El ensayo se realizó por triplicado y la supervivencia (%) se calculó aplicando la siguiente fórmula:

$$S (\%) = \frac{ufc/mLTrat}{ufc/mLCont} \times 100 \quad (4)$$

### **6.2.2.3 Ensayo de adhesión al tracto gastrointestinal**

Las levaduras se prepararon en PBS (10 mL) y fueron ajustadas a una concentración de  $1 \times 10^8$  células/mL, posteriormente se marcaron con 2 mg de DTAF [5-(4, 6-diclorotriazinil) aminofluoresceína], y fueron incubadas a 28 °C durante 2h. Segmentos de intestino de caprino fueron colocadas en buffer fosfato, después se añadieron las levaduras marcadas, y se incubaron a 28 °C/60min, después se lavaron con PBS para retirar las levaduras que no se adhirieron, y la adhesión de la levadura a los epitelios fue verificada por microscopía de fluorescencia con el software Image Pro Plus v. 4.5.0.19 (Reyes-Becerril, 2008).

## **6.2.3 Ensayos inmunológicos**

### **6.2.3.1 Preparación de lisados celulares**

Las levaduras se reactivaron inoculando 1-3 asadas de los cultivos iniciales en 24 mL de medio de cultivo líquido YPD (extracto de levadura 10 g/L, dextrosa 20g/L, peptona 20 g/L) suplementado con antibiótico (cloranfenicol 0.05%) y se incubaron a 28 °C por 48 h y a 150 rpm (Hernández-Montiel, 2009). A continuación las suspensiones de las levaduras se ajustaron a una concentración de  $1 \times 10^8$  células/mL para posteriormente someterlas a sonicación (3 minutos a 90% de amplitud x 2). Después estas fueron centrifugadas a 800 x g por 20 min a 4 °C, y los sobrenadantes fueron tomados como lisados celulares para los bioensayos (Liu *et al.*, 2016).

### **6.2.3.2 Extracción de $\beta$ -glucanos**

Se obtuvo biomasa de levadura inoculando 100  $\mu$ L de los cultivos reactivados en 2000 mL de medio de cultivo líquido YPD suplementado con antibiótico (cloranfenicol 1  $\mu$ L/mL) y se incubaron a 28 °C por 48-72 h y 150 rpm. Posteriormente los cultivos fueron centrifugados a 4,950 x g por 15 min a 4 °C para cosechar la biomasa. Los glucanos fueron extraídos de la biomasa seca (liofilizada por 24 a 48 h) de las levaduras siguiendo la metodología de Williams *et al.* (1991) con ligeras modificaciones. 2 g de biomasa seca de levadura

suspendidos en 40 mL de 3% NaOH fueron mantenidos a 100 °C durante 3 h y posteriormente a temperatura ambiente durante la noche. La suspensión fue centrifugada a 12,700 x g durante 15 min para coleccionar el residuo insoluble, este se resuspendió en 3% NaOH y se repitió el procedimiento (2x). El residuo se resuspendió en 40 mL de 0.5 N de ácido acético, se calentó a 75 °C durante 6 h y fue separado por centrifugación. Después la fracción insoluble se resuspendió en etanol, se llevó a ebullición y fue centrifugada a 12,700 x g para coleccionar el residuo, este paso se repitió tres veces. Después el residuo se lavó a fondo con agua destilada, fue liofilizado por 48 h y el producto final ( $\beta$ -glucanos) fue usado para los ensayos (Wilson *et al.*, 2015).

### **6.2.3.3 Caracterización estructural de $\beta$ -glucanos**

Los datos fueron tomados en un espectrómetro Bruker Avance 600 Mhz usando una criosonda 1H/13C715N operando a 345 K (72 °C). Fueron disueltos 10-25 mg de cada  $\beta$ -glucano en 1 ml de DMSO-d<sub>6</sub> a 80 °C. Se añadieron algunas gotas de ácido trifluoroacético (99.8% deuterado, Cambridge Isotope Laboratories) a la solución para desplazar el agua y las resonancias de protones hidroxilo campo abajo. Los cambios químicos en NMR fueron referenciados para la resonancia de protones multiplex DMSO-d<sub>6</sub> residual a 2.50 ppm. La colección espectral de NMR y los parámetros de procesamiento fueron los siguientes: 25 ppm de ancho espectral centrado en 5.0 ppm, 32,768 puntos de datos, 15 s de retraso de relajación, 32 escaneos, y 0.2 Hz de apodización exponencial. La espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (NMR) fue utilizada como una técnica de diagnóstico rápida y confiable para identificar los polisacáridos de interés (Wilson *et al.*, 2015).

### **6.2.3.4 Aislamiento de leucocitos de sangre periférica de caprino**

Para los ensayos de inmunoestimulación *in vitro* se obtuvieron muestras de sangre periférica de caprino en tubos BD Vacutainer® con heparina sódica para separar leucocitos bajo condiciones estériles. La sangre fue diluida con PBS (1:1 v/v), se añadió esta mezcla (2 mL) a tubos tipo Falcon de 15 mL conteniendo 1 mL de Histopaque®-1077 (Sigma; St. Louis,

MO), este fue centrifugado a 450 x g durante 20 min a 10 °C. Posteriormente los leucocitos se recuperaron con una pipeta Pasteur y se colocaron en otro tubo Falcon para ser lavados con 2 mL de PBS, después fueron centrifugados a 450 x g durante 20 min a 10 °C, se decantó el sobrenadante, y para los bioensayos se ajustó la suspensión celular a una concentración aproximada de  $1 \times 10^6$  células/mL en RPMI 1640 suplementado con suero fetal bovino, antes de cada ensayo se determinó su viabilidad por exclusión con azul de tripano empleando el Automated Cell Counter - TC20 (Reyes-Becerril *et al.*, 2016).

### **6.2.3.5 Estimulación de leucocitos**

Un mililitro de leucocitos de sangre periférica de caprino fue colocado en pocillos de placas de microtitulación de 24 pocillos de fondo plano (Nunc) conteniendo  $1 \times 10^6$  células/ml en cada pocillo. Se emplearon dos tratamientos, en el primero los leucocitos fueron estimulados con 125  $\mu$ L de  $\beta$ -glucanos (200  $\mu$ g/mL), y en el segundo tratamiento fueron estimulados con 125  $\mu$ L de los lisados celulares de cada levadura, se incubaron durante 24 h a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub>. Los tratamientos control consistieron en leucocitos incubados en el medio de cultivo más 125  $\mu$ L de PBS como control negativo, y 125  $\mu$ L de zymosan A de *Saccharomyces cerevisiae* (SIGMA, Z4250, 200  $\mu$ g/mL) como control positivo (Angulo *et al.*, 2017; Reyes-Becerril *et al.*, 2017; Sonck *et al.*, 2010).

### **6.2.3.6 Ensayo de viabilidad celular de leucocitos**

Se empleó el ensayo de reducción de resazurina para determinar el efecto de los tratamientos sobre la viabilidad de los leucocitos de sangre periférica de caprino de acuerdo a Riss *et al.* (2016) con ligeras modificaciones. Se añadieron 100  $\mu$ L/pozo de leucocitos ( $1 \times 10^6$  células/mL) inmunoestimulados con  $\beta$ -glucanos y lisados de levadura (una hora a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub>) a placas de 96 pozos con 20  $\mu$ L de resazurina y fueron incubados nuevamente durante 24 h a 37 °C. Se verificó la fluorescencia en un lector de microplacas multimodo Varioskan™ LUX a 560 nm. Leucocitos de sangre periférica sin  $\beta$ -glucanos o lisados de levadura y leucocitos de sangre periférica incubados con DMSO fueron usados

como controles de viabilidad negativo y positivo, respectivamente. El ensayo se realizó por triplicado y la viabilidad (%) se calculó usando la siguiente fórmula:

$$\text{Viabilidad (\%)} = \frac{\text{AbsTrat}}{\text{AbsCont-}} \times 100 \quad (5)$$

#### **6.2.3.7 Evaluación de la actividad fagocítica de leucocitos de caprino**

La fagocitosis de *S. cerevisiae* (cepa S288C) por los leucocitos de sangre periférica de caprino tratados con los lisados celulares y los glucanos de los aislados seleccionados se evaluó por citometría de flujo (Rodríguez *et al.*, 2003). Para marcar las células de levadura liofilizada muertas por calor se añadieron 5 µg/mL de isotiocianato de fluoresceína (FITC, Sigma) y fueron incubadas en un agitador (IUL, 40 ciclos/min) a 22 °C en oscuridad durante 15 minutos. Después las células de levadura se lavaron con PBS y se ajustaron a una concentración de  $5 \times 10^7$  células/mL en medio RPMI. Después de la estimulación, los leucocitos fueron lavados y se añadieron 60 µL de la levadura marcada, se mezcló, se centrifugó (400 x g, 5 min, 37 °C), se resuspendieron en medio RPMI y se incubaron a 22 °C durante 30 min. Al final del tiempo de incubación, las muestras se colocaron en hielo y se añadieron 400 µL de PBS frío para detener la fagocitosis. La fluorescencia de las levaduras no fagocitadas fue inactivada mediante la adición de 40 µL de azul de tripano a 4 °C (0.4 % PBS). Muestras de referencia de *S. cerevisiae* marcadas con FITC o leucocitos fueron incluidos en cada ensayo de fagocitosis. Todas las muestras se analizaron en un citómetro de flujo. La capacidad fagocítica se definió como la intensidad media de fluorescencia (Angulo *et al.*, 2017). El ensayo se realizó por triplicado.

#### **6.2.4 Actividades enzimáticas antioxidantes y respuestas al estrés oxidativo y nitrosativo**

##### **6.2.4.1 Explosión respiratoria de leucocitos de sangre periférica de caprino**

La generación de especies reactivas de oxígeno en los leucocitos estimulados con β-glucanos y los lisados de las levaduras se determinó empleando el ensayo de reducción de

nitroblue tetrazolium (NBT) de acuerdo a Kemenade *et al.* (1994). Se tomaron 100  $\mu$ L de cada tratamiento por triplicado y se colocaron en tubos de 1.5 mL. Las muestras fueron centrifugadas a 1000 x g durante un minuto a temperatura ambiente, se descartó el sobrenadante, posteriormente se resuspendió en una solución de NBT (1 mg/mL) y se incubaron en oscuridad durante dos horas a temperatura ambiente. Después se eliminó la solución NBT centrifugando las muestras y decantando, se añadieron 100  $\mu$ L de metanol al 70% y se incubaron durante 10 minutos. Se eliminó el alcohol por centrifugación y se añadieron 120  $\mu$ L de hidróxido de potasio 2M y 140  $\mu$ L de DMSO. Se tomaron 200  $\mu$ L y se colocaron en las placas de 96 pozos para leer la densidad óptica en el espectrofotómetro de microplacas a 655 nm (Patel *et al.*, 2016).

#### **6.2.4.2 Ensayo de producción de óxido nítrico (ON) de leucocitos de caprino**

La producción de óxido nítrico (ON) en leucocitos inmunoestimulados se determinó de acuerdo a Neumann *et al.* (1995). Una vez transcurrido el periodo de incubación (24 h) se determinó el contenido de nitritos en todos los cultivos celulares tratados con  $\beta$ -glucanos y los lisados de las levaduras y se tomó como una medida de la producción de ON, debido a que ésta es una molécula muy inestable y se degrada a nitrito y nitrato. Se añadieron 100  $\mu$ L de cada tratamiento por triplicado a una placa de 96 pozos, se adicionaron 100  $\mu$ L de reactivo de Griess (sulfanilamida al 1% / 0,1% naftalendiamina / 2,5% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) fueron incubados durante 15 min en total oscuridad a temperatura ambiente. Posteriormente se leyó la densidad óptica a 490 nm usando un espectrofotómetro de microplacas. Con la ayuda de una curva de calibración de nitritos se convirtió la absorbancia a concentración de nitritos. La concentración de nitritos en cada tratamiento fue representado como micromoles (Angulo *et al.*, 2017; Chang *et al.*, 2015; Patel *et al.*, 2016).

#### **6.2.4.3 Superóxido dismutasa y catalasa en leucocitos de caprino**

La actividad de SOD en los leucocitos estimulados con  $\beta$ -glucanos y los lisados de las levaduras se determinó por el porcentaje de velocidad de inhibición de la reacción de la

enzima con WST-1 (water soluble tetrazolium dye) sustrato y xantina oxidasa usando un kit de ensayo SOD (Sigma, 19160) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Cada ensayo de punto final fue monitoreado a 450 nm, que es la longitud de onda de absorbancia para el producto teñido de la reacción WST-1 con superóxido. Las lecturas fueron tomadas después de 20 minutos de tiempo de reacción a 37 °C, en el espectrofotómetro de microplacas a 450 nm. El porcentaje de inhibición se normalizó en mg de proteína y se presentó como unidades de actividad SOD (Reyes-Becerril *et al.*, 2016; Angulo *et al.*, 2017). La actividad catalasa (CAT) se determinó mediante el método de Clairbone (1985), siguiendo la disminución de la absorbancia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 655 nm. Una unidad de actividad enzimática se define como la cantidad de enzima requerida para degradar 1 mmol de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en un minuto y es expresada como U/mg de proteína (Cárdenas-Reyna *et al.*, 2016).

#### **6.2.4.4 Actividad de mieloperoxidasa (MPO) en leucocitos de caprino**

Se midió la actividad de mieloperoxidasa total (MPO) en los leucocitos de sangre periférica caprina tratados con  $\beta$ -glucanos y los lisados de las levaduras de acuerdo a Quade y Roth (1997) con ligeras modificaciones. Se colocaron 20  $\mu$ L de cada tratamiento por triplicado a una placa de 96 pozos y se añadieron 100  $\mu$ L de la solución de trabajo con TMB (40 mL H<sub>2</sub>O destilada, 10  $\mu$ L de peróxido de hidrógeno al 30%, 1 pastilla de TMB). La solución TMB es sustrato de MPO y fue preparada el mismo día. La reacción colorimétrica fue detenida después de dos minutos añadiendo 50  $\mu$ L de ácido sulfúrico 2M y se leyó la densidad óptica en espectrofotómetro de microplacas a 450 nm (Reyes-Becerril *et al.*, 2016; Angulo *et al.*, 2017).

### **6.3 Análisis estadístico**

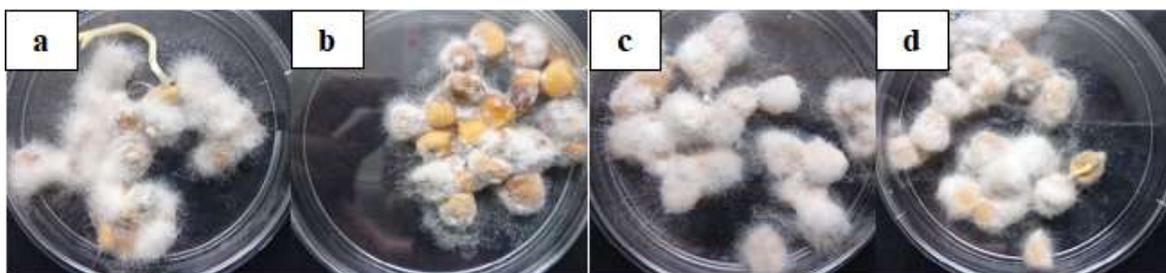
Todos los análisis estadísticos de los experimentos se llevaron a cabo usando el paquete estadístico SigmaPlot (Versión 12.0). Los datos fueron analizados mediante análisis de varianza de una vía. La comparación de medias se realizó con la prueba de Tukey. Una  $P \leq 0.05$  fue tomada como significancia estadística.

## 7. RESULTADOS

### 7.1 Evaluación del efecto antagónico de la levadura marina *D. hansenii* contra hongos patógenos, mecanismos de acción, calidad nutricional y producción de micotoxinas en grano de maíz (*Zea mays* L.).

#### 7.1.1 Prueba de patogenicidad de los aislados en semillas de maíz

Todos los aislados infectaron el 100% de los granos de maíz incubados a  $25 \pm 1$  °C durante siete días y una humedad relativa de 65-70%, nuevamente estos fueron re-aislados *in vitro* (Fig. 6), los cuales presentaron las mismas características morfológicas y de microscopia, confirmando los postulados de Koch.

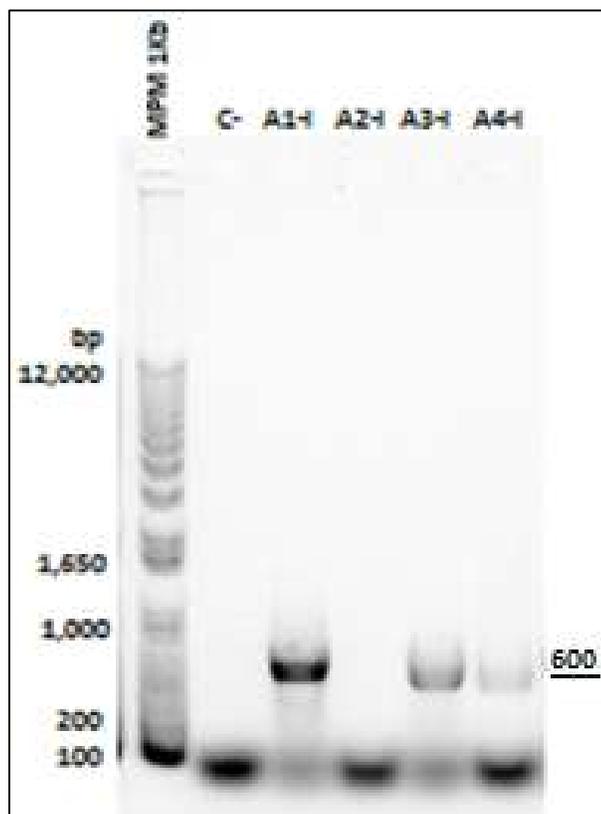


**Figura 6.** Prueba de patogenicidad en granos de maíz inoculados con los cuatro aislados de germinados de maíz. (a) *Mucor circinelloides*, (b) *Aspergillus* sp, (c) *Fusarium proliferatum*, (d) *Fusarium subglutinans*.

#### 7.1.2 Identificación de los hongos aislados de maíz

Los productos obtenidos por PCR fueron provenientes del ADN ribosomal (región ITS1-5.8s-ITS2) de los cuatro aislados (Fig. 7). Después de los análisis comparativos de las secuencias obtenidas con la base de datos del banco genómico del Centro Nacional de Información Biotecnológica (National Center for Biotechnology Information-NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) de los Estados Unidos Americanos, permitió la identificación de las especies *Mucor circinelloides* (aislado 1, con un tamaño de 580 pb), *Fusarium proliferatum* (aislado 3, con un tamaño de 512 pb) y *Fusarium subglutinans* (aislado 4, con un tamaño de 500 pb), al presentar una similitud del 99% en los 3 aislados con otras

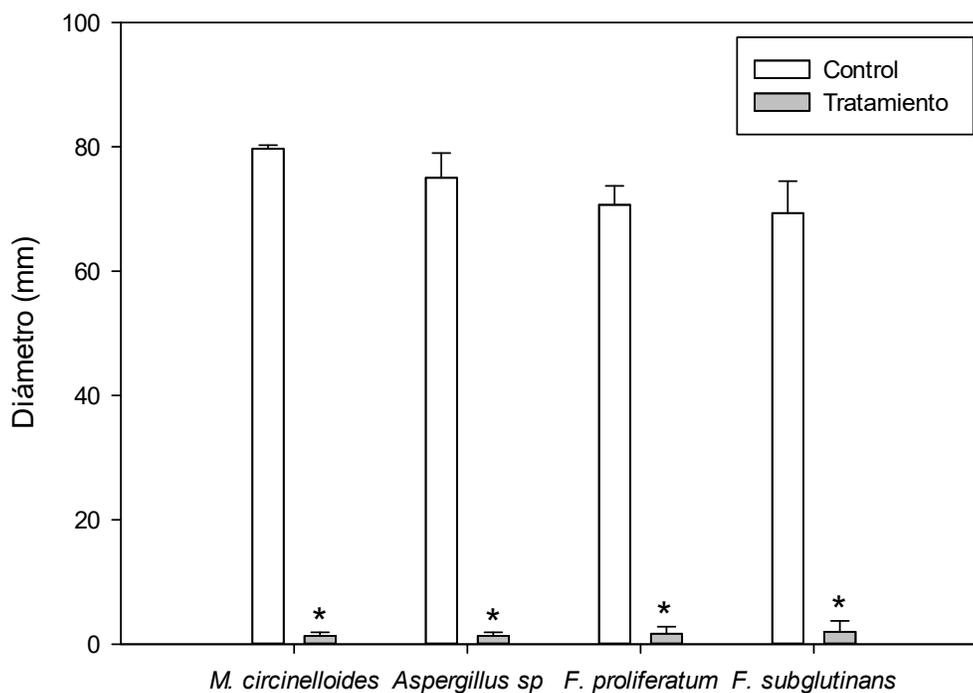
secuencias ya reportadas dentro de la base de datos del NCBI.



**Figura 7.** Productos de PCR de la región ITS1-5.8s-ITS2 del ADN ribosomal de los cuatro aislados. (A1-I) *Mucor circinelloides*, (A2-I) *Aspergillus* sp., (A3-I) *Fusarium proliferatum* y (A4-I) *Fusarium subglutinans*.

### 7.1.3 Ensayo de inhibición radial de hongos patógenos de maíz en medio sólido

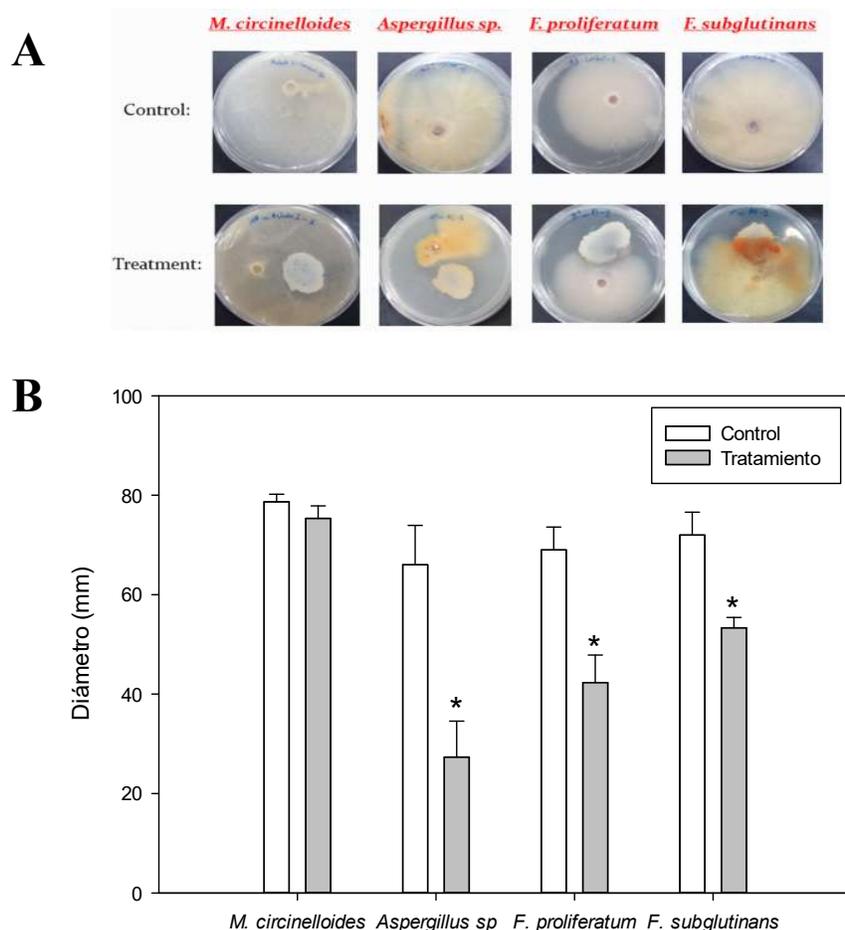
Los resultados en el ensayo de inhibición radial contra cuatro cepas de hongos patógenos del grano de maíz revelaron que *D. hansenii* redujo casi por completo el crecimiento micelial (97.2–98.3%) de las cuatro cepas evaluadas comparadas con el tratamiento control (Fig. 8).



**Figura 8.** Inhibición radial de *D. hansenii* contra hongos patógenos de maíz en medio sólido. Los datos fueron tomados después de siete días de incubación a 28 °C. Cada barra representa el promedio  $\pm$  DE de tres réplicas. Valores promedio significativamente diferentes del control (sin tratamiento; barras grises) de acuerdo a la prueba t-Student ( $P \leq 0.05$ ) son indicados por un asterisco.

#### 7.1.4 Efecto de compuestos difusibles en agar de *D. hansenii* sobre el crecimiento de hongos patógenos en medio sólido

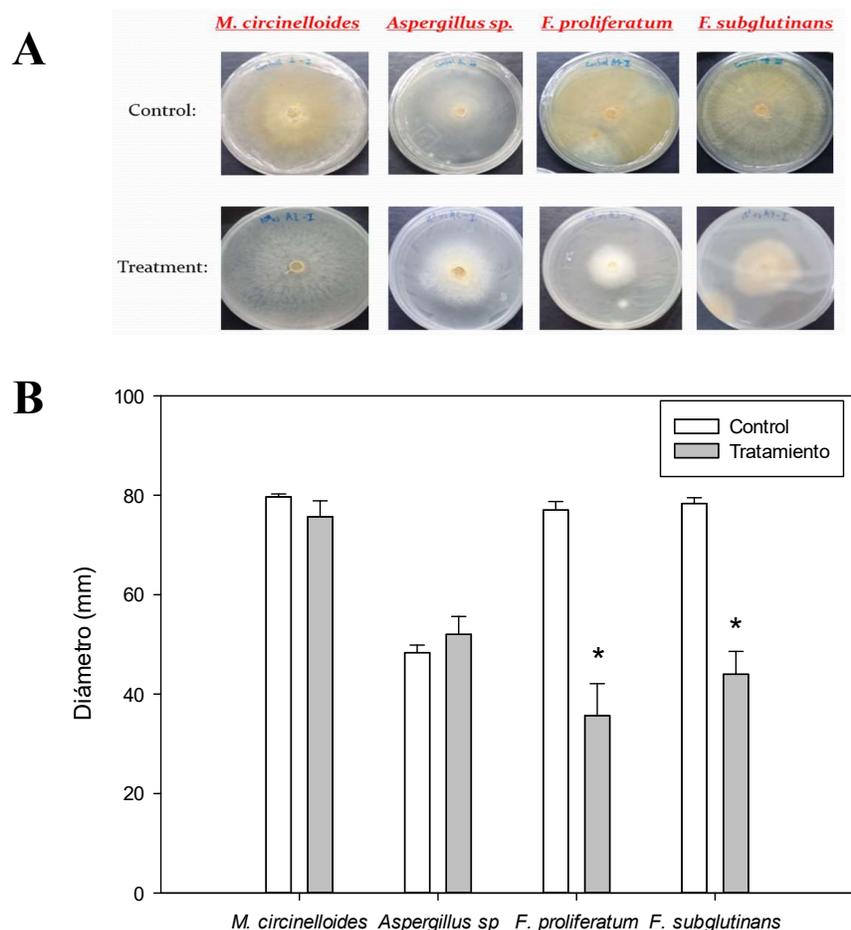
Los resultados obtenidos en el ensayo de cocultivo en medio sólido para determinar la actividad antagónica de *D. hansenii* contra cuatro cepas de hongos patógenos del grano de maíz se muestran en la figura 9. El hongo más sensible a la presencia de los compuestos difusibles de la levadura fue *Aspergillus sp.*, quien mostro una inhibición del crecimiento del 56.3%. Además, *D. hansenii* inhibió significativamente el crecimiento de *F. proliferatum* y *F. subglutinans* en un 38.9 y 25.9%, respectivamente, comparado con los tratamientos control ( $p \leq 0.05$ ). Por otra parte, *M. circinelloides* no se vio afectado por los compuestos difusibles de *D. hansenii*.



**Figura 9.** Efecto de compuestos difusibles en agar de *D. hansenii* sobre el crecimiento de *M. circinelloides*, *Aspergillus sp.*, *F. proliferatum* y *F. subglutinans*. (A) actividad antagónica de *D. hansenii* contra cuatro cepas de hongos patógenos de maíz en medio PDA. (B) expresado a través del diámetro de la colonia. Los datos fueron tomados después de siete días de incubación a 28 °C. Cada barra representa el promedio  $\pm$  DE de tres réplicas. Los valores promedio significativamente diferentes del control (sin tratamiento; barras grises) de acuerdo a la prueba t-Student ( $P \leq 0.05$ ) son indicados por un asterisco.

#### 7.1.5 Efecto antifúngico de compuestos volátiles producidos por *D. hansenii*

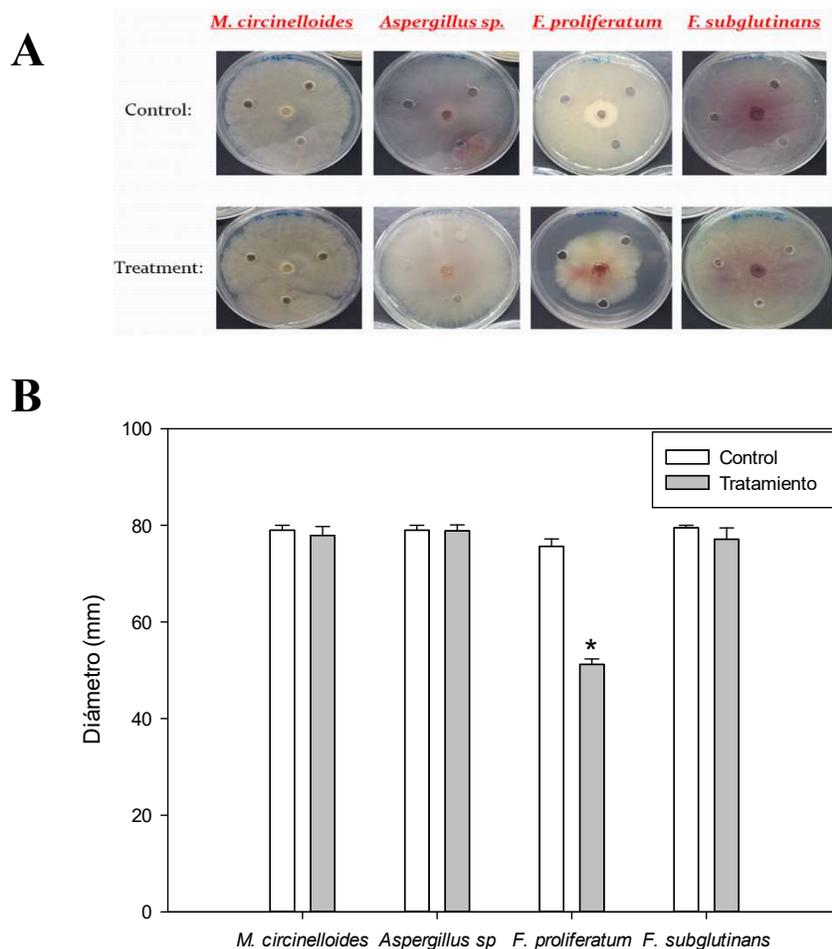
El crecimiento de los aislados fúngicos *F. proliferatum* y *F. subglutinans* fue inhibido por los compuestos volátiles de *D. hansenii* en un 54.2 y 43.5%, respectivamente, comparado con los tratamientos control ( $p \leq 0.05$ ) (Fig. 10). En contraste, tanto *M. circinelloides* como *Aspergillus sp.* no fueron afectados por los compuestos volátiles de la levadura.



**Figura 10.** Efecto antagónico de compuestos volátiles producidos por *D. hansenii*. (A) actividad antagónica de *D. hansenii* por el método “boca a boca” contra *M. circinelloides*, *Aspergillus sp.*, *F. proliferatum* y *F. subglutinans*. (B) expresado a través del diámetro del crecimiento micelial. Los datos fueron tomados después de siete días de incubación a 28 °C. Cada barra representa el promedio  $\pm$  DE de tres réplicas. Los valores promedio significativamente diferentes del control (sin tratamiento; barras grises) de acuerdo a la prueba t-Student ( $P \leq 0.05$ ) son indicados con un asterisco.

### 7.1.6 Efecto del sobrenadante libre de células de *D. hansenii* sobre el crecimiento de hongos patógenos de maíz

El efecto del sobrenadante libre de células de *D. hansenii* sobre el crecimiento de hongos patógenos de maíz se muestra en la figura 11. Estos resultados indican un efecto antagónico significativo ( $p \leq 0.05$ ) solo para *F. proliferatum* después de 7 días de incubación, los cuales alcanzaron hasta un 31% de inhibición comparado con el control.



**Figura 11.** Efecto antagónico del sobrenadante libre de células de *D. hansenii* contra *M. circinelloides*, *Aspergillus sp.*, *F. proliferatum* y *F. subglutinans*. (A) actividad antagónica del sobrenadante libre de células de *D. hansenii* en PDA después de siete días de incubación a 28 °C. (B) los datos están expresados basado en el diámetro micelial. Cada barra representa el promedio  $\pm$  DE de tres réplicas. Los valores promedio significativamente diferentes del control (sin tratamiento; barras grises) de acuerdo a la prueba t-Student ( $P \leq 0.05$ ) son indicados por un asterisco.

### 7.1.7 Efecto antagónico de *D. hansenii* contra hongos patógenos en grano de maíz

Las cuatro cepas de hongos aislados tuvieron la capacidad de infectar a los granos de maíz, lo cual confirma su patogenicidad. *M. circinelloides* mostro un rápido crecimiento y la mayor afectación de los granos al tercer día pos-inoculación. En contraste, *Aspergillus sp.*, *F. proliferatum* y *F. subglutinans* presentaron una tasa de crecimiento menor sobre los granos de maíz, la mayor incidencia de la enfermedad se alcanzó el día 6 pos-inoculación (Tabla III).

En general, cuando *D. hansenii* estuvo presente la presencia de micelio se retrasó por 24 h comparado con los tratamientos control (Tabla IV). No se observaron diferencias significativas entre la aplicación de la levadura cada 24 h o 48 h en ninguno de los aislados ( $p > 0.05$ , datos no mostrados). Basado en el crecimiento micelial, la actividad inhibitoria de *D. hansenii* sobre el crecimiento de los hongos aislados se determinó después de 7 días de incubación. El mayor efecto antagónico de *D. hansenii* se observó en *Aspergillus* sp., *F. proliferatum* y *F. subglutinans*. El establecimiento de *D. hansenii* y los hongos patógenos sobre la superficie de los granos de maíz se confirmó por Microscopía Electrónica de Barrido (Fig. 12).

**Tabla III.** Actividad antagónica de *D. hansenii* contra *M. circinelloides*, *Aspergillus* sp., *F. proliferatum* y *F. subglutinans* en grano de maíz (*Zea mays* L.). Los resultados están expresados como incidencia de la enfermedad (%), después de siete días de incubación a 25 °C.

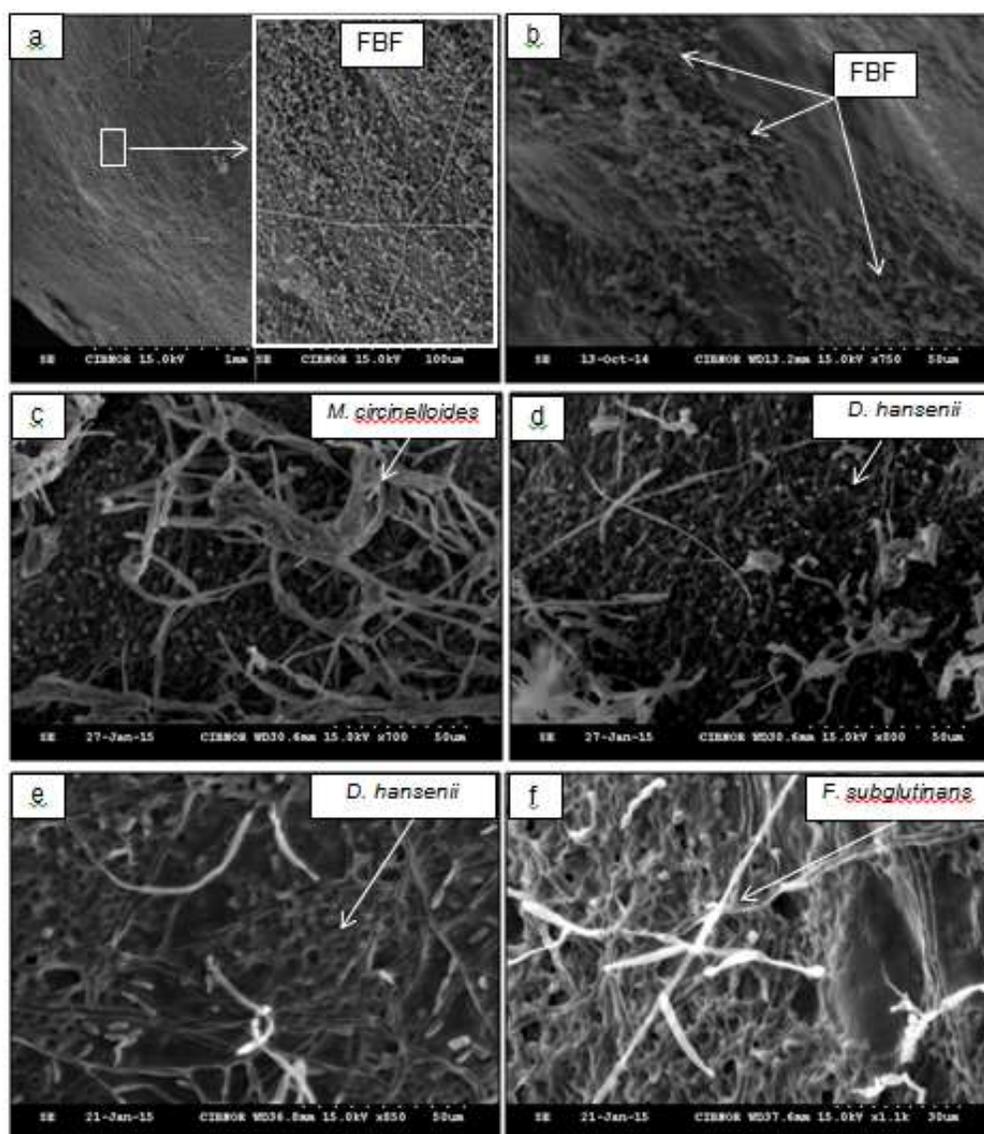
<b>Tratamiento</b>	<b>Incidencia de la enfermedad (%)</b>						
	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7
Control sin tratamiento	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
<i>D. hansenii</i>	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
<i>M. circinelloides</i>	4.8	93.3	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
<i>Aspergillus</i> sp	0.0	0.0	13.1	61.5	91.6	100.0	100.0
<i>F. proliferatum</i>	0.0	0.0	44.8	86.6	100.0	100.0	100.0
<i>F. subglutinans</i>	0.0	0.0	37.8	63.0	94.9	100.0	100.0
<i>M. circinelloides</i> +Dhh <sup>a</sup>	0.0	89.9	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
<i>M. circinelloides</i> +Dhh <sup>b</sup>	0.0	91.6	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
<i>Aspergillus</i> sp+Dhh <sup>a</sup>	0.0	0.0	10.4	31.1	79.9	98.3	100.0
<i>Aspergillus</i> sp+Dhh <sup>b</sup>	0.0	0.0	17.1	50.0	93.3	98.3	100.0
<i>F. proliferatum</i> +Dhh <sup>a</sup>	0.0	0.0	7.9	46.6	98.3	100.0	100.0
<i>F. proliferatum</i> +Dhh <sup>b</sup>	0.0	0.0	9.1	49.5	100.0	100.0	100.0
<i>F. subglutinans</i> +Dhh <sup>a</sup>	0.0	0.0	0.0	18.4	64.9	94.9	98.3
<i>F. subglutinans</i> +Dhh <sup>b</sup>	0.0	0.0	2.3	18.4	76.6	100.0	100.0

Notas: <sup>a</sup> Tratamiento con levadura cada 24 h; <sup>b</sup> Tratamiento con levadura cada 48 h.

**Tabla IV.** Actividad antagónica de *D. hansenii* en grano de maíz (*Zea mays* L.). Los resultados están expresados como crecimiento micelial, después de siete días de incubación a 25 °C.

<b>Tratamiento</b>	<b>Crecimiento micelial</b>						
	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7
Control sin tratamiento	-	-	-	-	-	-	-
<i>D. hansenii</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>M. circinelloides</i>	+	++	++	+++	+++	+++	++++
<i>Aspergillus sp</i>	-	-	+	+	++	+++	++++
<i>F. proliferatum</i>	-	-	+	++	+++	++++	+++++
<i>F. subglutinans</i>	-	-	+	++	+++	+++	++++
<i>M. circinelloides</i> +Dhh <sup>a</sup>	-	+	+	++	++	++	+++
<i>M. circinelloides</i> +Dhh <sup>b</sup>	-	+	+	++	++	++	+++
<i>Aspergillus sp</i> +Dhh <sup>a</sup>	-	-	-	+	+	++	++
<i>Aspergillus sp</i> +Dhh <sup>b</sup>	-	-	+	+	+	++	++
<i>F. proliferatum</i> +Dhh <sup>a</sup>	-	-	-	+	+	++	+++
<i>F. proliferatum</i> +Dhh <sup>b</sup>	-	-	+	+	+	++	+++
<i>F. subglutinans</i> +Dhh <sup>a</sup>	-	-	-	+	+	+	++
<i>F. subglutinans</i> +Dhh <sup>b</sup>	-	-	+	+	+	+	++

Notas: <sup>a</sup> Tratamiento de aplicación de *D. hansenii* (1x10<sup>8</sup> células / mL) cada 24 h; <sup>b</sup> Cada 48 h. Aislados con crecimiento: nulo (-), muy poco (+), poco (++), moderado (+++), alto (++++) y muy alto (+++++).

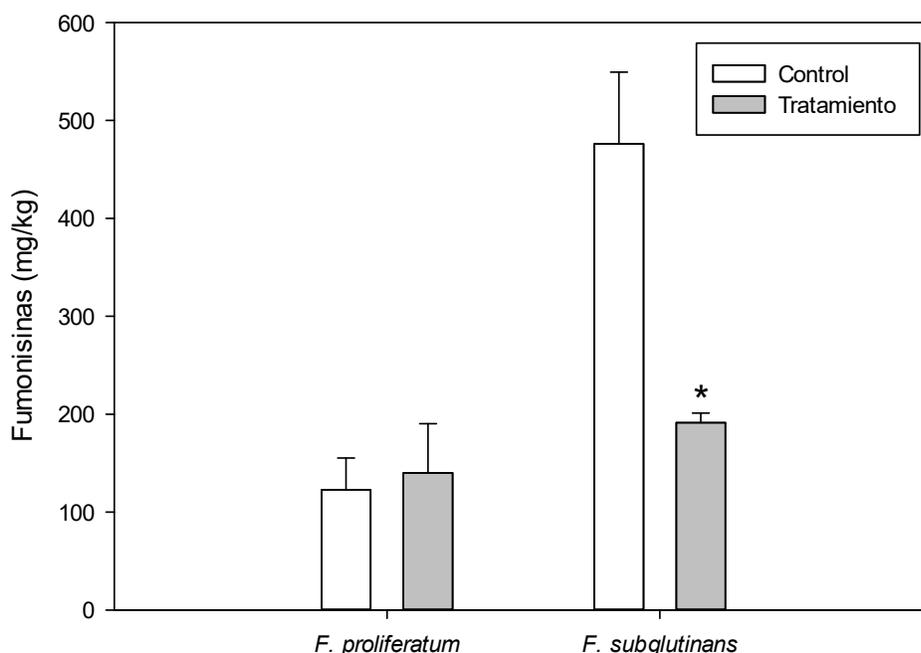


**Figura 12.** Micrografías de formación de *biofilm* (FBF) por *D. hansenii*, y de la interacción entre hongos y levadura en grano de maíz. Inoculada cada 24 h y cada 48 h por pipeteo directo sobre la superficie de los granos después de siete días de incubación a 25 °C. 750x de magnificación (b), 800x de magnificación (d).

### 7.1.8 Efecto de *D. hansenii* sobre la producción de fumonisinas en grano de maíz

El efecto de *D. hansenii* sobre la producción de fumonisinas en los granos de maíz se muestra en la figura 13. *F. subglutinans* produjo más fumonisinas ( $476.0 \pm 73.3$  mg/kg) que *F. proliferatum* ( $122.7 \pm 32.5$  mg/kg). La aplicación de *D. hansenii* redujo la producción de fumonisinas de *F. subglutinans* en 59.8% después de 7 días de co-incubación comparado

con los tratamientos control. Por el contrario, la producción de fumonisinas de *F. proliferatum* no fue afectada por la presencia de *D. hansenii*.



**Figura 13.** Producción de fumonisinas de *F. proliferatum* y *F. subglutinans* en grano de maíz (*Zea mays* L.). Los granos fueron co-inoculados con la levadura *D. hansenii* ( $1 \times 10^8$  células/mL) y con los aislados fúngicos ( $1 \times 10^6$  esporas/mL), e incubados durante siete días a 25 °C.

## 7.2 Determinación de las potenciales propiedades probióticas e inmunoestimulantes de *D. hansenii* en leucocitos de sangre periférica de caprino.

### 7.2.1 Tolerancia a pH ácido y sales biliares

Todas las levaduras fueron capaces de resistir las condiciones de estrés a las que fueron expuestas, mostrando índices de crecimiento favorables bajo condiciones de pH ácidos y un elevado porcentaje de supervivencia ante altas concentraciones de sales biliares (Tabla V), los parámetros empleados para determinar las cepas más relevantes fueron los siguientes: IC < 25% inhibición total, 25% < IC < 75% inhibición parcial, IC > 75% crecimiento similar al control (Perricone *et al.*, 2014).

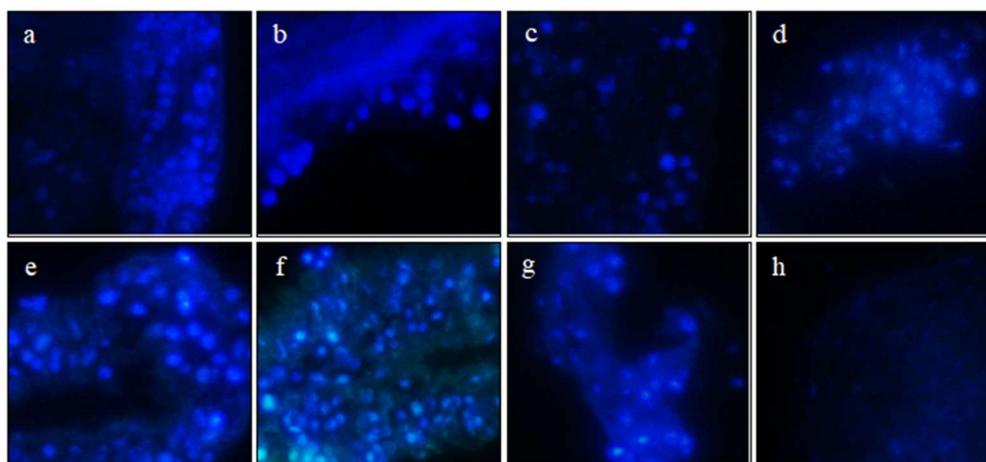
**Tabla V.** Índice de crecimiento y porcentaje de supervivencia de cepas de *D. hansenii* bajo condiciones de estrés (pH ácido y presencia de sales biliares).

Levadura	Índice de crecimiento <sup>1</sup> (%)			Supervivencia <sup>2</sup> (%)		
	pH 2.0	pH 2.5	pH 3.0	Bilis 0.3 %	Bilis 0.6 %	Bilis 0.9 %
DhhBCS001	77.9±5.8 <sup>abc</sup>	77.7±1.4 <sup>bc</sup>	82.2±2.7 <sup>b</sup>	99.2±2.4	98.9±1.3	99.4±9.5
DhhBCS002	70.6±6.5 <sup>bc</sup>	84.9±4.5 <sup>ab</sup>	85.4±3.4 <sup>ab</sup>	98.1±2.3	99.2±2.7	99.8±8.8
DhhBCS003	85.6±0.6 <sup>a</sup>	90.5±5.1 <sup>a</sup>	97.4±5.1 <sup>a</sup>	99.4±0.6	99.1±6.8	99.2±7.2
DhhBCS004	83.9±5.8 <sup>ab</sup>	85.6±4.0 <sup>ab</sup>	90.1±3.6 <sup>ab</sup>	99.0±0.5	98.7±2.0	99.2±7.3
DhhBCS005	78.6±2.8 <sup>abc</sup>	84.9±5.1 <sup>ab</sup>	87.9±5.9 <sup>ab</sup>	99.5±0.9	99.2±1.4	99.2±6.9
DhhBCS006	73.9±5.4 <sup>abc</sup>	76.8±2.7 <sup>bc</sup>	88.1±4.1 <sup>ab</sup>	98.4±6.3	99.3±8.4	99.3±8.5
DhhBCS007	79.3±0.8 <sup>abc</sup>	83.7±3.7 <sup>ab</sup>	89.2±6.2 <sup>ab</sup>	97.9±2.7	99.6±6.6	99.5±7.1

Notas: <sup>1</sup> El crecimiento de las levaduras después de 24 h de incubación a 28 °C en caldo YPD ajustado a distintos valores de pH (2.0, 2.5 y 3.0) es expresado como índice de crecimiento (%), el cual se determinó tomando como referencia los tratamientos control (pH de 6.5); <sup>2</sup> La supervivencia de las levaduras después de 24 h de incubación a 28 °C en YPD agar conteniendo distintas proporciones de sales biliares (0.3%, 0.6% y 0.9%) es expresado en porcentaje, tomando como referencia los tratamientos control (sin sales biliares).

### 7.2.2 Ensayo de adhesión intestinal

Las cepas de *D. hansenii* (DhhBCS001, DhhBCS002, DhhBCS003, DhhBCS004, DhhBCS005, DhhBCS006 y DhhBCS007) marcadas con DTAF mostraron afinidad al epitelio intestinal de caprino, como se observa en las imágenes (en azul) por microscopía de fluorescencia a 40x (Fig. 14).

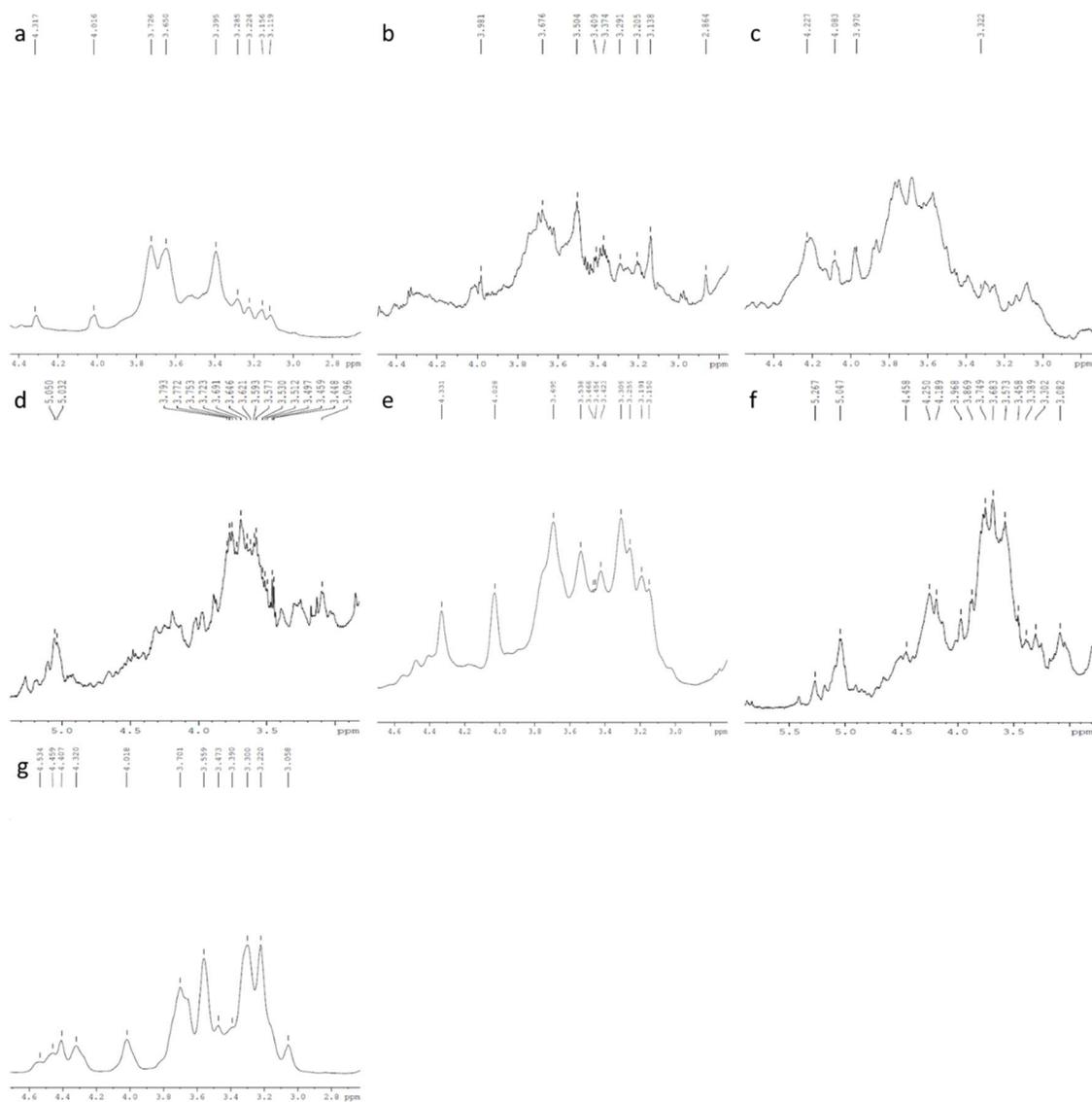


**Figura 14.** Capacidad de adhesión a epitelio intestinal de cabra de *D. hansenii* marcadas con DTAF verificado por microscopía de fluorescencia (aumento 40x). (a) DhhBCS001, (b) DhhBCS002, (c) DhhBCS003, (d) DhhBCS004, (e) DhhBCS005, (f) DhhBCS006, (g) DhhBCS007, (h) control sin levadura marcada.

### 7.2.3 Ensayos inmunológicos

#### 7.2.3.1 Espectros de NMR y rendimientos de $\beta$ -glucanos de distintas cepas de *D. hansenii*

Las cantidades totales de  $\beta$ -glucanos extraídos de las cepas marinas de *D. hansenii* oscilaron de 6.6 a 11%, con un mínimo para la cepa DhhBCS007, y un máximo para la cepa DhhBCS005. Los espectros de NMR de la región de carbohidratos de los glucanos particulados insolubles en agua de las siete cepas marinas de *D. hansenii* se muestran en la figura 15. El objetivo de este ensayo no fue evaluar a profundidad la estructura de los polisacáridos investigados con NMR.

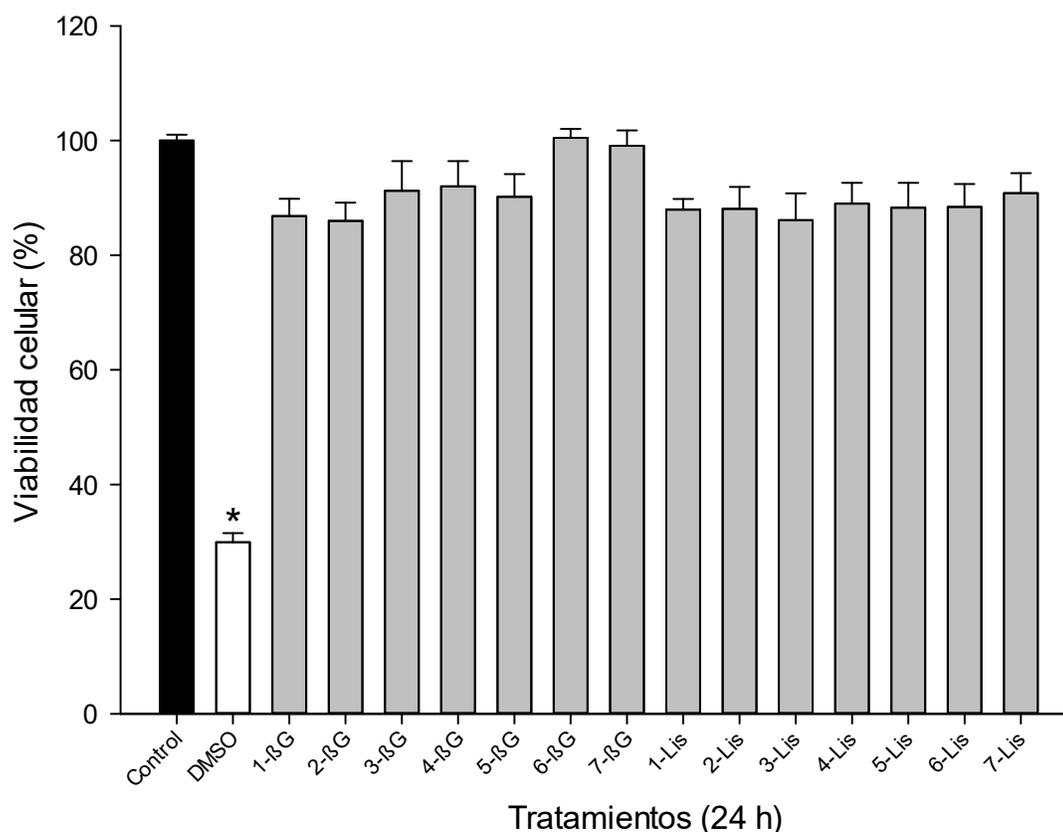


**Figura 15.** Espectros de NMR de la región de carbohidratos de los glucanos particulados insolubles en agua en un solvente mixto (DMSO-d6) a 80 °C de siete cepas marinas de *D. hansenii*, (a) DhhBCS001, (b) DhhBCS002, (c) DhhBCS003, (d) DhhBCS004, (e) DhhBCS005, (f) DhhBCS006, (g) DhhBCS007.

### 7.2.3.2 Ensayo de viabilidad celular

La viabilidad de los leucocitos de sangre periférica caprina estimulados con  $\beta$ -glucanos y lisados de *D. hansenii* se determinó por el ensayo de reducción de resazurina (Fig. 16) después de 24 h de incubación. No se observaron cambios significativos en la viabilidad de los leucocitos comparados con los tratamientos control (sin  $\beta$ -glucanos o lisados). Por otra

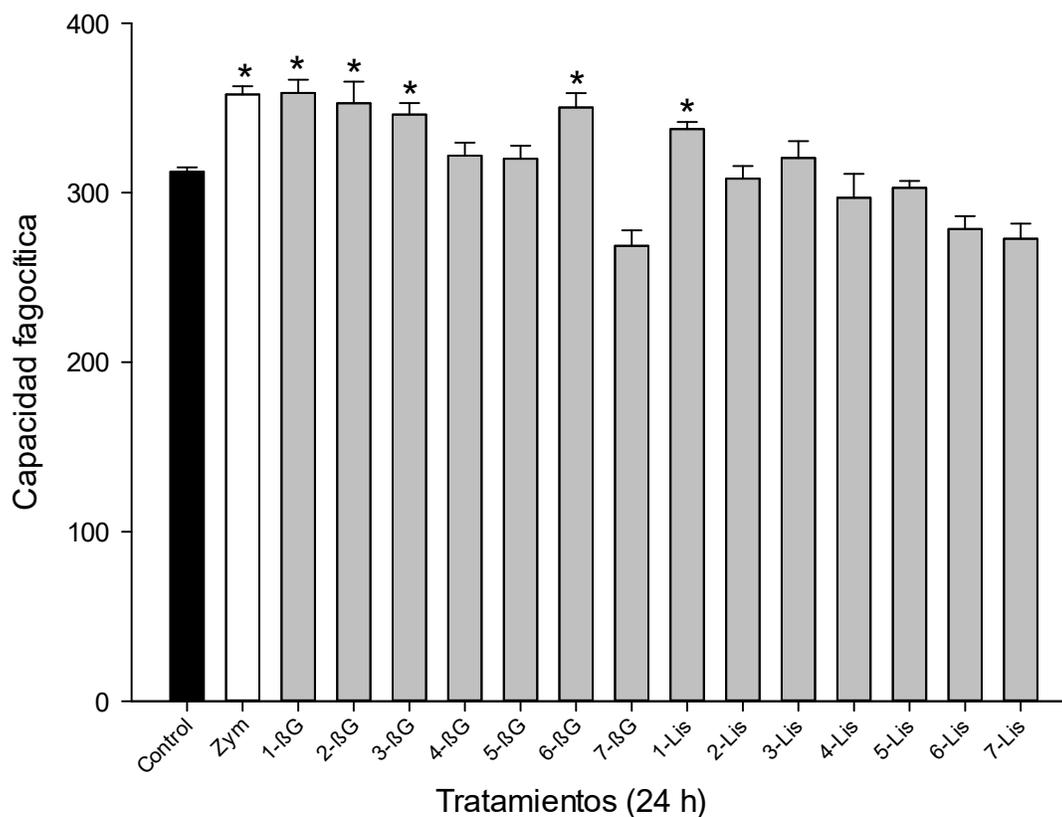
parte, los resultados obtenidos en el control positivo (DMSO) mostraron una reducción significativa ( $P \leq 0.05$ ) en la viabilidad (29.9 %).



**Figura 16.** Efecto de  $\beta$ -glucanos y lisados de cepas de *D. hansenii* sobre la viabilidad (%) de leucocitos de sangre periférica caprina determinada por ensayo de reducción de resazurina. Los resultados están expresados como viabilidad celular (%) (Media  $\pm$  DE). Todos los tratamientos se realizaron por triplicado. Los asteriscos denotan diferencia estadística significativa con respecto al control ( $p \leq 0.05$ ).

### 7.2.3.3 Actividad fagocítica

Los leucocitos de sangre periférica caprina estimulados con  $\beta$ -glucanos de DhhBCS001, DhhBCS002, DhhBCS003 y DhhBCS006, así como con lisado de la levadura marina DhhBCS001 significativamente incrementaron la capacidad fagocítica (el número relativo de levaduras ingeridas por célula) comparado con el grupo control (leucocitos no estimulados), similar al tratamiento con zymosan (Fig. 17).

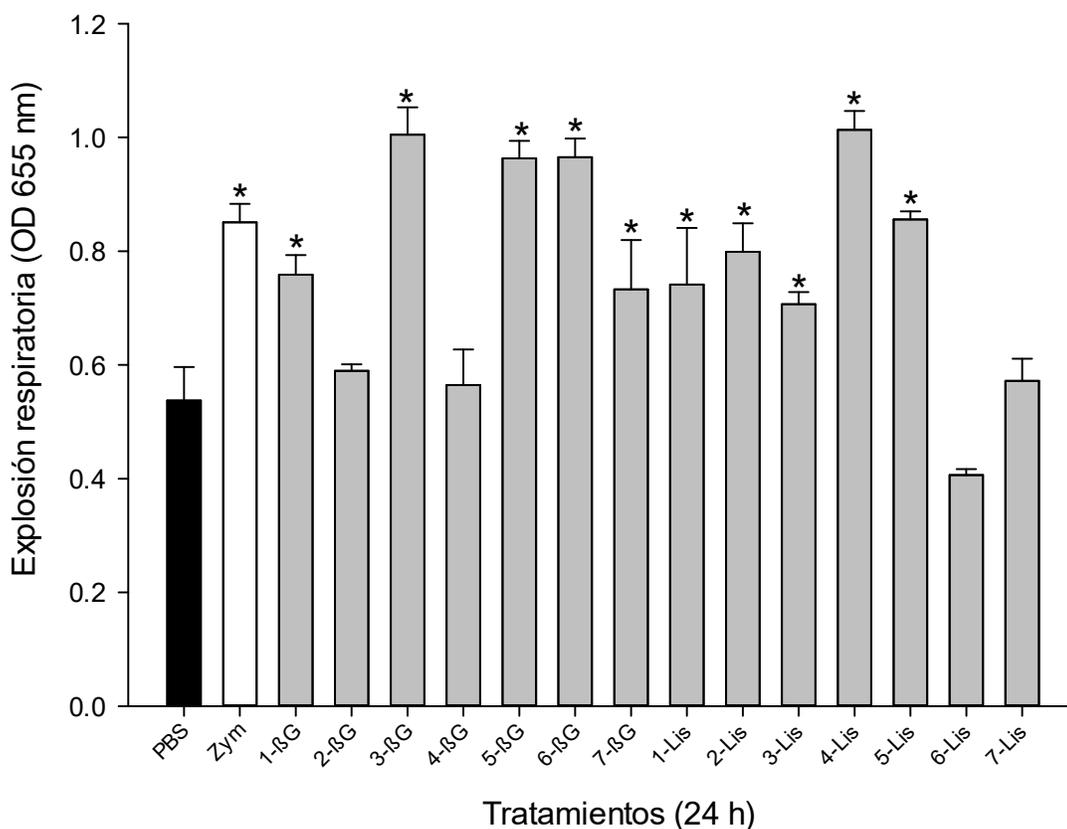


**Figura 17.** Capacidad fagocítica de leucocitos de sangre periférica caprina inmunoestimulados con  $\beta$ -glucanos y lisados de cepas de *D. hansenii* después de 24 h de incubación a 37 °C y 5 % de CO<sub>2</sub>. Los datos se presentan como el promedio  $\pm$  DE de tres réplicas, de acuerdo al análisis de varianza ( $P \leq 0.05$ ). Valores promedio significativamente diferentes del control (PBS) son denotados con un asterisco.

#### 7.2.4 Actividades enzimáticas antioxidantes y respuestas al estrés oxidativo y nitrosativo

##### 7.2.4.1 Explosión respiratoria

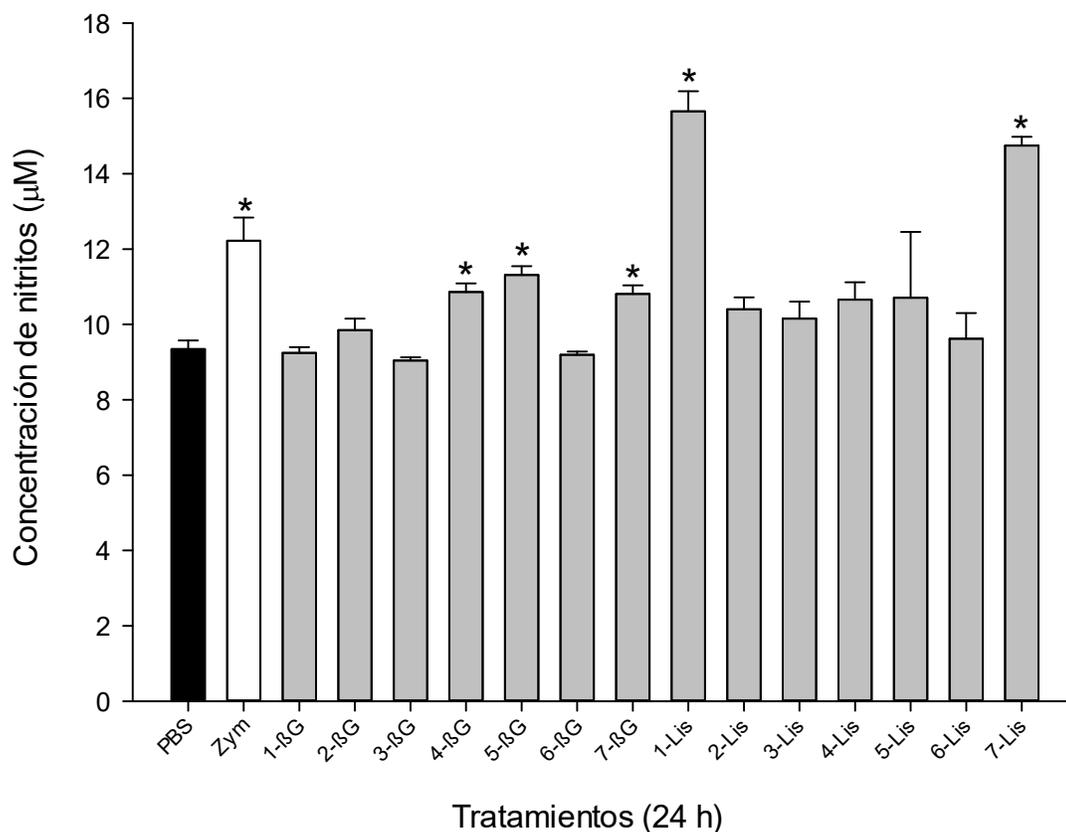
Como se observa en la figura 18, en el ensayo de explosión respiratoria los  $\beta$ -glucanos de las cepas DhhBCS001, DhhBCS003, DhhBCS005, DhhBCS006 y DhhBCS007, así como los lisados de DhhBCS001, DhhBCS002, DhhBCS003, DhhBCS004 y DhhBCS005 incrementaron ( $P \leq 0.05$ ) la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en los leucocitos después de 24 h de incubación a 37 °C y 5 % de CO<sub>2</sub> comparado con el tratamiento control (PBS).



**Figura 18.** Generación de especies reactivas de oxígeno en leucocitos estimulados con  $\beta$ -glucanos y lisados de cepas de *D. hansenii*. Los datos están expresados como OD a 655 nm. Cada barra representa el promedio  $\pm$  DE de tres réplicas después de 24 h de incubación a 37 °C y 5 % de CO<sub>2</sub>. Los valores promedio significativamente diferentes del control (PBS) de acuerdo al análisis de varianza ( $P \leq 0.05$ ) son indicados por un asterisco.

#### 7.2.4.2 Producción de óxido nítrico (ON)

La producción de óxido nítrico se incrementó ( $P \leq 0.05$ ) en los grupos celulares tratados con la cepa DhhBCS007 de ambientes marinos, tanto en el tratamiento con lisado como con  $\beta$ -glucanos. En menor grado, también se estimularon los tratamientos con lisado de la cepa DhhBCS001, así como los tratamientos con  $\beta$ -glucanos de DhhBCS004 y DhhBCS005 después de 24 h de incubación a 37 °C y 5 % de CO<sub>2</sub> comparado con el tratamiento control (PBS) (Fig. 19).

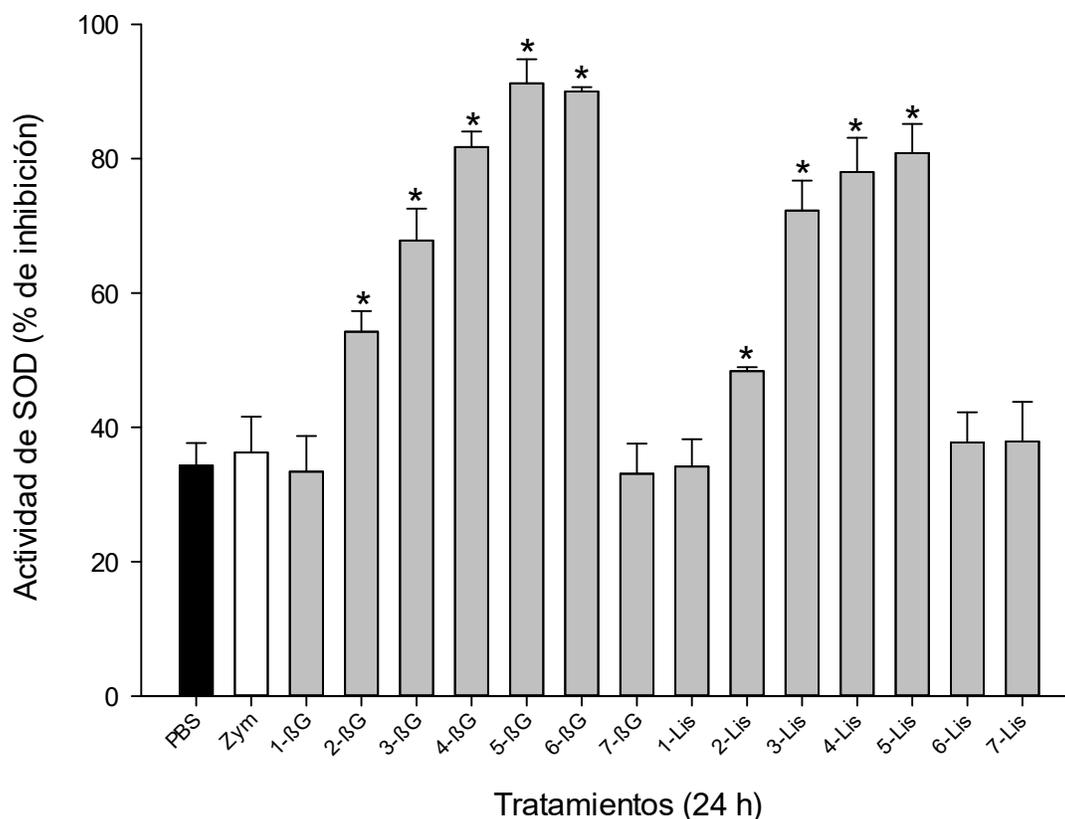


**Figura 19.** Producción de óxido nítrico (ON) por leucocitos estimulados con  $\beta$ -glucanos y lisados celulares de cepas de *D. hansenii*. Los datos están expresados como concentración de nitritos en  $\mu\text{M}$ . Cada barra representa el promedio  $\pm$  DE de tres réplicas después de 24 h de incubación a 37 °C y 5 % de  $\text{CO}_2$ . Los valores promedio significativamente diferentes del control (PBS) de acuerdo al análisis de varianza ( $P \leq 0.05$ ) son indicados por un asterisco.

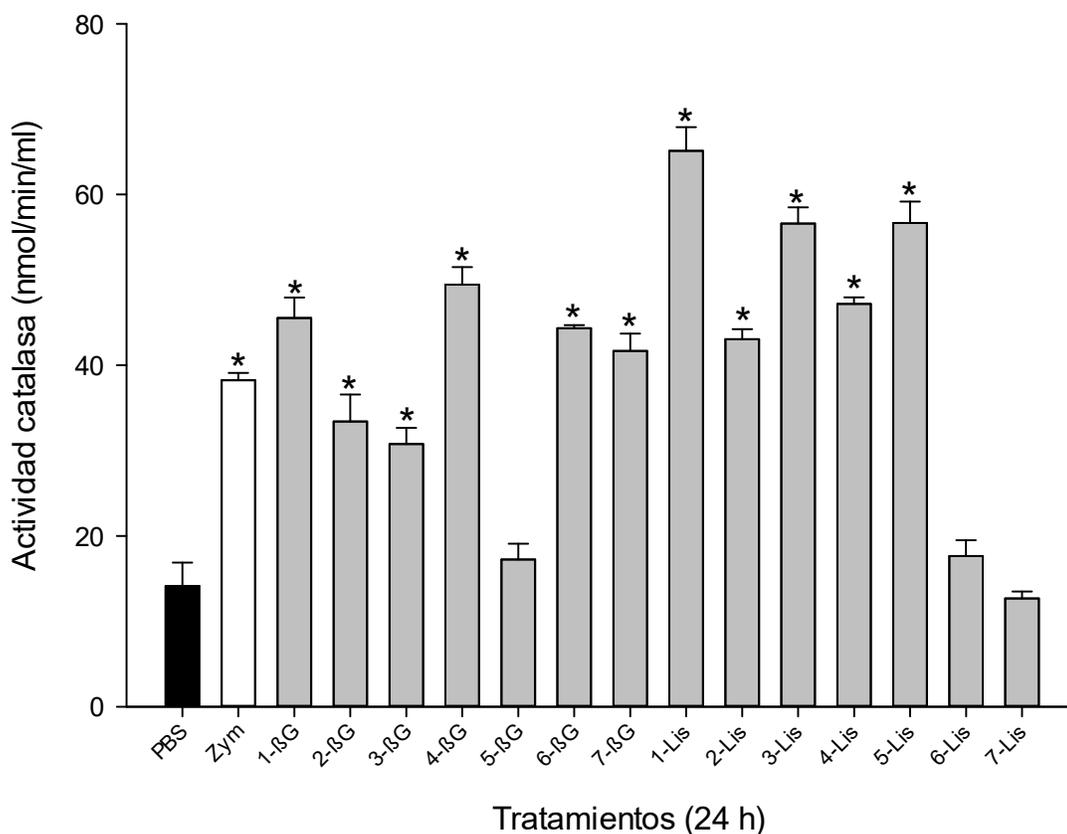
#### 7.2.4.3 Superóxido dismutasa y catalasa

Se observó un incremento de la actividad de SOD ( $P \leq 0.05$ ) en los leucocitos estimulados por las cepas DhhBCS005, DhhBCS004, DhhBCS003 y DhhBCS002 en ambos tratamientos ( $\beta$ -glucanos y lisados), así como también en los grupos tratados con  $\beta$ -glucanos de la levadura marina DhhBCS006 comparados con los tratamientos control (PBS) (Fig. 20). El incremento significativo ( $P < 0.05$ ) de la actividad catalasa se presentó en los grupos estimulados con las cepas DhhBCS001, DhhBCS002, DhhBCS003 y DhhBCS004 en ambos tratamientos ( $\beta$ -glucanos y lisados), el lisado de DhhBCS001 fue el tratamiento con mejor

efecto estimulante en este ensayo (Fig. 21). La actividad catalasa en los leucocitos tratados con  $\beta$ -glucanos de DhhBCS006 y DhhBCS007, así como el lisado de DhhBCS005 también presentaron un incremento significativo ( $P < 0.05$ ) comparado con el tratamiento control (PBS).



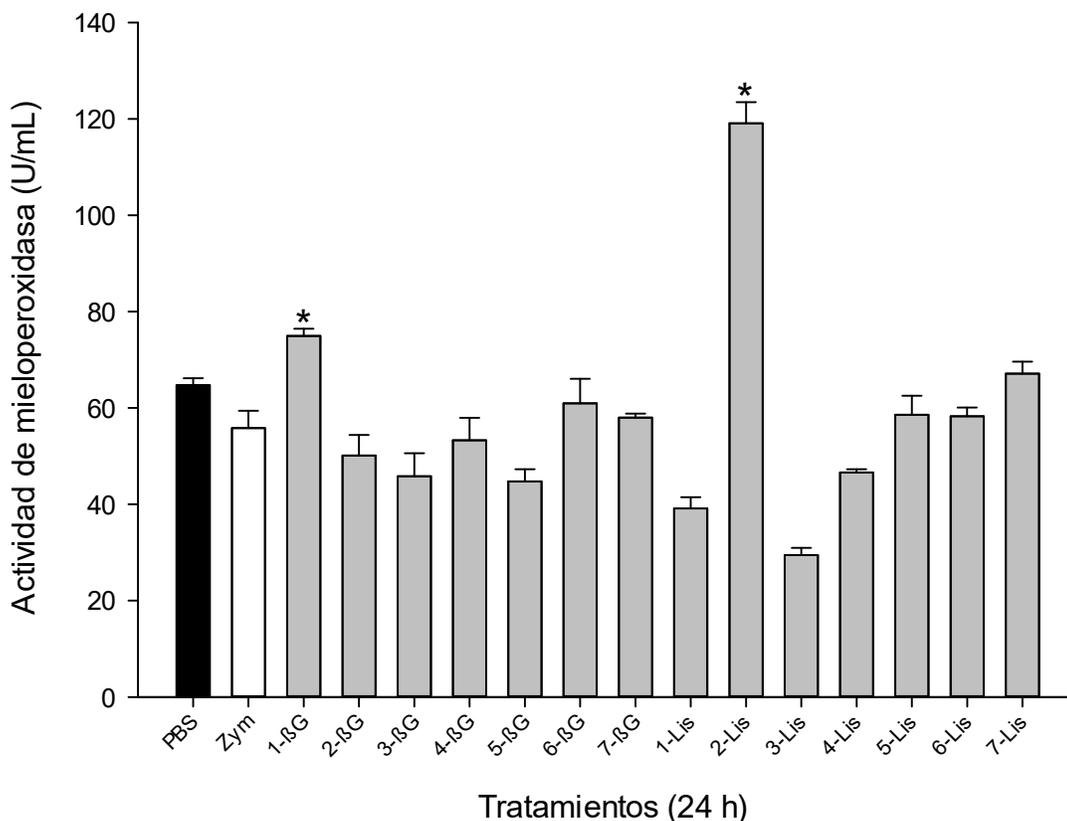
**Figura 20.** Actividad de superóxido dismutasa en leucocitos estimulados con  $\beta$ -glucanos y lisados de cepas de *D. hansenii*. Los datos están expresados como porcentaje de inhibición. Cada barra representa el promedio  $\pm$  DE de tres réplicas después de 24 h de incubación a 37 °C y 5 % de CO<sub>2</sub>. Los valores promedio significativamente diferentes del control (PBS) de acuerdo al análisis de varianza ( $P \leq 0.05$ ) son indicados por un asterisco.



**Figura 21.** Actividad catalasa en leucocitos estimulados con  $\beta$ -glucanos y lisados de cepas de *D. hansenii*. Los datos están expresados como nmol/min/ml. Cada barra representa el promedio  $\pm$  DE de tres réplicas después de 24 h de incubación a 37 °C y 5 % de CO<sub>2</sub>. Los valores promedio significativamente diferentes del control (PBS) de acuerdo al análisis de varianza ( $P \leq 0.05$ ) son indicados por un asterisco.

#### 7.2.4.4 Mieloperoxidasa (MPO)

La actividad de mieloperoxidasa fue incrementada ( $P \leq 0.05$ ) en los leucocitos de sangre periférica de cabra estimulados con el lisado obtenido de la levadura marina DhhBCS002 y los  $\beta$ -glucanos de DhhBCS001, comparados con el tratamiento control (PBS) (Fig. 22).



**Figura 22.** Actividad de mieloperoxidasa (MPO) en leucocitos estimulados con  $\beta$ -glucanos y lisados celulares de cepas de *D. hansenii*. Los datos están expresados como U/mL. Cada barra representa el promedio  $\pm$  DE de tres réplicas después de 24 h de incubación a 37 °C y 5 % de CO<sub>2</sub>. Los valores promedio significativamente diferentes de los controles (PBS; zymosan) de acuerdo al análisis de varianza ( $P \leq 0.05$ ) son indicados por un asterisco.

## 8. DISCUSIÓN

Según nuestro conocimiento, este es el primer reporte sobre el uso de levaduras marinas como agente de control biológico contra hongos patógenos en grano de maíz. *D. hansenii* fue elegida para determinar su actividad antifúngica contra fitopatógenos del grano de maíz debido a su probada habilidad antagónica contra hongos en frutas, productos lácteos y productos cárnicos madurados (Andrade *et al.*, 2014; Liu y Tsao, 2009; Núñez *et al.*, 2015). Además, de acuerdo a la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) *D. hansenii* está reportada como segura para su uso en la industria alimentaria (BIOHAZ, 2012). La cepa

de *D. hansenii* (DhhBCS003) evaluada en el ensayo de inhibición radial redujo significativamente el crecimiento de los hongos objetivo: *M. circinelloides* (98.3%), *Aspergillus* sp. (98.1%), *F. proliferatum* (97.7%) y *F. subglutinans* (97.2%). Nuestros resultados coinciden con las tasas de inhibición (cerca al 100%) reportadas por otros autores en ensayos *in vitro* donde utilizaron levaduras antagónicas (*Cyberlindnera jadinii*, *Candida friedrichii*, *Candida intermedia*, *Lachancea thermotolerans*, *Candida zemplinina*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia kluyveri* y *Metschnikowia aff. fructicola*) como agentes de control para *Aspergillus carbonarius* y *Aspergillus ochraceus* en uvas y jugo de uva (Fiori *et al.*, 2014; Zhu *et al.*, 2015). De la misma manera, aislados de *D. hansenii* redujeron el crecimiento fúngico (>60%) de hongos toxigénicos de embutidos fermentados en un ensayo de cocultivo en medio sólido (Núñez *et al.*, 2015). Nuestros resultados en conjunto con los obtenidos por otros autores, sugieren que los mecanismos involucrados en el biocontrol de hongos fitopatógenos por *D. hansenii* son su elevada tasa de crecimiento, que le permite competir por espacio y nutrientes.

En este estudio, la producción de metabolitos secundarios producidos por un aislado de *D. hansenii* con propiedades antifúngicas quedó demostrado mediante los ensayos de compuestos difusibles y sobrenadante libre de células. En el ensayo de compuestos difusibles, *D. hansenii* indujo una reducción en el crecimiento de hasta un 55.6% de tres de las cuatro cepas fúngicas evaluadas, siendo *Aspergillus* sp. la más sensible. Por el contrario, en el ensayo de sobrenadante libre de células se observó una inhibición significativa ( $p \leq 0.05$ ) del crecimiento de *F. proliferatum* (31.56%), mientras que *M. circinelloides*, *Aspergillus* sp. y *F. subglutinans* no fueron afectados por la presencia del sobrenadante. En este sentido, nuestros resultados sugieren la síntesis y secreción de sustancias supresoras al medio en presencia de estas especies fúngicas. De forma similar, Andrade *et al.* (2014) observaron que los sobrenadantes libres de células de cepas de *D. hansenii* inhibieron el crecimiento micelial de mohos ocratoxigénicos (*Penicillium nordicum* DMRICC 9035 y *P. nordicum* CBS 323.92), indicando que esta levadura tiene la capacidad de secretar compuestos inhibidores contra esos hongos patógenos. Por otra parte, estudios previos

indicaron una inhibición del crecimiento micelial por compuestos bioactivos antifúngicos de distintas cepas de levaduras tales como  $\beta$ -1,3 glucanasa, quitinasa y laminarinasa (Banani *et al.*, 2015; Lima *et al.*, 2013; Mehlomakulu *et al.*, 2014; Platania *et al.*, 2012; Ting y Chai, 2015; Wang *et al.*, 2012). Cabe destacar que existen reportes de algunas cepas de *D. hansenii* con actividad *killer* y que secretan enzimas hidrolíticas como mecanismos antagónicos contra cepas fúngicas sensibles en aceitunas y uvas (Hernández *et al.*, 2008; Nally *et al.*, 2015). Estos efectos antifúngicos por actividad *killer* y enzimática ya han sido reportados en otras especies de levaduras tales como *Zygosaccharomyces bailii*, *Candida guilliermondii*, *Pichia anomala*, *Pichia membranifaciens* y *Saccharomyces cerevisiae* (Coelho *et al.*, 2009; Fialho *et al.*, 2010; Hernández *et al.*, 2008; Izgu *et al.*, 2011; Marquina *et al.*, 2001; Masoud *et al.*, 2005; Weiler y Schmitt, 2003). En este estudio, los compuestos volátiles producidos por *D. hansenii* inhibieron el crecimiento micelial de *F. proliferatum* y *F. subglutinans* (Fig. 3). Se sabe que la producción de compuestos volátiles es un importante mecanismo de antagonismo en las levaduras, su absorción a través de la membrana celular de los hongos incrementa su permeabilidad y difusión de iones esenciales y metabolitos, con la consecuente pérdida de la homeostasis (Ando *et al.*, 2012; Di Francesco *et al.*, 2015; Ingram y Buttke, 1984; Simoncini *et al.*, 2015). De hecho, la producción de compuestos volátiles antifúngicos de levaduras tales como *Cyberlindnera jadinii*, *Candida friedrichii*, *C. intermedia*, *Lachancea thermotolerans*, *Cryptococcus albidus*, *Cochliobolus victoriae*, y *Sporidiobolus pararoseus* fue efectiva suprimiendo la germinación de conidios y el crecimiento micelial de distintas especies fúngicas aisladas de diferentes productos alimenticios (Fiori *et al.*, 2014; Huang *et al.*, 2012; Lutz *et al.*, 2013). Cabe destacar que 21 de 280 aislados de *D. hansenii* mostraron habilidad para reducir el crecimiento fúngico (10–80%) de *Penicillium verrucosum* mediante la producción de compuestos volátiles antifúngicos (Núñez *et al.*, 2015). De 51 compuestos volátiles evaluados, solo tres (2-methyl-1-propanol, 3-methyl-1-butanol y 2-methyl-1-butanol) fueron producidos por todos los aislados evaluados de *D. hansenii* en presencia de *P. verrucosum* (Núñez *et al.*, 2015). En el grano de maíz, el mayor efecto antagónico de la levadura se observó contra *Aspergillus*

sp. y *F. subglutinans*, siendo *M. circinelloides* y *F. proliferatum* los menos afectados. *D. hansenii* ha demostrado una elevada eficiencia contra distintos hongos patógenos en diversos hábitats. Andrade *et al.* (2014) demostró la habilidad de *D. hansenii* para prevenir tanto el crecimiento de *Penicillium nordicum* como la acumulación de ocratoxina A en productos cárnicos curados. De la misma manera, en algunos frutos como uvas *D. hansenii* ha mostrado una actividad antifúngica favorable contra hongos fitopatógenos (*A. caelatus*, *A. carbonarius*, *A. terreus*, *A. versicolor*, *F. oxysporum*, *P. commune*, *Rhizopus stolonifer* y *Ulocladium* sp.) aislados de uvas dañadas con pudrición ácida, (Nally *et al.*, 2013).

Además, *D. hansenii* fue capaz de reducir la incidencia del moho azul post cosecha (*P. italicum* Wehmer) por encima del 80% en limón mexicano después de dos semanas de almacenamiento (Hernández-Montiel *et al.*, 2010). *D. hansenii* también ha sido descrita como un agente biocontrol contra *Aspergillus* sp., *Byssochlamys fulva*, *B. nivea*, *Cladosporium* sp., *Eurotium chevalieri*, *P. candidum* y *P. roqueforti* en yogurt natural y quesos bajo condiciones no refrigeradas (Liu y Tsao, 2009). El género *Fusarium* incluye una amplia variedad de especies de importancia ya que son patógenas en plantas, muchas de estas especies son capaces de producir micotoxinas implicadas en distintas enfermedades en animales de granja y humanos (Thompson *et al.*, 2013).

Se ha evaluado la producción de fumonisinas en *F. proliferatum*, *F. verticillioides*, *F. subglutinans*, *F. anthophilum*, *F. globosum*, *F. nygamai*, *F. napiforme*, *F. oxysporum* y *F. polyphialidicum*, siendo *F. proliferatum* la especie que presentó el máximo nivel de fumonisinas reportado (Rheeder *et al.*, 2002; Yazar y Omurtag, 2008). En nuestro estudio, la concentración de fumonisinas en el maíz inoculado con esporas de *F. subglutinans* y células de *D. hansenii* se redujo; mientras que la concentración de fumonisinas en el maíz inoculado con esporas de *F. proliferatum* y células de *D. hansenii* no fue afectado. En un trabajo similar, Pizzolitto *et al.* (2012) evaluaron la habilidad de *S. cerevisiae* para remover fumonisinas B1 (FB1) de medio líquido por absorción física (fisoabsorción) hacia la pared celular de la levadura, siendo factores determinantes tanto la concentración de la toxina como del microorganismo. En otro estudio, Gil-Serna *et al.* (2011) observaron una reducción

de ocratoxina A producida por *A. westerdijkiae* en presencia de *D. hansenii*, ellos demostraron que están involucrados dos importantes mecanismos (1) la inhibición de la biosíntesis de ocratoxinas a nivel transcripcional y (2) la adsorción de ocratoxinas por la pared celular de las levaduras. Los autores encontraron que el nivel de reducción de ocratoxina A fue dependiente de la cepa de *A. westerdijkiae* evaluada. A pesar de que esos mecanismos no se evaluaron en nuestro trabajo, es razonable plantear la hipótesis de que *D. hansenii* pudiera emplear un mecanismo similar en la reducción de la producción de fumonisinas por *F. subglutinans*. Se desconocen las razones de la falta de inhibición de la producción de fumonisinas de *F. proliferatum* por *D. hansenii*. El presente estudio sugiere que las especies fúngicas o las cepas y/o un cierto nivel de producción de fumonisinas pudieran ser factores determinantes en la activación de los mecanismos empleados para la reducción de fumonisinas. Sin embargo, esta hipótesis requiere ser estudiada más a fondo. La evaluación del potencial probiótico de levaduras o cualquier otro microorganismo, incluye ensayos de tolerancia a condiciones ácidas y a la presencia de sales biliares, con la finalidad de simular las condiciones que se presentan *in vivo* y son consideradas un prerrequisito necesario para ejercer sus efectos benéficos dentro del hospedero (Van der Aa Kühle *et al.*, 2005). Todas las cepas de levadura evaluadas en nuestro trabajo sobrevivieron (cerca al 100%) a la presencia de sales biliares (0.3%, 0.6% y 0.9%), y fueron capaces de crecer (> 75%) bajo condiciones de pH ácido (2.0, 2.5 y 3.0), lo que demostró su elevada resistencia a estas condiciones que se presentan normalmente a lo largo del tracto gastrointestinal. Nuestros resultados coinciden con las tasas de supervivencia superiores al 98% en condiciones de pH ácido y presencia de sales biliares reportadas por García-Hernández *et al.* (2012) usando cepas de levaduras aisladas de heces de pollos de engorda. Resultados similares fueron obtenidos con levaduras (*C. krusei*, *K. marxianus*, *C. tropicalis*, *C. rugosa*, *C. fabianii*, *C. norvegensis* y *Trichosporon asahii*) aisladas de Fura (alimento hecho a base de cereal fermentado del oeste de África), que fueron capaces de sobrevivir e incluso crecer bajo condiciones simuladas de tránsito a través del tracto gastrointestinal (Pedersen *et al.*, 2012). Las levaduras poseen una marcada capacidad de adherirse a superficies

abióticas, células y tejidos, característica de importancia en la medicina y la industria. La capacidad de adhesión es proporcionada por una clase especial de proteínas de pared celular, llamadas adhesinas (Verstrepen y Klis, 2006). En este estudio, se demostró la capacidad de adhesión a mucosa intestinal de cabra de *D. hansenii*, mediante el marcado de las cepas con DTAF en el ensayo de adhesión intestinal, todas las cepas marcadas mostraron afinidad por el mucus intestinal.

*D. hansenii* tiene la habilidad de sobrevivir a condiciones gastrointestinales de peces *in vitro* y la capacidad de adherirse con una alta afinidad a su mucosa intestinal (Tovar *et al.*, 2002; Reyes-Becerril *et al.*, 2008). Interesantemente, estudios previos han demostrado que algunas especies de levaduras, tales como *S. cerevisiae*, presentan la habilidad de adherirse y sobrevivir dentro del tracto gastrointestinal para ejercer su efecto probiótico en rumiantes (Magalhães *et al.*, 2008; Lesmeister *et al.*, 2004; Pinloche *et al.*, 2013; Uyeno *et al.*, 2015). Este fenómeno fue observado también por Reyes-Becerril (2008) cuando *D. hansenii* CBS 8339 marcada con DTAF mostró afinidad por el mucus intestinal de especies de peces marinos (*Mycteroperca rosacea* y *Sparus aurata*). Asimismo, se ha demostrado que la capacidad de las levaduras para adherirse al mucus intestinal del hospedero es un prerrequisito básico para su colonización (Perricone *et al.*, 2014).

Por otra parte, los  $\beta$ -glucanos son el mayor componente estructural de la pared celular de las levaduras, así mismo, son moléculas inmunoestimulantes, antimicrobianas, antivirales y antitumorales para muchas especies de animales (Kogan, 2000; Ma *et al.*, 2015). En este trabajo se obtuvo el contenido de  $\beta$ -glucanos de la biomasa liofilizada de cada una de las cepas de levadura empleadas, con la finalidad de determinar su actividad inmunoestimulante en leucocitos de sangre periférica de cabra mediante ensayos inmunológicos *in vitro*. En primer lugar, se determinó el rendimiento y se confirmó la presencia de  $\beta$ -glucanos en los extractos de levaduras. Nuestros resultados indicaron que el rendimiento de glucanos fue más alto en la cepa DhhBCS005 (11%), y el rendimiento más bajo se presentó en la cepa DhhBCS007 (6.6%). Del mismo modo, Sukumaran *et al.* (2010) encontraron que dos cepas marinas de *D. hansenii* tenían el mayor contenido de glucano

en torno al 12% de la biomasa total de levadura seca en comparación con otras especies de levadura. Sorprendentemente, Wilson *et al.* (2015) reportaron un rendimiento máximo de glucano de 20 y 27.5% para *D. nepalensis* y *D. fabryi*, respectivamente. Estas diferencias están asociadas al aislado de levadura en sí, ya que usamos el mismo método para la extracción de glucano. Curiosamente, en este estudio, la presencia de  $\beta$ -glucanos en el producto final del proceso de extracción se confirmó por espectroscopía de NMR. De acuerdo a varios reportes (Kardono *et al.*, 2013; Mursito *et al.*, 2010; Tada *et al.*, 2007), la expansión de las regiones espectrales alrededor de 3.2 a 4.6 ppm muestran los múltiples puntos de inflexión en las resonancias para el protón anomérico que demuestran la presencia de  $\beta$ -D-glucanos. Además, los glucanos inmunoestimuladores deben tener la propiedad de promover respuestas inmunes sin causar citotoxicidad en las células huésped (Moreno-Mendieta *et al.*, 2017). Aquí, ninguno de los glucanos extraídos tuvo efectos citotóxicos en los leucocitos de sangre periférica de cabra bajo las concentraciones probadas durante el ensayo de viabilidad celular, por lo tanto se pueden considerar seguros para las cabras. Además, la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) ha considerado que los glucanos de levadura son seguros como nuevo ingrediente alimentario para animales y humanos (EFSA, 2011).

Con el fin de conocer las propiedades inmunoestimulantes de los  $\beta$ -glucanos de *D. hansenii*, evaluamos las diversas actividades inmunológicas relacionadas en los leucocitos de cabra. La fagocitosis se inicia cuando el glucano es reconocido por el receptor dectin-1 en los fagocitos lo que desencadena la actividad antimicrobiana (Goodridge *et al.*, 2011). La actividad fagocítica implica la liberación de radicales libres tóxicos y enzimas para degradar a los microorganismos invasores, lo que puede mejorarse en los macrófagos de rumiantes estimulados con glucanos de levadura (Buddle *et al.*, 1988). Por lo tanto, una inmunoestimulación segura conlleva a leucocitos "entrenados" capaces de responder más rápido y de manera más eficiente contra los patógenos (Bekkering *et al.*, 2016). Nuestros resultados mostraron que la actividad fagocítica fue mayor en los leucocitos estimulados con las cepas DhhBCS001, DhhBCS002, DhhBCS003 y DhhBCS006 comparada con los

leucocitos no estimulados (tratamientos control). En rumiantes, la administración de *S. cerevisiae* o glucano de levadura aumentó el número de bacterias fagocitadas y muertas por los leucocitos (Hipíková *et al.*, 1993; Magalhães *et al.*, 2008). Se han obtenido resultados similares en neutrófilos porcinos y macrófagos estimulados con glucanos *in vitro* (Baert *et al.*, 2015). Así mismo, se demostró que *D. hansenii* es capaz de incrementar la actividad fagocítica en leucocitos aislados de riñón cefálico y bazo de pargo rojo del Pacífico, probablemente debido a la presencia de compuestos estructurales y secretorios inmunomoduladores que la levadura posee (Angulo *et al.*, 2017). En general, estos resultados también se han relacionado con la capacidad de los glucanos para promover la actividad de la quimiotaxis de los leucocitos en células estimuladas (Cheng *et al.*, 2004; Sato *et al.*, 2006). El óxido nítrico (ON) es un pequeño radical libre con múltiples funciones fisiológicas y patofisiológicas, posee una amplia distribución de síntesis y diversos mecanismos de acción.

Por otra parte, durante la fagocitosis, se activa la síntesis de óxido nítrico (ON) a partir de L-arginina a través de la ON sintasa (ONS). El ON es un pequeño radical libre que regula múltiples funciones fisiológicas y contribuye a matar células virales infectadas, células tumorales y patógenos, siendo esencial en la inflamación y la inmunidad (MacMicking *et al.*, 1997; Xu *et al.*, 2012). En este estudio, los  $\beta$ -glucanos de tres cepas de *D. hansenii* (DhhBCS004, DhhBCS005 y DhhBCS007) indujeron la producción de ON. También se observó una respuesta similar usando zymosan, un  $\beta$ -glucano obtenido de *S. cerevisiae*, en macrófagos derivados de monocitos bovinos (Jungi *et al.*, 1999). Curiosamente, la producción de ON inducida por la administración de  $\beta$ -glucano de levadura se ha asociado a la eficacia de los tratamientos inmuno-compatibles contra infecciones en lechones (Chethan *et al.*, 2017). Además de la biosíntesis de ON, el estallido respiratorio es un mecanismo posterior a la fagocitosis; y se asocia con un aumento en la liberación de especies reactivas de oxígeno (ROS) por las células fagocíticas mediante la activación de la NADPH oxidasa (Griendling y FitzGerald, 2003). Curiosamente, los cofactores ONS y NADPH también pueden inducir la generación de radicales superóxido de aniones no específicos a

través de la modulación biológica de ON (Xu *et al.*, 2000). Nuestros resultados mostraron que los leucocitos estimulados con  $\beta$ -glucano de DhhBCS003, DhhBCS005 y DhhBCS006 indujeron la mayor producción de ROS en comparación con el tratamiento control (PBS, células no estimuladas). De manera similar a nuestros resultados, Sonck *et al.* (2010) informaron que los  $\beta$ -glucanos de las levaduras también potenciaron la producción de ROS en leucocitos de sangre periférica porcina, probablemente a través de mecanismos mediados por los receptores delectina-1 y el receptor 3 del complemento (Baert *et al.*, 2015). En comparación, varios trabajos han destacado la actividad inmunoestimulante de los glucanos de levadura promoviendo la producción de ROS en leucocitos de peces (Jørgensen y Robertsen, 1995; Kudrenko *et al.*, 2009). Aun cuando las ROS son metabolitos reducidos de oxígeno para matar patógenos, a niveles elevados pueden provocar la citotoxicidad de las células del huésped (Muñoz-Atienza *et al.*, 2015). Por lo tanto, múltiples vías de señalización intracelular que controlan el estrés oxidativo pueden activarse para mantener la homeostasis celular, como las enzimas antioxidantes que juegan un papel importante en el equilibrio de la concentración de ROS (Case, 2017; Mahaseth y Kuzminov, 2017). En este sentido, SOD convierte el  $O_2^-$  en  $H_2O_2$ , que luego se convierte en agua y oxígeno por la CAT. En el caso de MPO, el  $H_2O_2$  y el ácido clorhídrico son sustratos que generan ácido hipocloroso, un compuesto altamente tóxico contra patógenos invasores. Curiosamente, en este estudio, las actividades de SOD y CAT fueron significativamente aumentadas en los leucocitos de sangre periférica de cabra estimulados con  $\beta$ -glucanos de *D. hansenii* en comparación con el grupo de control. Este efecto puede asociarse con el mecanismo antioxidante enzimático que mejora el equilibrio redox. Por el contrario, la mieloperoxidasa solo fue promovida por el lisado de la cepa DhhBCS002, así como los  $\beta$ -glucanos de DhhBCS001. En ratones y peces, la administración dietaria de glucanos de levadura conduce a una mejora significativa de las actividades de SOD, CAT y/o peroxidasa (Lei *et al.*, 2015; Guzmán-Villanueva *et al.*, 2014; Yuan *et al.*, 2009). Además, de forma similar a nuestros resultados, glucanos derivados de hongos marinos, *D. hansenii* y zymoza promovieron las actividades de SOD, CAT y mieloperoxidasa en leucocitos de peces estimulados (Angulo *et*

*al.*, 2017; Cárdenas-Reyna *et al.*, 2017). En general, el equilibrio redox se mantiene mediante la prevención, la intercepción y la reparación bajo mecanismos reguladores (Sies *et al.*, 2017) que podrían ser modulados por  $\beta$ -glucanos para dirigir la respuesta al estrés oxidativo sin comprometer la viabilidad celular.

## 9. CONCLUSIONES

La levadura marina *D. hansenii* BCS0003 inhibe el crecimiento micelial de hongos patógenos de maíz. La eficiencia de esta levadura para inhibir el crecimiento de los hongos patógenos se debió a los efectos sinérgicos de los mecanismos de competencia por nutrientes y espacio principalmente, y en menor grado por la producción de metabolitos extracelulares y compuestos volátiles. La cepa *D. hansenii* BCS0003 puede ser considerada como potencial agente bioprotector contra hongos toxigénicos en grano de maíz ya que nuestros resultados revelaron que reduce el contenido de fumonisinas en cocultivo con *F. subglutinans* comparado con los tratamientos control. El presente estudio es el primer reporte sobre las propiedades probióticas y la actividad inmunomoduladora de los  $\beta$ -glucanos derivados de *D. hansenii* en leucocitos de sangre periférica de cabra. Los resultados indicaron que todas las cepas de levadura evaluados en este trabajo mostraron potenciales propiedades probióticas, al presentar elevadas tasas de supervivencia e índices de crecimiento similares a los tratamientos control cuando fueron incubadas en condiciones equivalentes al tracto gastrointestinal de cabra, además de tener la capacidad de adherirse a la mucosa intestinal de caprino. Asimismo, los lisados y  $\beta$ -glucanos de las cepas DhhBCS001, DhhBCS003, DhhBCS004 y DhhBCS005 estimularon los diferentes parámetros inmunológicos evaluados sin afectar la viabilidad de los leucocitos de sangre periférica de caprinos. Con base en los resultados obtenidos, la cepa DhhBCS003 es un agente bioprotector potencial contra hongos fitopatógenos en grano de maíz y una levadura candidata por su potencial probiótico y propiedades inmunoestimulantes para su evaluación *in vivo* en caprinos.

## 10. LITERATURA CITADA

Abernethy, N. J., J. B. Hay. 1992. The recirculation of lymphocytes from blood to lymph: physiological considerations and molecular mechanisms. *Lymphology*. 25:1-30.

Acevedo, A., M. Pedroso, I. Miranda. 2001.  $\beta$ 1-3 glucano influencia sobre la inmunidad mediada por células en pollos jóvenes. *Rev. Cubana de Ciencia Avícola*. 25:107-112.

Aderem, A., R. J. Ulevitch. 2000. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature*. 406:782-787.

Alexandre, G., N. Mandonnet. 2005. Goat meat production in harsh environments. *Small Rumin. Res.* 60:53-66.

Ando, H., K. Hatanaka, I. Ohata, Y. Yamashita-Kitaguchi, A. Kurata, N. Kishimoto. 2012. Antifungal activities of volatile substances generated by yeast isolated from Iranian commercial cheese. *Food Control* 26:472-478.

Andrade, M. J., L. Thorsen, A. Rodríguez, J. J. Córdoba, L. Jespersen. 2014. Inhibition of ochratoxigenic moulds by *Debaryomyces hansenii* strains for biopreservation of dry-cured meat products. *Int. J. Food Microbiol.* 170:70-77.

Angulo, C., M. Maldonado, K. Delgado, M. Reyes-Becerril. 2017. *Debaryomyces hansenii* up regulates superoxide dismutase gene expression and enhances the immune response and survival in Pacific red snapper (*Lutjanus peru*) leukocytes after *Vibrio parahaemolyticus* infection. *Dev. Comp. Immunol.* 71:18-27.

AOAC, 2005. Official Methods of Analysis. 18a ed. Association of Official Analytical Chemists International. Gaithersburg, MD, EEUU.

Armando, M. R., C. A. Dogi, V. Poloni, C. A. R. Rosa, A. M. Dalcero, L. R. Cavaglieri. 2013. In vitro study on the effect of *Saccharomyces cerevisiae* strains on growth and mycotoxin production by *Aspergillus carbonarius* and *Fusarium graminearum*. *Int. J. Food Microbiol.* 161:182-188.

Baert, K., E. Sonck, B. M. Goddeeris, B. Devriendt, E. Cox. 2015. Cell type-specific differences in  $\beta$ -glucan recognition and signalling in porcine innate immune cells. *Dev. Comp. Immunol.* 48(1):192-203.

Baldwin, C. L., N. D. MacHugh, J. A. Ellis, J. Naessens, J. Newson, W. I. Morrison. 1988. Monoclonal antibodies which react with bovine T-lymphocyte antigens and induce blastogenesis: tissue distribution and functional characteristics of the target antigens.

Immunol. 63:439-446.

Banani, H., D. Spadaro, D. Zhang, S. Matic, A. Garibaldi, M. L. Gullino. 2015. Postharvest application of a novel chitinase cloned from *Metschnikowia fructicola* and overexpressed in *Pichia pastoris* to control brown rot of peaches. *Int. J. Food Microbiol.* 199:54-61.

Battilani, P., A. Pietri, C. Barbano, A. Scandolara, T. Bertuzzi, A. Marocco. 2008. Logistic regression modeling of cropping systems to predict fumonisin contamination in maize. *J. Agric. Food Chem.* 56:10433-10438.

Bautista-Rosales, P. U., M. Calderón-Santoyo, R. Servín-Villegas, N. A. Ochoa-Álvarez, J. A. Ragazzo-Sánchez. 2013. Action mechanisms of the yeast *Meyerozyma caribbica* for the control of the phytopathogen *Colletotrichum gloeosporioides* in mangoes. *Biol. Control.* 65:293-301.

Bautista-Rosales, P. U., M. Calderón-Santoyo, R. Servín-Villegas, N. A. Ochoa-Álvarez, R. Vázquez-Juárez, J. A. Ragazzo-Sánchez. 2014. Biocontrol action mechanisms of *Cryptococcus laurentii* on *Colletotrichum gloeosporioides* of mango. *Crop Prot.* 65:194-201.

Bekkering, S., B. A. Blok, L. A. Joosten, N. P. Riksen, R. van Crevel, M. G. Netea. 2016. *In vitro* experimental model of trained innate immunity in human primary monocytes. *Clin. Vaccine Immunol.* 23(12):926-933.

Bierer, B. E., B. P. Sleckman, S. E. Ratnofsky, S. J. Burakoff. 1989. The biologic roles of CD2, CD4, and CD8 in T-cell activation. *Annu. Rev. Immunol.* 7:579-599.

Bouchard, D. S., L. Rault, N. Berkova, Y. Le Loir, S. Even. 2013. Inhibition of *Staphylococcus aureus* invasion into bovine mammary epithelial cells by contact with live *Lactobacillus casei*. *Appl. Environ. Microbiol.* 79:877-885.

Brandtzaeg, P., F. R. Korsrud. 1984. Significance of different J chain profiles in human tissues: generation of IgA and IgM with binding site for secretory component is related to the J chain expressing capacity of the total local immunocyte population, including IgG and IgD producing cells, and depends on the clinical state of the tissue. *Clin. Exp. Immunol.* 58:709-718.

Breuer, A., H. Harms. 2006. *Debaryomyces hansenii* - an extremophilic yeast with biotechnological potential. *Yeast.* 23:415-437.

Brodaczewska, K., K. Donskow-Łysoniewska, M. Doligalska. 2015. Chitin, a key factor in immune regulation: lesson from infection with fungi and chitin bearing parasites. *Acta Parasitol.* 60(2):337-344.

Buddle, B. M., H. D. Pulford, M. Ralston. 1988. Protective effect of glucan against experimentally induced staphylococcal mastitis in ewes. *Vet. Microbiol.* 16(1):67-76.

Caja, G., E. González, C. Flores, M. D. Carro, E. Albanell. 2003. ALTERNATIVAS A LOS ANTIBIÓTICOS DE USO ALIMENTARIO EN RUMIANTES: PROBIÓTICOS, ENZIMAS Y ACIDOS ORGÁNICOS. Memoria de curso: XIX CURSO DE ESPECIALIZACION FEDNA, Madrid, España, 183-212.

Calvo-Garrido, C., N. Teixidó, J. Roudet, I. Viñas, J. Usall, M. Fermaud. 2014. Biological control of *Botrytis* bunch rot in Atlantic climate vineyards with *Candida sake* CPA-1 and its survival under limiting conditions of temperature and humidity. *Biol. Control.* 79:24-35.

Cárdenas-Reyna, T., C. Angulo, C. Guluarte, S. Hori-Oshima, M. Reyes-Becerril. 2017. *In vitro* immunostimulatory potential of fungal  $\beta$ -glucans in pacific red snapper (*Lutjanus peru*) cells. *Dev. Comp. Immunol.* 77:350-358.

Cárdenas-Reyna, T., C. Angulo, S. Hori-Oshima, E. Velázquez-Lizárraga, M. Reyes-Becerril. 2016. B-cell activating CpG ODN 1668 enhance the immune response of Pacific red snapper (*Lutjanus peru*) exposed to *Vibrio parahaemolyticus*. *Dev. Comp. Immunol.* 62:72-81.

Case, A. J. 2017. On the origin of superoxide dismutase: an evolutionary perspective of superoxide-mediated redox signaling. *Antioxidants* 6(4):82.

Castro, R., I. Zarra, J. Lamas. 2004. Water-soluble seaweed extracts modulate the respiratory burst activity of turbot phagocytes. *Aquaculture.* 229:67-78.

Cepeda, P. R. 2008. Producción de Caprinos: un enfoque técnico y social. Universidad Autónoma de Baja California Sur. Primera Edición. La Paz, B.C.S., México. 281p.

Chang, C. K., S. C. Wang, C. K. Chiu, S. Y. Chen, Z. T. Chen, P. D. Duh. 2015. Effect of lactic acid bacteria isolated from fermented mustard on immunopotentiating activity. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* 5:281-286.

Chaucheyras-Durand, F., E. Chevaux, C. Martin, E. Forano. 2012. Use of yeast probiotics in ruminants: Effects and mechanisms of action on rumen pH, fiber degradation, and microbiota according to the diet. *Vet. Med. Sci. InTech.*

Check, W. 2004. Innate immunity depends on Toll-like receptors. *ASM News.* 70:317-322.

Cheng, Y. H., D. N. Lee, C. M. Wen, C.F. Weng. 2004. Effects of  $\beta$ -glucan supplementation on

lymphocyte proliferation, macrophage chemotaxis and specific immune responses in broilers. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 17:1145-1149.

Chethan, G. E., J. Garkhal, S. Sircar, Y. P. S. Malik, R. Mukherjee, N. R. Sahoo, R. K. Agarwal, U. K. De. 2017. Immunomodulatory potential of  $\beta$ -glucan as supportive treatment in porcine rotavirus enteritis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 191:36-43.

Coelho, A. R., M. Tachi, F. C. Pagnocca, G. M. A. Nobrega, F. L. Hoffmann, K. I. Harada, E. Y. Hirooka. 2009. Purification of *Candida guilliermondii* and *Pichia ohmeri* killer toxin as an active agent against *Penicillium expansum*. *Food Addit. Contam.* 26:73-81.

Di Domenico, A. S., D. Christ, E. H. Hashimoto, C. Busso, S. R. M. Coelho. 2015. Evaluation of quality attributes and the incidence of *Fusarium* sp. and *Aspergillus* sp. in different types of maize storage. *J. Stored. Prod. Res.* 61:59-64.

Di Francesco, A., L. Ugolini, L. Lazzeri, M. Mari. 2015. Production of volatile organic compounds by *Aureobasidium pullulans* as a potential mechanism of action against postharvest fruit pathogens. *Biol. Control.* 81:8-14.

EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA); Scientific Opinion on the safety of "Yeast beta-glucans" as a Novel Food ingredient. *EFSA Journal* 2011; 9(5) 2137, 22 pp.

Emery, D. L., N. D. MacHugh, W. I. Morrison. 1988. *Theileria parva* (Muguga) infects bovine T-lymphocytes in vivo and induces coexpression of BoT4 and BoT8. *Parasite Immunol.* 10:379-391.

Engstad, R. E., B. Robertsen, E. Frivold. 1992. Yeast glucan induces increase in lysozyme and complement-mediated haemolytic activity in Atlantic salmon blood. *Fish Shellfish Immunol.* 2:287-297.

Estrada, A., A. Van Kessel, B. Laarveld. 1999. Effect of administration of oat beta-glucan on immune parameters of healthy and immunosuppressed beef steers. *Can. J. Vet. Res.* 63:261-268.

Fajardo, P., L. Pastrana, J. Méndez, I. Rodríguez, C. Fuciños, N. P. Guerra. 2012. Effects of Feeding of Two Potentially Probiotic Preparations from Lactic Acid Bacteria on the Performance and Faecal Microflora of Broiler Chickens. *Scientific World J.* 2012:1-9.

FAO, commodity database. 2006. FaoStat. <http://faostat.fao.org/site/569/default.aspx#ancor>. Accesado: 20 Octubre 2014.

Fialho, M. B., L. Toffano, M. P. Pedroso, F. Augusto, S. F. Pascholati. 2010. Volatile organic compounds produced by *Saccharomyces cerevisiae* inhibit the in vitro development of *Guignardia citricarpa*, the causal agent of citrus black spot. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 26:925-932.

Fiori, S., P. P. Urgeghe, W. Hammami, S. Razzu, S. Jaoua, Q. Migheli. 2014. Biocontrol activity of four non- and low-fermenting yeast strains against *Aspergillus carbonarius* and their ability to remove ochratoxin A from grape juice. *Int. J. Food Microbiol.* 189:45-50.

García-Hernández, Y., Z. Rodríguez, L. R. Brandão, C. A. Rosa, J. R. Nicoli, I. A. Elías, T. Pérez-Sanchez, S. R. Boucourt, N. Halaihel. 2012. Identification and in vitro screening of avian yeasts for use as probiotic. *Res. Vet. Sci.* 93:798-802.

Generoso, S. V., M. Viana, R. Santos, F. S. Martins, J. A. Machado, R. M. Arantes, J. R. Nicoli, M. I. T. D. Correia, V. N. Cardoso. 2010. *Saccharomyces cerevisiae* strain UFMG 905 protects against bacterial translocation, preserves gut barrier integrity and stimulates the immune system in a murine intestinal obstruction model. *Arch. Microbiol.* 192:477-484.

Gil-Rodríguez, A. M., A. V. Carrascosa, T. Requena. 2015. Yeasts in foods and beverages: In vitro characterisation of probiotic traits. *LWT-Food Sci. Technol.* 64(2):1156-1162.

Gil-Serna, J., B. Patiño, L. Cortés, M. T. González-Jaén, C. Vázquez. 2011. Mechanisms involved in reduction of ochratoxin A produced by *Aspergillus westerdijkiae* using *Debaryomyces hansenii* CYC 1244. *Int. J. Food Microbiol.* 151:113-118.

Giorni, P., C. Dall'Asta, R. Gregori, M. Cirilini, G. Galaverna, P. Battilani. 2015. Starch and thermal treatment, important factors in changing detectable fumonisins in maize post-harvest. *J. Cereal Sci.* 61:78-85.

Goodridge, H. S., C. N. Reyes, C. A. Becker, T. R. Katsumoto, J. Ma, A. J. Wolf, N. Bose, A. S. H. Chan, A. S. Magee, M. E. Danielson, A. Weiss, J. P. Vasilakos, D. M. Underhill. 2011. Activation of the innate immune receptor Dectin-1 upon formation of a "phagocytic synapse". *Nature* 472(7344):471-475.

Grenier, B., T. J. Applegate. 2013. Modulation of intestinal functions following mycotoxin ingestion: Meta-analysis of published experiments in animals. *Toxins.* 5:396-430.

Griendling, K. K., G. A. FitzGerald. 2003. Oxidative stress and cardiovascular injury. *Circulation* 108:2034-2040.

Guo, J., W. Fang, H. Lu, R. Zhu, L. Lu, X. Zheng, T. Yu. 2014. Inhibition of green mold disease in mandarins by preventive applications of methyl jasmonate and antagonistic yeast

*Cryptococcus laurentii*. Postharvest Biol. Technol. 88:72-78.

Guzmán-Villanueva, L. T., F. Ascencio-Valle, M. E. Macías-Rodríguez, D. Tovar-Ramírez. 2014. Effects of dietary  $\beta$ -1,3/1,6-glucan on the antioxidant and digestive enzyme activities of Pacific red snapper (*Lutjanus peru*) after exposure to lipopolysaccharides. Fish Physiol. Biochem. 40(3):827-837.

Hatoum, R., S. Labrie, I. Fliss. 2012. Antimicrobial and probiotic properties of yeasts: from fundamental to novel applications. Front. Microbiol. 3:1-12.

Hein, W. R., C. R. Mackay. 1991. Prominence of  $\gamma\delta$  T cells in the ruminant immune system. Immunol. Today. 12:30-34.

Hernández, A., A. Martín, M. G. Córdoba, M. J. Benito, E. Aranda, F. Pérez-Nevado. 2008. Determination of killer activity in yeasts isolated from the elaboration of seasoned green table olives. Int. J. Food Microbiol. 121:178-188.

Hernández Montiel, L. G. 2009. Mecanismos antagónicos de *Debaryomyces hansenii* hacia *Penicillium italicum* y su efecto en la protección poscosecha del limón mexicano. Tesis de Doctorado. La Paz, B.C.S., México. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste. 100p.

Hernández-Montiel, L. G., J. Holguín-Peña, M. G. López-Aburto, E. Troyo-Diéguez. 2011. Control poscosecha de *Geotrichum citri-aurantii* en limón mexicano (*Citrus aurantifolia* [Christm.] Swingle) mediante levaduras marinas y epífitas. Uciencia. 27:191-198.

Hernández-Montiel, L. G., J. L. Ochoa, E. Troyo-Diéguez, C. P. Larralde-Corona. 2010. Biocontrol of postharvest blue mold (*Penicillium italicum* Wehmer) on Mexican lime by marine and citrus *Debaryomyces hansenii* isolates. Postharvest Biol. Technol. 56:181-187.

Hernández-Saavedra, N. Y. 1990. Marine yeast isolated from the west coast of B.C.S., México. Yeast Newsl. 39(2):40.

Hipíková, V., J. Mojzisoová, V. Bajová, D. Takáčová, L. Strojný. 1993. Evaluation of indicators of cellular immunity in experimental infectious bovine rhinotracheitis virus infection in calves treated with glucan. Vet. Med. (Praha) 38(7):385-394.

HogenEsch, H., P. J. Felsburg. 1992. Isolation and phenotypic and functional characterization of cells from Peyer's patches in the dog. Vet. Immunol. Immunopathol. 31: 1-10.

Huang, R., H. J. Che, J. Zhang, L. Yang, D. H. Jiang, G. Q. Li. 2012. Evaluation of *Sporidiobolus pararoseus* strain YCXT3 as biocontrol agent of *Botrytis cinerea* on post-harvest strawberry

fruits. Biol. Control. 62:53-63.

Ingram, L. O., T. M. Buttke. 1984. Effects of alcohols on micro-organisms. Adv. Microb. Physiol. 25:253-300.

Izgu, D. A., R. A. Kepekci, F. Izgu. 2011. Inhibition of *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum* *in vitro* and *in planta* with Panomycocin, a novel exo- $\beta$ -1,3- glucanase isolated from *Pichia anomala* NCYC 434. Antonie Van Leeuwenhoek 99:85-91.

Jørgensen, J. B., B. Robertsen. 1995. Yeast  $\beta$ -glucan stimulates respiratory burst activity of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) macrophages. Dev. Comp. Immunol. 19:43-57.

Jungi, T. W., P. Valentin-Weigand, M. Brcic. 1999. Differential induction of NO synthesis by Gram-positive and Gram-negative bacteria and their components in bovine monocyte-derived macrophages. Microb. Pathog. 27(1):43-53.

Kamilya, D., D. Ghosh, S. Bandyopadhyay, B. C. Mal, T. K. Maiti. 2006. *In vitro* effects of bovine lactoferrin, mushroom glucan and Abrus agglutinin on Indian major carp, catla (*Catla catla*) head kidney leukocytes. Aquaculture. 253:130-139.

Kardono, L. B. S., I. P. Tjahja, N. Artanti, J. Manuel. 2013. Isolation, Characterization and  $\alpha$ -glucosidase Inhibitory Activity of Crude Beta Glucan from Silver Ear Mushroom (*Tremella fuciformis*). J. Biol. Sci. 13:406-411.

Kemenade, B. M. L. V., A. Groeneveld, B. T. T. M. Rens, J. H. W. M. Rombout. 1994. Characterization of macrophages and neutrophilic granulocytes from the pronephros of carp (*Cyprinus carpio*). J. Exp. Biol. 187:143-158.

Kogan, G. 2000. (1 $\rightarrow$ 3,1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glucans of yeasts and fungi and their biological activity. Stud. Nat. Prod. Chem. 23:107-152.

Kudrenko, B., N. Snape, A. C. Barnes. 2009. Linear and branched  $\beta$ (1-3) D-glucans activate but do not prime teleost macrophages *in vitro* and are inactivated by dilute acid: Implications for dietary immunostimulation. Fish Shellfish Immunol. 26(3):443-450.

Lahlali, R., Y. Hamadi, R. Drider, C. Misson, M. El Guilli, M. H. Jijakli. 2014. Control of citrus blue mold by the antagonist yeast *Pichia guilliermondii* Z1: Compatibility with commercial fruit waxes and putative mechanisms of action. Food Control. 45:8-15.

Landsverk, T., M. Halleraker, M. Aleksandersen, S. McClure, W. Hein, L. Nicander. 1991. The intestinal habitat for organized lymphoid tissues in ruminants; comparative aspects of structure, function and development. Vet. Immunol. Immunopathol. 28:1-16.

Lee, C. H., N. S. Paek, D. S. Kim, K. H. Kim. 2002. Effects of a *Paecilomyces japonica*-supplemented diet on the chemiluminescent response of phagocytes and growth in juvenile olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Aquaculture*. 208:51-57.

Lee, J., I. Park, Y. Choi, J. Cho. 2012. *Bacillus* strains as feed additives: In vitro evaluation of its potential probiotic properties. *Rev. Colomb. Cienc. Pec.* 25:577-585.

Lei, N., M. Wang, L. Zhang, S. Xiao, C. Fei, X. Wang, K. Zhang, W. Zheng, C. Wang, R. Yang, F. Xue. 2015. Effects of low molecular weight yeast  $\beta$ -glucan on antioxidant and immunological activities in mice. *Int. J. Mol. Sci.* 16(9):21575-21590.

Lesmeister, K. E., A. J. Heinrichs, M. T. Gabler. 2004. Effects of supplemental yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) culture on rumen development, growth characteristics, and blood parameters in neonatal dairy calves. *J. Dairy Sci.* 87:1832-1839.

Lillbro, M. 2005. Biocontrol of *Penicillium roquefortii* on grain - a comparison of mode of action of several yeast species. Master thesis for the Agriculture Programme, animal science, performed at the Department of Microbiology. Swedish University of Agricultural Sciences. 21p.

Lima, J. R., L. R. B. Goncalves, L. R. Brandão, C. A. Rosa, F. M. P. Viana. 2013. Isolation, identification and activity *in vitro* of killer yeasts against *Colletotrichum gloeosporioides* isolated from tropical fruits. *J. Basic Microbiol.* 53:590-599.

Liu, D., L. Ding, J. Sun, N. Boussetta, E. Vorobiev. 2016. Yeast cell disruption strategies for recovery of intracellular bio-active compounds—A review. *Innov. Food. Sci. Emerg. Technol.* 36:181-192.

Liu, J., Y. Sui, M. Wisniewski, S. Droby, Y. Liu. 2013. Review: Utilization of antagonistic yeasts to manage postharvest fungal diseases of fruit. *Int. J. Food Microbiol.* 167:153-160.

Liu, P., L. Luo, C. Long. 2013. Characterization of competition for nutrients in the biocontrol of *Penicillium italicum* by *Kloeckera apiculata*. *Biol. Control.* 67:157-162.

Liu, S. Q., M. Tsao. 2009. Biocontrol of dairy moulds by antagonistic dairy yeast *Debaryomyces hansenii* in yoghurt and cheese at elevated temperatures. *Food Control.* 20:852-855.

Lu, H., L. Lu, L. Zeng, D. Fu, H. Xiang, T. Yu, X. Zheng. 2014. Effect of chitin on the antagonistic activity of *Rhodosporidium paludigenum* against *Penicillium expansum* in apple fruit. *Postharvest Biol. Technol.* 92:9-15.

Lu, L., H. Lu, C. Wu, W. Fang, C. Yu, C. Ye, Y. Shi, T. Yu, X. Zheng. 2013. *Rhodosporidium paludigenum* induces resistance and defense-related responses against *Penicillium digitatum* in citrus fruit. *Postharvest Biol. Technol.* 85:196-202.

Lutz, M. C., C. A. Lopes, M. E. Rodriguez, M. C. Sosa, M. P. Sangorrín. 2013. Efficacy and putative mode of action of native and commercial antagonistic yeasts against postharvest pathogens of pear. *Int. J. Food Microbiol.* 164:166-172.

Ma, T., Y. Tu, N. F. Zhang, J. P. Guo, K. D. Deng, Y. Zhou, Q. Yun, Q. Y. Diao. 2015. Effects of dietary yeast  $\beta$ -glucan on nutrient digestibility and serum profiles in pre-ruminant Holstein calves. *J. Integr. Agric.* 14:749-757.

Macedo-Barragán, R., V. Arredondo-Ruiz, R. Rodríguez-Ramírez, A. Rosales-Serrano, A. Larios-González. 2009. Efecto de la adición de un cultivo de levaduras y de la ración sobre la degradación *in vitro* y productividad de corderos Pelibuey. *Téc. Pecu. Méx.* 47:41-53.

MacHugh, N. D., P. Sopp. 1991. Bovine CD8 (BoCD8). *Vet. Immunol. Immunopathol.* 27:65-69.

Mackay, C. R., J. F. Maddox, M. R. Brandon. 1987. Lymphocyte antigens of sheep: identification and characterization using a panel of monoclonal antibodies. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 17:91-102.

MacMicking, J., Q. W. Xie, C. Nathan. 1997. Nitric oxide and macrophage function. *Annu. Rev. Immunol.* 15(1):323-350.

Magan, N., D. Aldred. 2007. Post-harvest control strategies: minimizing mycotoxins in the food chain. *Int. J. Food Microbiol.* 119:131-139.

Magalhães, V. J. A., F. Susca, F. S. Lima, A. F. Branco, I. Yoon, J. E. P. Santos. 2008. Effect of feeding yeast culture on performance, health, and immunocompetence of dairy calves. *J. Dairy Sci.* 91:1497-1509.

Mahaseth, T., A. Kuzminov. 2017. Potentiation of hydrogen peroxide toxicity: from catalase inhibition to stable DNA-iron complexes. *Mutat. Res. Rev. Mutat. Res.* 773:274-281.

Maoura, N., M. Mbaiguinam, H. V. Nguyen, C. Gaillardin, J. Pourquie. 2005. Identification and typing of the yeast strains isolated from bili bili, a traditional sorghum beer of Chad. *Afr. J. Biotechnol.* 4:646-656.

Marquina, D., J. Barroso, A. Santos, J. M. Peinado. 2001. Production and characteristics of

*Debaryomyces hansenii* killer toxin. Microbiol. Res. 156:387-391.

Marrack, P., J. Kappler. 1986. The antigen-specific, major histocompatibility complex-restricted receptor on T cells. Adv. Immunol. 38:1-30.

Martínez Camacho, R.A. 2016. *Debaryomyces hansenii* como agente de control biológico y modulador del contenido de compuestos bioactivos en microgreens como plataforma alimentaria. Tesis de Maestría. La Paz, B.C.S., México. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste. 89p.

Masoud, W., L. Poll, M. Jakobsen. 2005. Influence of volatile compounds produced by yeasts predominant during processing of *Coffea arabica* in East Africa on growth and ochratoxin A (OTA) production by *Aspergillus ochraceus*. Yeast. 22:1133-1142.

Matic, S., D. Spadaro, A. Garibaldi, M. L. Gullino. 2014. Antagonistic yeasts and thermotherapy as seed treatments to control *Fusarium fujikuroi* on rice. Biol. Control. 73:59-67.

Medzhitov, R. 2001. Toll-like receptors and innate immunity. Nat. Rev. Immunol. 1:135-145.

Mehlomakulu, N. N., M. E. Setati, B. Divol. 2014. Characterization of novel killer toxins secreted by wine-related non-Saccharomyces yeasts and their action on *Brettanomyces* spp. Int. J. Food Microbiol. 188:83-91.

Moreno-Mendieta, S., D. Guillén, R. Hernández-Pando, S. Sánchez, R. Rodríguez-Sanoja. 2017. Potential of glucans as vaccine adjuvants: A review of the  $\alpha$ -glucans case. Carbohydr. Polym. 165:103-114.

Mosmann, T. R., H. Cherwinski, M. W. Bond, M. A. Giedlin, R. L. Coffman. 1986. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. J. Immunol. 136:2348-2357.

Mosmann, T. R., R. L. Coffman. 1989. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. Annu. Rev. Immunol. 7:145-173.

Muñoz-Atienza, E., C. Araújo, N. Lluch, P. E. Hernández, C. Herranz, L. M. Cintas, S. Magadán. 2015. Different impact of heat-inactivated and viable lactic acid bacteria of aquatic origin on turbot (*Scophthalmus maximus* L.) head-kidney leucocytes. Fish Shellfish Immunol. 44:214-223.

Mursito, B., U. A. Jenie, S. Mubarika, L. B. S. Kardono. 2010. Isolation of  $\beta$ -(1-3) glucan compound from the water extract of indonesian jamur tanduk (*Termitomyces eurirrhizus*

Berk). Pak. J. Biol. Sci. 13:847-851.

Mylona, K., E. Kogkaki, M. Sulyok, N. Magan. 2014. Efficacy of gaseous ozone treatment on spore germination, growth and fumonisin production by *Fusarium verticillioides* *in vitro* and *in situ* in maize. J. Stored. Prod. Res. 59:178-184.

Nally, M. C., V. M. Pesce, Y. P. Maturano, L. A. Rodriguez-Assaf, M. E. Toro, L. I. Castellanos de Figueroa, F. Vazquez. 2015. Antifungal modes of action of *Saccharomyces* and other biocontrol yeasts against fungi isolated from sour and grey rots. Int. J. Food Microbiol. 204:91-100.

Nally, M. C., V. M. Pesce, Y. P. Maturano, C. J. Muñoz, M. Combina, M. E. Toro, L. I. Castellanos de Figueroa, F. Vázquez. 2012. Biocontrol of *Botrytis cinerea* in table grapes by non-pathogenic indigenous *Saccharomyces cerevisiae* yeasts isolated from viticultural environments in Argentina. Postharvest Biol. Technol. 64:40-48.

Nally, M. C., V. M. Pesce, Y. P. Maturano, M. E. Toro, M. Combina, L. I. Castellanos de Figueroa, F. Vazquez. 2013. Biocontrol of fungi isolated from sour rot infected table grapes by *Saccharomyces* and other yeast species. Postharvest Biol. Technol. 86:456-462.

Navarro, J. A., M. R. Caro, J. Seva, M. C. Rosillo, M. A. Gomez, M. C. Gallego. 1996. Study of lymphocyte subpopulations in peripheral blood and secondary lymphoid organs in the goat using monoclonal antibodies to surface markers of bovine lymphocytes. Vet. Immunol. Immunopathol. 51:147-156.

Neumann, N. F., D. Fagan, M. Belosevic. 1995. Macrophage activating factor (s) secreted by mitogen stimulated goldfish kidney leukocytes synergize with bacterial lipopolysaccharide to induce nitric oxide production in teleost macrophages. Dev. Comp. Immunol. 19:473-482.

Newman, S. G. 1999. A review of the use of non specific immune-stimulants to reduce the impact of WSSV. Fifth Ecuadorian Aquaculture Conference October 28-30. Lynnwood, WA 98037.

Nicolaisen, M., S. Suproniene, L. K. Nielsen, I. Lazzaro, N. H. Spliid, A. F. Justesen. 2008. Real-time PCR for quantification of eleven individual *Fusarium* species in cereals. J. Microbiol. Methods. 76:234-240.

Núñez, F., M. S. Lara, B. Peromingo, J. Delgado, L. Sánchez-Montero, M. J. Andrade. 2015. Selection and evaluation of *Debaryomyces hansenii* isolates as potential bioprotective agents against toxigenic penicillia in dry-fermented sausages. Food Microbiol. 46:114-120.

O'Hara, A. M., P. O'Regan, A. Fanning, C. O'Mahony, J. Macsharry, A. Lyons, J. Bienenstock,

- L. O'Mahony, F. Shanahan. 2006. Functional modulation of human intestinal epithelial cell responses by *Bifidobacterium infantis* and *Lactobacillus salivarius*. *Immunology*. 118:202-215.
- Oro, L., A. Feliziani, M. Ciani, G. Romanazzi, F. Comitini. 2014. Biocontrol of postharvest brown rot of sweet cherries by *Saccharomyces cerevisiae* Disva 599, *Metschnikowia pulcherrima* Disva 267 and *Wickerhamomyces anomalus* Disva 2 strains. *Postharvest Biol. Technol.* 96:64-68.
- Pallares, F. J., J. Seva, A. Bernabe, J. A. Navarro. 1999. Characterization and distribution of B cells in the lymphoid organs of goats. *Anat. Histol. Embryol.* 28:171-176.
- Patel, B., P. Kumar, R. Banerjee, M. Basu, A. Pal, M. Samanta, S. Das. 2016. *Lactobacillus acidophilus* attenuates *Aeromonas hydrophila* induced cytotoxicity in catla thymus macrophages by modulating oxidative stress and inflammation. *Mol. Immunol.* 75:69-83.
- Pedersen, L. L., J. Owusu-Kwarteng, L. Thorsen, L. Jespersen. 2012. Biodiversity and probiotic potential of yeasts isolated from Fura, a West African spontaneously fermented cereal. *Int. J. Food Microbiol.* 159:144-151.
- Perricone, M., A. Bevilacqua, M. R. Corbo, M. Sinigaglia. 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 Microbiol.* 38:26-35.
- Pietrella, D., R. Cherniak, C. Strappini, S. Perito, P. Mosci, F. Bistoni, A. Vecchiarelli. 2001. Role of mannoprotein in induction and regulation of immunity to *Cryptococcus neoformans*. *Infect. Immun.* 69:2808-2814.
- Pinloche, E., N. McEwan, J. P. Marden, C. Bayourthe, E. Auclair, C. J. Newbold. 2013. The effects of a probiotic yeast on the bacterial diversity and population structure in the rumen of cattle. *PLoS One* 8(7), e67824.
- Pizzolitto, R. P., M. A. Salvano, A. M. Dalcero. 2012. Analysis of fumonisin B1 removal by microorganisms in co-occurrence with aflatoxin B1 and the nature of the binding process. *Int. J. Food Microbiol.* 156:214-221.
- Platania, C., C. Restuccia, S. Muccilli, G. Cirvilleri. 2012. Efficacy of killer yeasts in the biological control of *Penicillium digitatum* on Tarocco orange fruits (*Citrus sinensis*). *Food Microbiol.* 30:219-225.
- Quade, M. J., J. A. Roth. 1997. A rapid, direct assay to measure degranulation of bovine

neutrophil primary granules. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 58:239-248.

Raeder, U., P. Broda. 1985. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. *Lett. Appl. Microbiol.* 1:17-20.

Reyes Becerril, M. C. 2008. Efecto de la levadura marina *Debaryomyces hansenii* CBS 8339 en la dieta sobre la respuesta inmune de la cabrilla sardinera *Mycteroperca rosacea* y la dorada *Sparus aurata*. Tesis de Doctorado. La Paz, B.C.S., México. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste. 115p.

Reyes-Becerril, M., E. Alamillo, A. Trasviña, I. Hirono, H. Kondo, W. Jirapongpaioj, F. Ascencio-Valle, C. Angulo. 2017. *In vivo* and *in vitro* studies using larval and adult antigens from *Neobenedenia melleni* on immune response in yellowtail (*Seriola lalandi*). *J. Fish Dis.* 1-13.

Reyes-Becerril, M., F. Ascencio-Valle, I. Hirono, H. Kondo, W. Jirapongpaioj, M. A. Esteban, E. Alamillo, C. Angulo. 2016. TLR21's agonists in combination with *Aeromonas* antigens synergistically up-regulate functional TLR21 and cytokine gene expression in yellowtail leucocytes. *Dev. Comp. Immunol.* 61:107-115.

Reyes-Becerril, M., F. Ascencio-Valle, D. Tovar-Ramírez, J. Meseguer, M. Á. Esteban. 2011a. Effects of polyamines on cellular innate immune response and the expression of immune-relevant genes in gilthead seabream leucocytes. *Fish & shellfish immunology*, 30:248-254.

Reyes-Becerril, M., I. Salinas, A. Cuesta, J. Meseguer, D. Tovar-Ramirez, F. Ascencio-Valle, M. Á. Esteban. 2008. Oral delivery of live yeast *Debaryomyces hansenii* modulates the main innate immune parameters and the expression of immune-relevant genes in the gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish Shellfish Immunol.* 25:731-739.

Reyes-Becerril, M., T. López-Medina, F. Ascencio-Valle, M. Á. Esteban. 2011b. Immune response of gilthead seabream (*Sparus aurata*) following experimental infection with *Aeromonas hydrophila*. *Fish Shellfish Immunol.* 31:564-570.

Rheeder, J. P., W. F. O. Marasas, H. F. Vismer. 2002. Production of fumonisin analogs by *Fusarium* species. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:2101-2105.

Riss, T. L., R. A. Moravec, A. L. Niles, S. Duellman, H. A. Benink, T. J. Worzella, L. Minor. 2016. Cell viability assays.

Robertsen, B. 1999. Modulation of the non-specific defence of fish by structurally conserved microbial polymers. *Fish Shellfish Immunol.* 9:269-290.

- Rodríguez, A., M. Esteban, J. Meseguer. 2003. Phagocytosis and peroxidase release by seabream (*Sparus aurata* L.) leucocytes in response to yeast cells. *Anat. Rec.* 272:415-423.
- Rondón Barragán, I. S. 2004. Inmunoestimulantes en medicina veterinaria. *Orinoquia.* 8:56-75.
- Rosa, C., G. Peter. 2006. Biodiversity and ecophysiology of yeasts. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Germany. 579p.
- Sato, T., K. Iwabuchi, I. Nagaoka, Y. Adachi, N. Ohno, H. Tamura, K. Seyama, Y. Fukuchi, H. Nakayama, F. Yoshizaki, K. Takamori, H. Ogawa. 2006. Induction of human neutrophil chemotaxis by *Candida albicans*-derived  $\beta$ -1,6-long glycoside side-chain-branched  $\beta$ -glucan. *J. Leukoc. Biol.* 80:204-211.
- Seva, J., F. J. Pallarés, M. A. Gómez, A. Bernabé, J. A. Navarro. 1999. Sistema inmunitario asociado al intestino en la cabra: distribución y evolución de las poblaciones linfocitarias. *An. Vet. (Murcia).* 15:43-58.
- Seva, J., J. A. Navarro, A. Bernabe, M. A. Gomez, J. Sanchez, S. Gomez. 1998. Postnatal development of lymphocyte subpopulations in the intestinal lymph nodes in goats. *Anat. Histol. Embryol.* 27:345-349.
- Shinde, A. K., S. K. Sankhyan, R. Bhatta, D. L. Verma. 2000. Seasonal changes in nutrient intake and its utilization by range goats in a semi-arid region of India. *J. Agric. Sci.* 135:429-436.
- Sies, H., C. Berndt, D. P. Jones. 2017. Oxidative stress. *Annu. Rev. Biochem.* 86:715-748
- Silanikove, N. 2000. The physiological basis of adaptation in goats to harsh environments. *Small Rumin. Res.* 35:181-193.
- Simoncini, N., A. Pinna, T. Toscani, R. Virgili. 2015. Effect of added autochthonous yeasts on the volatile compounds of dry-cured hams. *Int. J. Food Microbiol.* 212:25-33.
- Simoncini, N., R. Virgili, G. Spadola, P. Battilani. 2014. Autochthonous yeasts as potential biocontrol agents in dry-cured meat products. *Food Control.* 46:160-167.
- Sonck, E., E. Stuyven, B. Goddeeris, E. Cox. 2010. The effect of  $\beta$ -glucans on porcine leukocytes. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 135:199-207.
- Sotillo-Mesanza, J., C. Gutierrez-Panizo, J. A. Carrizosa-Durán. 2009. Tests for research: The importance of goat milk. *REDVET. Rev. electrón. vet.* 10:1695-7504.

- Spadaro, D., A. Lorè, A. Garibaldi, M. L. Gullino. 2013. A new strain of *Metschnikowia fructicola* for postharvest control of *Penicillium expansum* and patulin accumulation on four cultivars of apple. *Postharvest Biol. Technol.* 75:1-8.
- Sukumaran, V., D. W. Lowman, T. P. Sajeevan, R. Philip. 2010. Marine yeast glucans confer better protection than that of baker's yeast in *Penaeus monodon* against white spot syndrome virus infection. *Aquac. Res.* 41(12):1799-1805.
- Szkal, A. K., M. H. Kosco, J. G. Tew. 1989. Microanatomy of lymphoid tissue during humoral immune responses: structure function relationships. *Annu. Rev. Immunol.* 7:91-109.
- Tada, R., T. Harada, N. Nagi-Miura, Y. Adachi, M. Nakajima, T. Yadomae, N. Ohno. 2007. NMR characterization of the structure of a  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-D-glucan isolate from cultured fruit bodies of *Sparassis crispa*. *Carbohydr. Res.* 342:2611-2618.
- Tellez, G., G. Pixley, R. E. Wolfenden, S. L. Layton, B. M. Hargis. 2012. Probiotics/direct fed microbials for *Salmonella* control in poultry. *Food Res. Int.* 45:628-633.
- Tiago, F. C., F. S. Martins, C. A. Rosa, R. M. Nardi, D. C. Cara, J. R. Nicoli. 2009. Physiological characterization of non-Saccharomyces yeasts from agro-industrial and environmental origins with possible probiotic function. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 25:657-666.
- Ting, A. S. Y., J. Y. Chai. 2015. Chitinase and b-1,3-glucanase activities of *Trichoderma harzianum* in response towards pathogenic and non-pathogenic isolates: early indications of compatibility in consortium. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 4:109-113.
- Tizard, I. 2009. *Inmunología veterinaria*. Edit. Mc Graw-Hill Interamericana. Octava Edición. México. 592p.
- Thompson, R. S., T. A. S. Aveling, P. R. Blanco. 2013. A new semi-selective medium for *Fusarium graminearum*, *F. proliferatum*, *F. subglutinans* and *F. verticillioides* in maize seed. *S. Afr. J. Bot.* 84:94-101.
- Toki, S., S. Kagaya, M. Shinohara, H. Wakiguchi, T. Matsumoto, Y. Takahata, F. Morimatsu, H. Saito, K. Matsumoto. 2009. *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Lactobacillus casei* suppress *Escherichia coli*-induced chemokine expression in intestinal epithelial cells. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 148:45-58.
- Tovar, D., J. Zambonino, C. Cahu, F. J. Gatesoupe, R. Vazquez-Juarez, R. Lesel. 2002. Effect of live yeast incorporation in compound diet on digestive enzyme activity in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Aquaculture* 204:113-123.

- Trotta, F., G. Caldini, L. Dominici, E. Federici, R. Tofalo, M. Schirone, A. Corsetti, G. Suzzi, G. Cenci. 2012. Food borne yeasts as DNA-bioprotective agents against model genotoxins. *Int. J. Food Microbiol.* 153:275-280.
- Uyeno, Y., S. Shigemori, T. Shimosato. 2015. Effect of probiotics/prebiotics on cattle health and productivity. *Microbes Environ.* 30(2):126-132.
- Van der Aa Kühle, A., K. Skovgaard, L. Jespersen. 2005. *In vitro* screening of probiotic properties of *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* and food-borne *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Int. J. Food Microbiol.* 101:29-39.
- Van Ewijk, W. 1991. T-cell differentiation is influenced by thymic microenvironments. *Annu. Rev. Immunol.* 9:591-615.
- Venkitaraman, A. R., G. T. Williams. 1991. The B-cell antigen receptor of the five immunoglobulin classes. *Nature.* 352:777.
- Verstrepen, K. J., F. M. Klis. 2006. Flocculation, adhesion and biofilm formation in yeasts. *Mol. Microbiol.* 60:5-15.
- Waititu, S. M., F. Yin, R. Patterson, A. Yitbarek, J. C. Rodriguez-Lecompte, C. M. Nyachoti. 2017. Dietary supplementation with a nucleotide-rich yeast extract modulates gut immune response and microflora in weaned pigs in response to a sanitary challenge. *animal.* 1-9.
- Wang, X. X., Z. Chi, Y. Peng, X. H. Wang, S. G. Ru, Z. M. Chi. 2012. Purification, characterization and gene cloning of the killer toxin produced by the marine-derived yeast *Williopsis saturnus* WC91-2. *Microbiol. Res.* 167:558-563.
- Weiler, F., M. J. Schmitt. 2003. Zygocin, a secreted antifungal toxin of the yeast *Zygosaccharomyces bailii*, and its effect on sensitive fungal cells. *FEMS Yeast Res.* 3:69-76.
- Williams, D. L., R. B. McNamee, E. L. Jones, H. A. Pretus, H. E. Ensley, I. W. Browder, N. R. Di Luzio. 1991. A method for the solubilization of a (1→3)-β-D-glucan isolated from *Saccharomyces cerevisiae*. *Carbohydr. Res.* 219:203-213.
- Wilson, W., D. Lowman, S. P. Antony, J. Puthumana, I. B. Singh, R. Philip. 2015. Immune gene expression profile of *Penaeus monodon* in response to marine yeast glucan application and white spot syndrome virus challenge. *Fish Shellfish Immunol.* 43:346-356.
- Xu, K. Y. 2000. Does nitric oxide synthase catalyze the synthesis of superoxide?. *FEBS Lett.* 474(2-3):252-253.

- Xu, X., M. Yasuda, M. Mizuno, H. Ashida. 2012.  $\beta$ -Glucan from *Saccharomyces cerevisiae* reduces lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in RAW264.7 macrophages. *Biochim. Biophys. Acta.* 1820:1656-1663.
- Yazar, S., G. Z. Omurtag. 2008. Fumonisin, trichothecenes and zearalenone in cereals. *Int. J. Mol. Sci.* 9:2062-2090.
- Yu, B., J. R. Liu, F. S. Hsiao, T. T. Lee, P. W. S. Chiou. 2008. The probiotic and adherence properties of *Lactobacillus reuteri* Pg4 expressing the rumen microbial  $\beta$ -Glucanase. *Asian-australas. J. Anim. Sci.* 21:1324-1329.
- Yuan, C., X. Huang, L. Cheng, Y. Bu, G. Liu, F. Yi, Z. Yang, F. Song. 2009. Evaluation of antioxidant and immune activity of *Phellinus ribis* glucan in mice. *Food Chem.* 115:581-584.
- Zhou, Y., L. Deng, K. Zeng. 2014. Enhancement of biocontrol efficacy of *Pichia membranaefaciens* by hot water treatment in postharvest diseases of citrus fruit. *Crop Prot.* 63:89-96.
- Zhou, Y., J. Ming, L. Deng, K. Zeng. 2014. Effect of *Pichia membranaefaciens* in combination with salicylic acid on postharvest blue and green mold decay in citrus fruits. *Biol. Control.* 74:21-29.
- Zhu, C., J. Shi, C. Jiang, Y. Liu. 2015. Inhibition of the growth and ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* and *Aspergillus ochraceus* in vitro and in vivo through antagonistic yeasts. *Food Control.* 50:125-132.
- Živković, M., N. Čadež, K. Uroić, M. Miljković, M. Miljković, P. Doušova, B. Kos, J. Šušković, P. Raspor, L. Topisirović, N. Golić. 2015. Evaluation of probiotic potential of yeasts isolated from traditional cheeses manufactured in Serbia and Croatia. *J. Intercult. Ethnopharmacol.* 4(1):12-18.