



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

Debaryomyces hansenii COMO AGENTE DE CONTROL
BIOLÓGICO Y MODULADOR DEL CONTENIDO DE
COMPUESTOS BIOACTIVOS EN MICROGREENS COMO
PLATAFORMA ALIMENTARIA

TESIS

Que para obtener el grado de

Maestra en Ciencias

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

P r e s e n t a

Rubí Alejandra Martínez Camacho

La Paz, Baja California Sur, noviembre de 2016.

ACTA DE LIBERACIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 10 horas del día 14 del Mes de noviembre del 2016, 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:

" *Debaryomyces hansenii* como agente de control biológico y modulador del contenido de compuestos bioactivos en microgreens como plataforma alimentaria"


Presentada por el alumno:

Rubí Alejandra Martínez Camacho

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

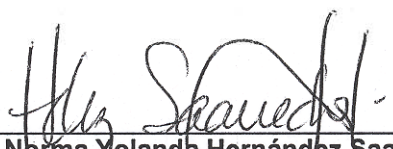
Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACIÓN DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA


DR. Felipe de Jesús Ascencio Valle
Director de Tesis


DR. David Raúl López Aguilar
Co-Tutor


DR. Kurt Mendgen
Co-Tutor


Dra. Norma Yolanda Hernández Saavedra,
Directora de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos Humanos

Comité tutorial

Dr. Felipe de Jesús Ascencio Valle, Director de tesis.

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, SC. (CIBNOR)

Dr. David Raúl López Aguilar, Co-tutor de tesis.

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, SC. (CIBNOR)

Dr. Kurt Mendgen, Co-tutor de tesis.

Universidad de Constanz

Comité revisor de tesis

Dr. Felipe de Jesús Ascencio Valle

Dr. David Raúl López Aguilar

Dr. Kurt Mendgen

Jurado examen de grado

Dr. Felipe de Jesús Ascencio Valle

Dr. Kurt Mendgen

Dra. Thelma Rosa Castellanos Cervantes

Resumen

Una alternativa para el consumo de alimentos funcionales es el uso de plataformas alimentarias como los microvegetales, mejor conocidos como “microgreens”. Aunque se sabe que estas plataformas proveen grandes beneficios a la salud, también son transmisores de enfermedades por contaminación cruzada (bacterias) e infecciones fúngicas por manejo post-cosecha. Para evitar esto, este trabajo propone el uso de la levadura *Debaryomyces hansenii* como agente tripartita, actuando como agente de biocontrol, modulador de compuestos bioactivos en plantas e inmunoestimulante. Lo anterior, evaluando microgreens como potencial plataforma alimentaria de *D. hansenii*. Para lograrlo, la primera etapa fue evaluar a *D. hansenii* de origen marino como agente de control biológico contra *Aspergillus flavus*, *Salmonella typhimurium* y *Escherichia coli* O157:H7 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 70% de la germinación de esporas, logrando colonizar cuatro especies de microgreens. Estudios de microscopía confocal mostraron colonización tipo biopelícula siendo el grosor de está dependiente del tipo de superficie, exhibiendo a la levadura como un agente de biocontrol de amplio espectro. Los análisis nutricionales y de HPLC/MS (tras la aplicación de *D. hansenii*) mostraron un aumento significativo ($P < 0.05$) en los niveles proteicos, energéticos y de compuestos bioactivos como ácido málico, ácido gálico, luteolina, entre otros, en cinco especies de microgreens. Estos compuestos podrían estar asociados al fenómeno de biocontrol de la levadura. Por último, la funcionalidad como inmunoestimulante utilizando microgreens como plataforma alimentaria fue evaluada en *Gallus gallus domesticus* como aditivo alimentario. Los estudios histomorfológicos arrojan que la administración de *D. hansenii* no afecta 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. Se observó mayor expresión relativa significativa ($P < 0.05$) de estos genes en tejido de duodeno. Lo anterior sugiere que el suministro de *D. hansenii* utilizando microgreens como plataforma alimentaria presenta un efecto inmunoestimulante en *G. gallus domesticus*.

Palabras clave: *Debaryomyces hansenii*, microgreens, inmunoestimulante,

Vo. Bo.

Dr. Felipe de Jesús Ascencio Valle
Director de Tesis

Summary

An alternative to consume edible food that contained additional properties is using food matrix of microgreens. It is well known that microgreens provide positive benefits to human health, also they are transmitters of human foodborne ills like bacterial contamination and present fungal infections by postharvest handling. To avoid those problems, this research work used the yeast *D. hansenii* as tripartite agent, acting like biocontrol agent, plant bioactive compound modulator and immunostimulant. Thus, microgreens assessment as potential food matrix of *D. hansenii*. To achieve it, first step was assessing marine origin *D. hansenii* as biocontrol agent against *Aspergillus flavus*, *Salmonella* Typhimurium and *Escherichia coli* O157:H7 above five microgreens species *Ocimum basilicum*, *Amaranthus cruentus*, *Eruca sativa*, *Brassica oleracea* var. *gemmifera* and *Anethum graveolens*. Yeast application inhibited almost 80% ($P < 0.05$) of bacterial growth, as well as, 70% ($P < 0.05$) of fungal spore germination, achieving yeast colonization on four microgreen species; confocal laser scanning microscopy showed a biofilm colonization, biofilm depth is dependent of colonization surface, showing a wide spectrum biocontrol agent. Nutritional and HPLC/MS analysis of microgreens after *D. hansenii* application showed a significant increase ($P < 0.05$) on protein, energy and medical bioactive compounds as malic acid, gallic acid, luteolin, among others, on five microgreen species. These bioactive compounds levels could be related to biocontrol process showed by *D. hansenii*. Last step, food matrix immunostimulant functionality was assessed in *Gallus gallus domesticus* as supplementary food. Histomorphological studies showed that *D. hansenii* supply was not affecting in a negative way gastrointestinal morphology of model organism. Digestive and immune system was assessed using *AMY2A* and *IL8* gene, respectively. Significant relative expression ($P < 0.05$) in duodenum tissue was observed. Results are suggesting a food matrix based on microgreens as delivery vehicle of *D. hansenii* with positive immune and digestive effects on *G. gallus domesticus*.

Key words: *Debaryomyces hansenii*, microgreens, immunostimulant.

Vo. Bo.

Dr. Felipe de Jesús Ascencio Valle
Director de Tesis

Dedicatoria

Al universo por permitirme ser...

A mi madre, porque me has amado en libertad, me has dejado volar.

Lux et veritas...

Agradecimientos

Al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S. C.

Al Programa de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos Humanos, por el apoyo brindado a lo largo del estudio de mi Maestría y por el apoyo económico para mi estancia en Alemania.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por las beca número 335812 otorgada para la obtención de mi grado y la beca mixta para la realización de mi estancia en Alemania.

Al proyecto PAC de CIBNOR, SC.

A mi Director de tesis, el Dr. Felipe de Jesús Ascencio Valle, por todo su apoyo para dar término a este proyecto, por la confianza, por su invaluable y sincera amistad, y por todos los buenos consejos que me brindó.

A mi cotutor, el Profesor Dr. Kurt Mendgen, por el gran voto de confianza al aceptarme como alumna, por la gran oportunidad de recibirme en su casa y dejarme entrar tanto a su familia como a su país.

A mi cotutor, el Dr. David Raúl López Aguilar, por el apoyo y comentarios recibidos para dar término a este proyecto.

A la Dra. Norma Yolanda Hernández Saavedra por sus extensas y atinadas revisiones, Lic. Leticia González Rubio Rivera, Lic. Claudia Elizabeth Olachea León, Lic. Osvelia Ibarra Morales, Tania Verónica Núñez Valdez por su apoyo tan cálido y humano en relación a trámites y consejos administrativos.

Al Lic. Horacio Sandoval Gómez, muchas gracias por su invaluable asistencia técnica informática que permitió que esta tesis llegara a buenos términos.

A la M. C. Diana Dorantes por su invaluable ayuda con la edición del idioma inglés en todos los textos presentados.

Al técnico del Laboratorio de Patogénesis Microbiana, Dra. Martha Candelaria Reyes Becerril, por su inimaginable apoyo para que este trabajo tuviera éxito.

Al M. C. Julio Antonio Hernández, técnico del Laboratorio de Biología Molecular de Plantas por todo su apoyo.

A la Dra. Angélica Villaruel, de la Universidad de Guadalajara, por el apoyo brindado respecto a las cepas bacterianas.

Al técnico Arturo Sierra Beltrán del Laboratorio de Proteómica por su invaluable apoyo en la implementación y análisis de HPLC/MS para compuestos bioactivos en microgreens.

Al técnico Ariel Arturo Cruz Villacorta, por todos sus consejos, asistencia y apoyo en los análisis y toma de micrografías por Microscopia Electrónica de Barrido (MEB). De verdad que agradezco todo el conocimiento que compartiste conmigo y todos los buenos momentos.

Al Ing. Teófilo Cortés, dueño del grupo Avicola Huichapa, por la confianza y facilidades recibidas para la realización del bioensayo con *Gallus gallus domesticus*.

Al técnico Biol. Patricia Hinojosa Baltazar, del Laboratorio de Genética Molecular y Fisiología Comparada, por su invaluable apoyo.

Al responsable del Bioterio, el Dr. Amaury Cordero Tapia, por su invaluable apoyo y consejos para el manejo del organismo *G. gallus domesticus*.

A la Dra. Carmen Rodríguez, del Laboratorio de Histología, por su gran apoyo en el análisis de fotografías.

A la Universidad de Hohenheim en Stuttgart (Alemania), específicamente al Instituto de Fitomedicina-Laboratorio de Fitopatología por el apoyo y facilidades recibidas durante mi estancia.

Al decano del Instituto de Fitomedicina, Dr. Ralf Voegele, por abrir las puertas de su laboratorio, por el congreso al que me envió, por el viaje a Konstanz, y por las largas charlas microbiológicas durante el mismo. Sólo me queda agradecer el apoyo y conocimiento recibido.

A los técnicos del Laboratorio de Fitopatología Heike Popovitsh y Bianca Maiwald.

A la adorable y profesional técnico del área de microscopía del Laboratorio de Fitopatología, Barbara Kaufman.

A mis amigos y colegas del Laboratorio Fitopatología: Anna Hummrich, Behnoush Hosseini, Daniela Hirschburger, Grace Ngatia, Johanna HoB, Marco Winkelman, Abbas El-Hasan.

De manera muy especial a Janina Seitz, Polina Tretakiova y Rohit Sharma, por todo el apoyo, momentos de risa, por la confianza para dejarme entrar en su vida por un breve pero amoroso lapso de tiempo.

A mi más grande apoyo y pilar, mi mami Yamile Camacho Flores, como siempre he dicho, gracias por amarme en libertad, por no detenerme aunque te doliera verme volar, eres mi mayor fortaleza, te amo.

A la persona que más quiero en este mundo, mi hermano Rubén Alejandro Martínez Camacho, por ser mi mayor motivación para seguir, viajar y lograrlo con una sonrisa.

A mi grande y amorosa familia, a mi nana María Seferina Flores Ramírez por el amor derramado sobre mí; a mi tía Nereida Camacho Flores, por todos sus consejos y palabras de aliento; a mi prima Aurora Del Carmen Willars Camacho,

por todos sus consejos y confianza; a mi tía Nicolasa Camacho Flores, porque sin usted nada de esto hubiera sido posible.

A mis hermanas del corazón Lic. Lytzma Ruíz y Lic. Bethzaida González por siempre estar, las quiero.

A mi amiga-hermana-cómplice europea, Chef Paola Del Carmen Garfias Solorio, no tengo palabras para describir lo mucho que te quiero y que valoro todo lo que has hecho por mí, te quiero mucho.

A mi hermana de corazón, IBQ. Delia Verónica Sánchez Cervantes por todo su apoyo técnico, así como, por todo su cariño y sincera hermandad, por estar cuando más necesitaba encontrar el rumbo, te quiero mucho Penélope.

Al Ing. Mauricio Sánchez, porque estuvo cuando más lo necesitaba, gracias de verdad por darme la oportunidad de vivir de una mejor manera, con mayor felicidad.

A mis amigos y compañeros de posgrado, Ing. Ricardo Galicia, Ing. Erick Gutiérrez, Ibq. Crystal Guluarte y de manera muy especial al Ing. Sergio David Valerio Landa, por ayudarme en todo lo que estuvo en sus manos, y por aceptarme cual terca soy, gracias sinceras.

A mi ave fénix favorita, a ti, mi hermana de corazón, por todo el apoyo técnico recibido, por los consejos y regañadas, por las tardes de cálida charla y música triste, por los viajes y conciertos, gracias por dejarme ser yo sin prejuicios, muchas gracias M.C. Ylenia Murillo Higuera. Te quiero con todo el corazón y más.

A ti, que sin temor a equivocarme puedo llamarte amigo y hermano del corazón, gracias por creer en mí, por darme palabras de aliento, por dejarme entrar en tu vida, por compartir viajes, tardes de chisme y conciertos, por todo el apoyo técnico y de conocimiento recibido, muchas gracias M. C. Hamid Armando Tejas Álvarez. Ahora sí, ya casi, casi te quiero.

A todas y cada una de las personas que aportaron algo a este trabajo que no tuve oportunidad de mencionar, muchas gracias.

A mi compañero de viaje. Gracias porque en los momentos que la vida me dio una golpiza, tú me levantaste, me sacudiste y me ayudaste a seguir luchando. Sin importar lo que pase mañana, hasta hoy tú siempre habrás tenido una influencia positiva para lograr esta meta. Te amo con toda mi alma. A ti, Ing. Víctor Guillermo Valles Amador.

Contenido

Resumen.....	I
Summary.....	II
Dedicatoria.....	III
Agradecimientos.....	IV
Lista de figuras.....	XIII
Lista de tablas.....	XV
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	3
2.1. Cultivos como microgreens. Contexto nacional.....	3
2.1.1 <i>Ocimum basilicum</i> . Importancia económica.....	3
2.1.2 <i>Amaranthus cruentus</i> . Importancia económica.....	3
2.1.3 <i>Eruca sativa</i> . Importancia económica.....	4
2.1.4 <i>Brassica oleracea</i> var. <i>gemmifera</i> . Importancia económica.....	4
2.1.5 <i>Anethum graveolens</i> . Importancia económica.....	4
2.2 Causas de pérdida en post-cosecha.....	5
2.2.2 Medidas de control para enfermedades post-cosecha.....	6
2.2.3 Control Biológico.....	6
2.2.3.1 <i>Uso de levaduras como control biológico</i>	7
2.2.3.2 <i>Uso de D. hansenii</i> como agente de control.....	8
2.2.3.3 <i>Generalidades de Debaryomyces hansenii</i>	8
2. 3 Compuestos bioactivos: Microgreens.....	9
2.3.1 Microgreens.....	9
2.3.2 Ácido ascórbico.....	9
2.3.3 Carotenoides y tocoferoles.....	10
2.3.4 Filoquinonas.....	10
2.3.5 Flavonoles glicosilados y ácidos orgánicos.....	11
2.3.6 <i>D. hansenii</i> como modulador de compuestos bioactivos.....	11
2.4 Plataforma alimentaria: Microgreens.....	11
2.4.1 Vehículo de probióticos.....	12
2.4.2 Probióticos.....	12
2.4.2.1 <i>Mecanismos de acción de un probiótico</i>	12
2.4.2.2 <i>D. hansenii</i> como probiótico.....	13

3. PREGUNTA CIENTÍFICA.....	14
4. HIPOTESIS.....	14
5. OBJETIVOS.....	15
5.1 Objetivo general.....	15
5.2 Objetivos particulares.....	15
6. JUSTIFICACIÓN.....	16
6.1 Importancia Científica.....	16
6.2 Importancia Tecnológica.....	16
6.3 Importancia para el desarrollo.....	16
6.3.1 Pertinencia Económica.....	16
6.3.2 Pertinencia Ambiental.....	17
6.3.3 Pertinencia Social.....	17
7. MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
7.1 plantas y microorganismos.....	18
7.1.1 <i>D. hansenii</i>	18
7.1.2 Microgreens.....	19
7.1.3 Patógenos.....	19
7.2 Control biológico.....	20
7.2.1 Evaluación in vitro.....	20
7.2.2 Evaluación in vivo.....	20
7.2.2.1 <i>Ganancia de peso</i>	21
7.2.2.2 <i>Bioensayos</i>	21
7.2.2.2.1 <i>Influencia en la germinación</i>	21
7.2.2.2.2 <i>Dinámica poblacional</i>	21
7.2.2.2.3 <i>Pretratamiento con D. hansenii</i>	22
7.2.2.2.4 <i>Desplazamiento de patógeno. Dosis única</i>	23
7.2.2.2.5 <i>Desplazamiento del patógeno. Múltiples dosis</i>	23
7.2.3 Microscopía Electrónica de Barrido (MEB).....	23
7.2.4 Microscopía Electrónica de Barrido Confocal (MEBC) y microscopía confocal.....	24
7.2.4 Microscopía Electrónica de Reflexión (MER).....	25
7.3 Evaluación de compuestos bioactivos.....	26
7.3.2 Evaluación de tocoferoles.....	26
7.3.3 Evaluación de carotenoides.....	26
7.3.4 Evaluación de polifenoles.....	27
7.3.5 Análisis químico proximal. Análisis nutricionales.....	27
7.3.5.1 <i>Energía (Kcal/g)</i>	27
7.3.5.2 <i>Proteína (%)</i>	28
7.3.5.4 <i>Lípidos (g)</i>	28

7.3.5.3 Humedad (%) y peso fresco (g).....	28
7.3.5.4 Fibra (%).....	28
7.4 Microgreens como vehículo para <i>d. Hansenii</i>	29
7.4.1 Dietas.....	29
7.4.2 Bioensayo en <i>G. gallus</i>	29
7.4.2.1 Muestreo.....	30
7.4.3 Análisis histológico.....	30
7.4.4.1 Diseño de cebadores.....	30
7.4.4.2 Evaluación de temperatura de alineamiento para cebadores.....	31
7.4.4 Extracción de ARN y síntesis de ADNc	31
7.4.3 Curva de calibración y RT-qPCR.....	32
7.5 Análisis estadístico.....	33
8. RESULTADOS	34
8.1 Control biológico.	34
8.1.1 Evaluación <i>in vitro</i>	34
8.1.2 Evaluación <i>in vivo</i>	34
8.1.2.1 Ganancia de peso.....	34
8.1.2.2 Influencia en la germinación	36
8.1.2.3 Dinámica poblacional.....	38
8.1.2.4 Pre-tratamiento.....	38
8.1.2.5 Desplazamiento patogénico y dosis única.....	41
8.1.2.6 Desplazamiento patogénico y múltiples dosis	41
8.1.2.6 Colonización de <i>D. hansenii</i> sobre microgreens.....	41
8.1.3 Evaluación de la aplicación del tratamiento con <i>D. hansenii</i>	47
8.2 Evaluación de compuestos bioactivos	49
8.2.1 Análisis químico proximal. Análisis nutricional	49
8.2.2 Evaluación de vitaminas hidrosolubles	49
8.2.3 Evaluación de polifenoles y flavonoides	50
8.3 Microgreens como vehículo para <i>D. hansenii</i>	59
8.3.1 Evaluación de la influencia sobre el desarrollo	59
8.3.2 Evaluación de la influencia histológica de la plataforma alimentaria.....	59
8.3.3 Evaluación de la influencia de la plataforma alimentaria sobre la expresión génica	60
8.3.3.1 Diseño de cebadores.....	60
8.3.3.2 Temperatura de alineamiento de cebadores	62
8.3.3.3 Expresión relativa de genes	63
9. DISCUSIÓN	65
9.1 Control biológico	65
9.2 Contenido nutricional y compuestos bioactivos.....	70
9.3 Plataforma alimentaria. Evaluación en pollos de engorda	74
10. CONCLUSIONES	77

11. LITERATURA CITADA.....	78
12. ANEXOS	89
12.1 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE REFLEXIÓN (MER)	89
12.1.1 Interacción <i>Aspergillus flavus</i> – <i>Debaryomyces hansenii</i>	89

Lista de figuras

Figura 1. Concepto de microgreens como plataforma alimentaria	2
Figura 2. Actividad in vitro de <i>D. hansenii</i> contra <i>E. coli</i> O157:H7, <i>S. typhimurium</i> y <i>A. flavus</i> en medio líquido YEPD	35
Figura 3. Ganancia de peso de <i>O. basilicum</i> , <i>A. cruentus</i> , <i>E. sativa</i> , <i>B. oleracea</i> var. <i>gemmifera</i> y <i>A. graveolens</i> en estadio de microgreen y tratados con <i>D. hansenii</i> mediante aspersión sobre las especies de microgreen el día 3 después de la germinación	36
Figura 4. Influencia de <i>D. hansenii</i> sobre la germinación de <i>O. basilicum</i> , <i>A. cruentus</i> , <i>E. sativa</i> , <i>A. graveolens</i> y <i>B. oleracea</i> var. <i>gemmifera</i> en estadio de microgreen	37
Figura 5. Inhibición de colonización fúngica y bacteriana en cinco especies de plantas en estadio de microgreen tratados con <i>D. hansenii</i> el día 1 después de la germinación	39
Figura 6. Pretratamiento con <i>D. hansenii</i> de cinco especies de plantas en estadio de microgreen	40
Figura 7. Desplazamiento de los patógenos adheridos por la presencia de <i>D. hansenii</i> en microgreens después de 2 días de tratamiento	42
Figura 8. Desplazamiento del patógeno adherido en microgreens tratados con <i>D. hansenii</i> cada 48 horas	43
Figura 9. Colonización de <i>D. hansenii</i> al día 10 después de su inoculación sobre la superficie de albahaca y amaranto	43
Figura 10. Colonización de <i>D. hansenii</i> al día 10 después de su inoculación sobre col de Bruselas, arugula y eneldo	45
Figura 11. Conformación especial de <i>D. hansenii</i> sobre hojas de cuatro especies de microgreen	46
Figura 12. Liberación de matriz extracelular por <i>D. hansenii</i> sobre diferentes especies de microgreens	47
Figura 13. Mapa de calor de la aplicación del tratamiento con <i>D. hansenii</i> por patógeno inhibido	48
Figura 14. Evaluación de vitaminas hidrosolubles por HPLC/LSM en cinco especies de microgreens expuestos a <i>D. hansenii</i>	51

Figura 15. Evaluación de polifenoles y flavonoides más representativos en microgreen de albahaca (<i>O. basillicum</i>) expuestos a <i>D. hansenii</i>	56
Figura 16. Evaluación de polifenoles y flavonoides más representativos en microgreen de amaranto (<i>A. cruentus</i>) expuestos a <i>D. hansenii</i>	56
Figura 17. Evaluación de polifenoles y flavonoides más representativos en microgreen de arugula (<i>E. sativa</i>) expuestos a <i>D. hansenii</i>	57
Figura 18. Evaluación de polifenoles y flavonoides más representativos en microgreen de col de Bruselas (<i>B. oleracea</i> var. <i>gemmifera</i>) expuestos a <i>D. hansenii</i>	57
Figura 19. Evaluación de polifenoles y flavonoides más representativos en microgreen de eneldo (<i>A. graveolens</i>) expuestos a <i>D. hansenii</i>	58
Figura 20. Prueba de temperatura de alineamiento de cebadores para RT-qPCR en gel de agarosa al 1.5%	63
Figura 21. Evaluación de la plataforma alimentaria (<i>D. hansenii</i> + <i>A. cruentus</i>) en estadio de microgreen como plataforma alimentaria	64

Lista de tablas

Tabla I. Criterios a evaluar en un microorganismo probiótico	13
Tabla II. Dietas experimentales para evaluar microgreens como plataforma alimentaria de <i>D. hansenii</i>	29
Tabla III. Estandarización de temperatura de alineamiento de cebadores para RT-qPCR	32
Tabla IV. Evaluación nutricional de cinco especie de microgreens expuestas a tratamiento con <i>D. hansenii</i>	49
Tabla V. Comparación del contenido de compuestos bioactivos en microgreens de albahaca (<i>O. basillicum</i>) expuestos a <i>D. hansenii</i> y otras estrategias de protección	52
Tabla VI. Comparación del contenido de compuestos bioactivos en microgreens de amaranto (<i>A. cruentus</i>) expuestos a <i>D. hansenii</i> y otras estrategias de protección	52
Tabla VII. Comparación del contenido de compuestos bioactivos en microgreens de arúgula (<i>E. sativa</i>) expuestos a <i>D. hansenii</i> y otras estrategias de protección	53
Tabla VIII. Comparación del contenido de compuestos bioactivos en microgreens de col de brúselas (<i>B. oleracea</i> var. <i>gemmifera</i>) expuestos a <i>D. hansenii</i> y otras estrategias de protección	54
Tabla IX. Comparación del contenido de compuestos bioactivos en microgreens de eneldo (<i>A. graveolens</i>) expuestos a <i>D. hansenii</i> y otras estrategias de protección	55
Tabla X. Efecto de la plataforma alimentaria sobre el crecimiento de pollos de engorda a través del tiempo	59
Tabla XI. Efecto de la suplementación de aditivos alimentarios sobre parámetros histomorfológicos en duodeno de pollos de engorda	60
Tabla XII. Diseño de cebadores para el Sistema inmune de pollos de engorda	61
Tabla XIII. Diseño de cebadores para el Sistema digestivo de pollos de engorda	62

1. INTRODUCCIÓN

Una alternativa para el consumo de alimentos con alguna propiedad adicional es el uso de plataformas alimentarias como los microvegetales, conocidos mundialmente como microgreens (Xiao *et al.*, 2012). Los microgreens son vegetales inmaduros producidos a partir de semillas y hierbas, que han desarrollado completamente los cotiledones y pueden tener o no las primeras hojas verdaderas, generalmente presentan alturas entre 2.5-7.6 cm, y su cultivo se da entre 7 y 14 días (Xiao *et al.*, 2013). La ingesta de microgreens en pequeñas cantidades provee al cuerpo cerca del 89% del requerimiento vitamínico diario (Pattinson *et al.*, 2004). Diversos estudios han demostrado que existe una relación entre el consumo de vegetales y la reducción en el desarrollo de enfermedades crónicas, como enfermedades cardiovasculares y cáncer (Sani *et al.*, 2004). El origen de esto se cree son las grandes cantidades de compuestos bioactivos como: ácido ascórbico (vitamina C), carotenos (como β -caroteno o provitamina A), filoquinonas (principalmente vitamina K), tocoferoles (vitamina E), entre muchos otros (Gao *et al.*, 2012; Xiao *et al.*, 2012). Aunque estos vegetales presentan muchas ventajas también han presentado riesgo de contaminación cruzada (bacterias que afectan a humanos) e infecciones fúngicas (manejo post-cosecha) (Xiao *et al.*, 2014). Para combatir esto se han implementado desde métodos tradicionales como el uso de compuestos clorados hasta diversos tipos de radiación (Thind, 2012; Topcu *et al.*, 2015), lo que no ha resultado muy conveniente dado que se disminuye la cantidad de compuestos bioactivos de la planta, por ello una alternativa es el uso de control biológico. En este método se utiliza un agente (bacteria, hongo, levadura) para mitigar el crecimiento patógeno. En este sentido, se ha utilizado a *Debaryomyces hansenii* como agente de control biológico en diversos tipos de cultivos post-cosecha y hortalizas (Hernández *et al.*, 2010; Martínez-Camacho, 2014). Esta cepa de levadura fue aislada de medio marino, es cosmopolita y presenta tolerancia a altas

concentraciones de sal; se ha reportado como moduladora de diversos compuestos aromáticos en plantas y presenta funcionalidad como probiótico (Ochoa *et al.*, 2004; Prista *et al.*, 2007; Guneser *et al.*, 2015; Reyes-Becerril *et al.*, 2008a,b). Al presentar *D. hansenii* la característica de probiótico y colonizar un microgreen (que es un alimento funcional), el sistema se convierte en una matriz/plataforma alimentaria (Fig. 1) dado que se define a una matriz alimentaria como aquel alimento funcional que sea utilizado como vehículo de un probiótico, prebiótico o simbiótico (Zúñiga *et al.*, 2012). Existen múltiples estudios donde se han utilizado jugos de frutas, granos de cereal y barras de chocolate como plataformas alimentarias (Furtado *et al.*, 2013), sin embargo el uso de vegetales ha sido poco estudiado (Chen *et al.*, 2012; Jood *et al.*, 2012; Yu *et al.* 2012). Por tanto, el aumento de personas con intolerancia a la lactosa y vegetarianismo, así como con dietas estrictas de colesterol, reafirma la importancia del desarrollo de productos matriciales de probióticos no fermentados como los vegetales (Ranadheera *et al.*, 2010).

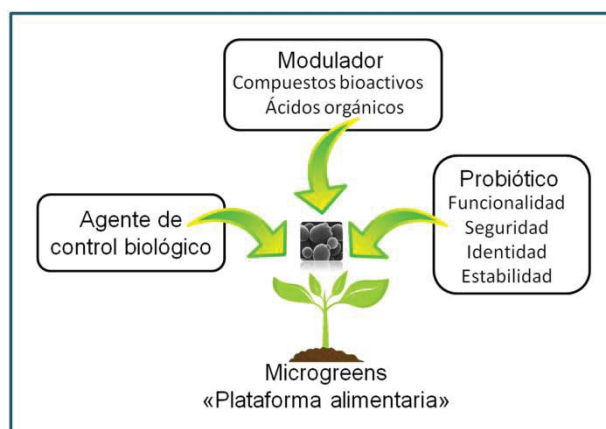


Figura 2. Concepto de microgreens como plataforma alimentaria. La planta adicionada con *D. hansenii* con función integradora.

2. ANTECEDENTES

2.1. Cultivos como microgreens. Contexto nacional.

2.1.1 *Ocimum basilicum*. Importancia económica

O. basilicum comúnmente conocida como albahaca es una planta muy importante a nivel comercial para el estado de B.C.S. (México) siendo uno de los principales productores a nivel nacional, con una superficie de siembra de 286 hectáreas. Es considerada como planta medicinal con múltiples propósitos, especialmente terapéuticos. Los aceites esenciales procedentes de esta planta han sido ampliamente utilizados en la industria alimentaria como saborizantes. Es poseedora de diversos compuestos aromáticos que con un amplio rango de actividades biológicas, y han sido utilizados como repelentes, antibacteriales, antifúngicos y como agentes antioxidantes (Simon *et al.*, 1999; Umano *et al.*, 2005; Tarchoune *et al.*, 2010).

2.1.2 *Amaranthus cruentus*. Importancia económica.

El género *Amaranthus* incluye cerca de setenta especies, de las cuales tres son predominantemente utilizadas para la producción de grano: *Amaranthus hypochondriacus*, *A. caudatus* y *A. cruentus*. Es esta última especie la que resulta de mayor interés debido al perfil completo de aminoácidos que presenta (Casarrubias-Castillo *et al.*, 2014). Dentro del contenido proteico destacan aminoácidos como la lisina, triptófano y metionina que resultan esenciales para humanos, además el contenido de flúor es mucho mayor que en otros cereales (14-19 g/100g) rebasando al contenido en trigo (12-14 g/100g) y arroz (7-10 g/100g). En México, se estima una producción de 4,617.73 ton/año, de ahí su importancia no sólo nutricional sino económica (SIAP, 2013).

2.1.3 *Eruca sativa*. Importancia económica

Es un miembro de la familia *Brassica* que comprende más de 250 especies (Lamy *et al.*, 2008). Es una hierba anual o de dos ciclos, es una variedad de mostaza. Es originaria de la región mediterránea, pero se encuentra cultivada alrededor del mundo, es altamente consumida en los países europeos. Las hojas y los germinados de la planta son mundialmente utilizados en ensaladas; además, la planta presenta usos medicinales como astringente, diurético, tónico, depurante, laxante y estimulante (Sarwar *et al.*, 2007). En Brasil es el tercer producto vegetal más popular debido a su contenido de fitonutrientes como provitamina A, vitamina C, flavonoides y glucosinolatos (Pacheco *et al.*, 2013). En México no se tiene producción significativa de esta planta, razón por la cual representa gran potencial para su estudio (SIAP, 2013).

2.1.4 *Brassica oleracea var. gemmifera* . Importancia económica

Los vegetales de la familia *Brassica* han sido cultivados ampliamente en Europa y el norte de Asia por lo menos en los últimos 600 años. Recientemente existe un renovado interés en el uso de *B. oleracea* como producto fresco debido a su alto contenido proteico, fitoquímicos y alta digestibilidad (Park *et al.*, 2014). El consumo de estos vegetales reduce enfermedades crónicas, incluyendo enfermedades cardiovasculares y cáncer (Vale *et al.*, 2014). En México se estima una producción de 14, 695.67 ton/año con un valor de producción de 145,808.42 millones de pesos, siendo de gran importancia para la comunidad rural como fuente de ingreso (SIAP 2013).

2.1.5 *Anethum graveolens*. Importancia económica

A. graveolens comúnmente conocido como eneldo es una hierba anual o bianual. Crece entre 90-120 cm de alto, presenta tallos delgados ramificados que terminan en hojas, con presencia de flores amarillas pequeñas (Shyu *et al.*, 2009). El aceite esencial obtenido de esta hierba ha mostrado tener un efecto anticancerígeno, alta

actividad antioxidante, antimicrobiana, antiespasmódica, antidiabética y antiinflamatoria (Sing *et al.*, 2005; Orhan *et al.*, 2013). En México su producción se estima de 3.66 ton/año con un valor de producción de 43.47 millones de pesos (SIAP, 2013).

2.2 Causas de pérdida en post-cosecha

Uno de los principales problemas en los cultivos es el mal manejo post-cosecha, ya que ocasiona pérdidas de hasta el 50% de la producción total. El primer factor a mitigar es el manejo de la planta. Al ser cortada queda expuesta una parte del interior, en ese momento esporas de hongos oportunistas presentes en el aire o las manos logran colonizar teniendo una germinación notoria hasta 7 días después (Xiao *et al.*, 2014). En este sentido se han reportado casos de enfermedades fúngicas causados por *Alternaria alternata*, *Sclerotinia sclerotium*, *Penicillium italicum*, *P. digitatum*, *Mucor sp.*, *Fusarium sp.*, y *Aspergillus flavus*. Este último ha ocasionado grandes pérdidas en cultivo de tomate “cherry” (Yan *et al.*, 2014) y se reporta como patógeno de *O. basilicum*, *A. cruentus*, *E. sativa*, *B. oleracea* var. *gemmifera* y *A. graveolens*.

Además de patógenos que afectan directamente el desarrollo de los vegetales, estos son susceptibles a contaminación por patógenos transmitidos directamente por alimentos en muchos puntos de la cadena de producción y que sobreviven hasta su preparación. Uno de los puntos críticos a tratar es la reducción de enfermedades que afectan a humanos. En este sentido, los patógenos más fuertes a combatir son las bacterias enteropatógenas como *Salmonella entérica* y *Escherichia coli* O157H7, su presencia ha sido ampliamente reportada en alimentos de tipo vegetal como ejemplo en germinados de rábanos y lechugas (Xiao *et al.*, 2014; Jensen *et al.*, 2015).

2.2.2 Medidas de control para enfermedades post-cosecha

Existe una amplia diversidad en la producción de prácticas para proteger cultivos contra una gran variedad de patógenos, y han sido desarrolladas diversas estrategias de intervención para minimizar la introducción, persistencia y transmisión de patógenos a humanos (Doyle *et al.*, 2012). La medida empleada puede dirigirse directamente contra el patógeno o contra una variedad de ellos (*S. entérica* y *E. coli* O157H7). En cualquier caso, existen muchos factores que pueden afectar la efectividad del tratamiento. Los tratamientos más utilizados son agentes sintéticos como dióxido de cloro, tiabendazol, entre otros (Thind, 2012). Este tipo de compuestos presenta un costo moderado, amplio espectro, moderada efectividad, formación de compuestos órgano-clorados y aplicación continua; los tratamientos con radiación son altamente efectivos pero son contra patógenos sino que también afectan al huésped (Topcu *et al.*, 2015), razón por la cual se han descartado; el uso de modificaciones genéticas aunque muy eficiente aún no es aceptado por la sociedad. Para seleccionar un método de control adecuado es necesaria una evaluación de la efectividad del tratamiento tomando en cuenta la ecología microbiana de la planta. En este sentido, el control biológico parece cumplir con características apropiadas.

2.2.3 Control Biológico

En el campo del control biológico se aplican teorías ecológicas a cerca de dinámicas poblacionales para el control del crecimiento de un microorganismo particular. La unión entre el control biológico y la ecología es fuerte. La definición de control biológico es: “reducción del inóculo o de la actividad del patógeno causada por uno o varios microorganismos encontrados en el hospedero” (Carrillo, 2005). Para desarrollar un fenómeno de esta naturaleza se deberán utilizar organismos (o sus metabolitos) tales como: insectos, levaduras, bacterias y hongos (Barkai, 2001).

Las características que debe poseer un antagonista microbiano son (Bautista, 2006):

- Genético: estable
- Eficiencia: baja concentración.
- Supervivencia: habilidad para ello.
- Espectro: amplio para una gama de microorganismos patógenos.
- Producción: bajo costo.
- Metabolitos secundarios: ausencia de metabolitos dañinos para el hospedero

Encontrar un microorganismo que cumpla con todas estas características no es una tarea fácil, sin embargo se ha logrado de manera exitosa en contadas ocasiones (Droby *et al.*, 1994; Hernández *et al.*, 2010a).

2.2.3.1 Uso de levaduras como control biológico

Las levaduras son microorganismos con gran potencial de aplicación en diversos procesos biotecnológicos, y en el manejo de enfermedades de plantas no es la excepción (Magri *et al.*, 2010). El control de hongos fitopatogénicos ejercido por levaduras ha sido ampliamente estudiado debido al amplio espectro de patógenos que logra controlar una sola especie. Obteniendo el control de enfermedades crónicas en cultivos económicamente importantes (Bautista *et al.*, 2007; Martínez, 2014).

Los mecanismos de control biológico reportados en levadura son: competencia por espacio y nutrientes, producción de enzimas hidrolíticas, toxinas *killer* e inducción de resistencia. Algunas especies de levaduras usadas en este fenómeno han sido, *Pichia guillermondii*, *Candida oleophila*, *C. sake*, *D. hansenii*, *Pichia membranifaciens*, *Cryptococcus albidus*, entre otras. Las características que las hacen aún más adecuadas es que toleran condiciones de baja humedad, son poco sensibles a fungicidas y crecen rápidamente (Spadaro, 2003).

2.2.3.2 Uso de *D. hansenii* como agente de control

La levadura cosmopolita *D. hansenii*, no presenta producción de antibióticos, sin embargo, ha sido ampliamente utilizada como agente de biocontrol en diferentes tipos de frutas y hortalizas ya que se presume posee como mecanismos de control: 1) competencia (espacio y nutrientes) y 2) producción de enzimas hidrolíticas en cítricos (Martínez *et al.*, 2012); en cítricos (*Citrus latifolia*) combatió la presencia de *Penicillium citrinum* y *Mucor fragilis*, mientras que en *Phaseolus vulgaris* mitigó el crecimiento de *A. flavus* y *Fusarium sp.* (Martínez-Camacho 2014). Además de estos casos particulares, su actividad antimicrobiana *in vitro* se ha retado contra: *Penicillium brevicompactum*, *P. corylophilum*, *P. cyclopium*, *P. decumbens*, *P. digitatum*, *P. expansum*, *P. glabrum*, *P. grisefulvum*, *P. janthinellum*, *Phoma glomerata*, *Trichoderma koningii*, *Fusarium sp.*, *Mucor sp.*, *A. niger*, *Chladosporium herbarum* y *Scopulariopsis brevicaulis* (Leroy *et al.*, 1992).

2.2.3.3 Generalidades de *D. hansenii*

Las levaduras por definición son hongos unicelulares, de forma ovalada, se reproducen predominantemente por gemación o fisión, como consecuencia presentan crecimiento unicelular (Ochoa *et al.*, 2004).

D. hansenii podría considerarse cosmopolita, se encuentra distribuida en ambientes marinos y terrestres. Presenta tolerancia a altas concentraciones de sal (Prista *et al.*, 2007), lo que le permite reproducirse en ambientes marinos, aún en condiciones de salinidad extrema (Clipson *et al.*, 1992). Pertenece al filo de los ascomicetos, presenta un estado asexual o imperfecto, lo que ha generado su segundo nombre, *Candida famata* (Breuer *et al.*, 2006). Entre sus aplicaciones comerciales destacan: la preparación de emulsiones alimenticias (Muys *et al.*, 1976), procesamientos de aromatizantes (Cardillo *et al.*, 1994) y productos fármacos como el xilitol (Sampaio *et al.*, 2007), entre otros. Se sabe esta levadura no produce antibióticos y aun así inhibe el crecimiento de patógenos. Hernández *et al.* (2010a) reportaron su uso como agente de control biológico contra *P.*

digitatum y *P. italicum*, describiendo como mecanismo de acción tentativo la producción de enzimas hidrolíticas y competencia por espacio y nutrientes.

2.3 COMPUESTOS BIOACTIVOS: Microgreens.

2.3.1 Microgreens

Diversos estudios han demostrado que existe una relación el consumo de frutas - vegetales y la reducción en el desarrollo de enfermedades crónicas, como enfermedades cardiovasculares y cáncer. La ingesta tanto de frutas como vegetales provee al organismo de diversos compuestos bioactivos como ácido ascórbico (Vitamina C), carotenos (como β -caroteno o provitamina A), filoquinonas (principalmente vitamina K), tocoferoles (vitamina E), entre muchos otros.

Los microgreens (microvegetales) como son conocidos mundialmente, son un género exótico de vegetales comestibles, que recientemente han ganado popularidad en la industria alimentaria. Los microgreens son vegetales inmaduros producidos a partir de semillas y hierbas, que han desarrollado completamente los cotiledones y pueden tener o no las primeras hojas verdaderas, generalmente presentan alturas entre 2.5-7.6 cm, y su cultivo se da entre 7 y 14 días (Xiao *et al.*, 2013).

Se tienen reportes de plantas (*Spinacia oleracea* y *Lactuca sativa*) que se han evaluado con el mismo tipo de crecimiento que un microgreen, encontrando que presentan todo el contenido de fitonutrientes y actividad antioxidante en comparación con la misma especie ya desarrollada (Lester *et al.*, 2010).

2.3.2 Ácido ascórbico

Es una vitamina soluble en agua, requerida para un amplio rango de rutas metabólicas esenciales; además juega un papel importante para la prevención del escorbuto, mantenimiento de la piel, encías y vasos sanguíneos (Pacheco *et al.*, 2013). Esta vitamina presenta actividad antioxidante protegiendo macromoléculas

del estrés oxidativo (Davey *et al.*, 2000). Se ha reportado que vegetales como el col de Bruselas presentan una gran cantidad de ácido ascórbico, y que actúa como tratamiento de la infertilidad (Park *et al.*, 2014), además el consumo de solo una taza provee el 89% de la ingesta diaria recomendada (Pattinson *et al.*, 2004).

2.3.3 Carotenoides y tocoferoles

Los carotenoides son una clase de pigmentos liposolubles usualmente se encuentran en una gran variedad de frutas y vegetales. Estos juegan un papel muy importante en la prevención de enfermedades crónicas. Se dividen en dos grandes grupos: 1) precursores de vitamina A (carotenos) y 2) no precursores (Luteína, licopenos, entre otros) (Pacheco *et al.*, 2013). En el alimento, los polifenoles contribuyen a la acidez, astringencia, color, sabor y estabilidad oxidativa. Este tipo de compuestos son sensibles a los fotones de la luz, como se ha corroborado para *B. oleracea* donde se notó que al germinarla en oscuridad conservaba una cantidad mayor de carotenoides (Vale *et al.*, 2014).

Los tocoferoles generalmente se engloban como vitamina E, son antioxidantes liposolubles, Xiao *et al.* (2012) reportaron que estos compuestos se encuentran en cantidades considerablemente mayores en estadio de microgreen que en su contraparte de hojas maduras.

2.3.4 Filoquinonas

Filoquinona o vitamina K, es un compuesto requerido para la coagulación de la sangre, es el componente más abundante en tejidos fotosintéticos de vegetales de hojas oscuras, como los pertenecientes al género *Brassica*, Xiao *et al.* (2012) reportaron que de veinticinco variedades de microgreens el amaranto presenta la mayor producción filoquinona con 4.1 µg/g, mientras que ya en planta desarrollada presenta tan solo 1.14 µg/g.

2.3.5 Flavonoles glicosilados y ácidos orgánicos

Los flavonoles glicosilados, antocianinas y ácidos orgánicos presentan diversas funciones dentro de las plantas, entre protectoras y de defensa para facilitar el crecimiento, desarrollo y reproducción, además estos compuestos poseen alta actividad antioxidante secuestrando radicales, que en humanos están relacionados con la prevención de enfermedades (Wallace *et al.*, 2011), mientras que su consumo en la dieta se ha asociado con propiedades neuroprotectoras, específicamente reduciendo el riesgo de la enfermedad de Parkinson (Gao *et al.*, 2012). La presencia de antocianinas en *O. basilicum* se ve afectada por el cultivar por lo menos para la especie morada mientras que los compuestos fenólicos no se ven afectados (Flanigan *et al.*, 2014).

2.3.6 *D. hansenii* como modulador de compuestos bioactivos

Los bio-saborizantes son compuestos aromáticos producidos usando las rutas metabólicas del microorganismo y/o células vegetales. Se ha reportado que *D. hansenii* es capaz de producir esteroides, alcoholes, fenoles y ácidos orgánicos (Guneser *et al.*, 2015), utilizando como sustrato una planta de tomate.

2.4 PLATAFORMA ALIMENTARIA: MICROGREENS

Los productos fermentados generalmente proveen matrices/plataformas adecuadas para el transporte de probióticos. Sin embargo, otro tipo de matrices alimentarias deben ser estudiadas. El aumento de personas con intolerancia a la lactosa y vegetarianismo reafirma la importancia del desarrollo de productos probióticos no fermentados como los vegetales (Ranadheera *et al.*, 2010). Existen múltiples estudios donde se han utilizado jugos de frutas, granos de cereal y barras de chocolate como plataformas alimentarias (Furtado *et al.*, 2013). Sin embargo, el uso de vegetales ha sido poco estudiado (Chen *et al.*, 2012; Jood *et al.*, 2012; Yu *et al.* 2012).

2.4.1 Vehículo de probióticos

El tejido vegetal se encuentra formado por un sistema de multifase. La pared celular es una eficiente barrera física en contra de los microorganismos, sus poros (0.1-5.0 μm) son muy pequeños para que entren los microorganismos (Alzamora *et al.*, 2015). Sin embargo, el mínimo procesamiento de las plantas (como el corte) promueve la liberación del contenido celular rico en minerales, azúcares, vitaminas y otros nutrientes, lo que crea condiciones ideales para el crecimiento del agente probiótico y haciendo a los vegetales en una primera etapa buenos candidatos a plataforma alimentaria (Oliveira *et al.*, 2011)

2.4.2 Probióticos

La palabra probiótico proviene del griego “pro” y “biótico” que significa “por la vida”. La definición más usada es la redactada por Fuller en 1989: “Los probióticos son suplementos vivos microbianos para la comida, que afectan de manera benéfica al hospedero otorgándoles balance intestinal”. Este término evolucionó hasta llegar a la definición actual que dictó la FAO en 2002: “Microorganismos que suministrados en las cantidades adecuadas confieren algún efecto benéfico al hospedero”. Para que un organismo sea considerado como probiótico es necesario que cumpla con ciertas características (Tabla I).

2.4.2.1 Mecanismos de acción de un probiótico

Los mecanismos principales de acción de un probiótico son: aumento de la barrera epitelial, aumento de adhesión a la mucosa intestinal, participación en la inhibición de la adhesión patogénica, exclusión patogénica competitiva, producción de sustancias anti-microorganismos y modulación del sistema inmune (Bermudez-Brito *et al.*, 2012).

Tabla I. Criterios a evaluar en un microorganismo probiótico (Mitropoulou *et al.*, 2013).

Criterio	Descripción
Seguridad	Originario del organismo donde se desea aplicar
	No ser patógeno natural
	Generalmente reconocido como seguro (GRAS)
Funcionalidad	Resistente a las condiciones estomacales
	Adherirse al tejido epitelial del intestino
	Capacidad de colonizar el tracto gastrointestinal
	Modular la respuesta inmune
	Producir sustancias antimicrobianas
Técnica	Influenciar actividad metabólicas del hospedero
	Resistente al procesamiento técnico
	Cultivo escalable

2.4.2.2 *D. hansenii* como probiótico

La levadura *D. hansenii* es productora de poliaminas. Estos compuestos son sustancias presentes en cada célula viva, esenciales para el mantenimiento de la biosíntesis macromolecular, replicación del ADN y apoptosis (Reyes-Becerril *et al.*, 2011). Un mecanismo importante de un microorganismo probiótico es la capacidad de adherirse al epitelio intestinal, *D. hansenii* logró en *Sparus aurata* (Reyes-Becerril *et al.*, 2008a) tolerar actividad enzimática digestiva en *Dicentrarchus labrax* (Tovar *et al.*, 2002) y mostró capacidad de modular el sistema inmune en *Mycteroperca rosácea* (Reyes-Becerril *et al.*, 2008b).

3. PREGUNTA CIENTÍFICA

¿Podrá *D. hansenii* actuar como agente de control biológico contra colonizaciones fúngicas/bacterianas en algunas especies de microgreen como *O. basilicum*, *A. cruentus*, *E. sativa*, *B. oleracea* var. *gemmifera*, *A. graveolens*?

¿Podrá la aplicación de *D. hansenii* tener algún impacto negativo en el contenido de compuestos bioactivos en especies de microgreen como *O. basilicum*, *A. cruentus*, *E. sativa*, *B. oleracea* var. *gemmifera*, *A. graveolens*)?

¿Podrán los microgreen ser una matriz alimentaria (vehículo de liberación) para *D. hansenii* como probiótico en *G. gallus*?

4. HIPOTESIS

Sí *D. hansenii* produce las moléculas para atacar colonizaciones fúngicas y bacterianas y estimula la producción de compuestos bioactivos en diferentes géneros de plantas, además actúa como inmunoestimulante en ciertos organismos, entonces, *D. hansenii* actuará como agente de control biológico contra colonizaciones fúngicas/bacterianas y como modulador positivo del contenido de compuestos bioactivos en microgreens como *O. basilicum*, *A. cruentus*, *E. sativa*, *B. oleracea* var. *gemmifera*, *A. graveolens* utilizados como matriz alimentaria.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Evaluar a microgreens como potencial plataforma alimentaria de *D. hansenii*, agente de control biológico y modulador del contenido de compuestos bioactivos.

5.2 Objetivos particulares

Evaluar la eficacia de *D. hansenii* como tratamiento de control biológico contra *A. flavus*, *E. coli* O157:H7 y *S. typhimurium* en cinco especies de microgreens: *O. basilicum*, *A. cruentus*, *E. sativa*, *B. oleracea* var. *gemmifera*, *A. graveolens*.

Determinar el contenido de compuestos bioactivos (ácido ascórbico, vitaminas, carotenoides y poli-fenoles) de microgreens al ser expuestos a un tratamiento con *D. hansenii*.

Evaluar especies de microgreens como vehículo para la administración de *D. hansenii* como probiótico en *G. gallus domesticus*.

6. JUSTIFICACIÓN

6.1 Importancia Científica

Desde un enfoque médico, al ser los microgreens reconocidos a nivel mundial como alimentos funcionales se hace necesario determinar la presencia y cantidad de compuestos bioactivos en las cinco especies problema para su posible aplicación terapéutica. Sin embargo, aunque se sabe proveen de una gran cantidad de beneficios a la salud, son fácilmente colonizables por enterobacterias tales como *E. coli* y *S. typhimurium*, por ello conocer el mecanismo de control biológico de un agente como *D. hansenii* para estos patógenos en plantas con características tan particulares, resultaría de gran importancia para el desarrollo de nuevas terapias nutricio-moleculares.

Por otro lado, se ha propuesto el uso de vegetales como plataforma alimentaria en la ingesta de probióticos debido al gran número de individuos que se encuentran imposibilitados para el consumo de productos fermentados, esta evaluación aún no se ha realizado para los microgreens debido a que son alimentos emergentes del mercado moderno, sentar las bases del conocimiento sobre este tipo de matrices resulta importante para la aplicación de una gran variedad de microorganismos inmunoestimulantes.

6.2 Importancia Tecnológica

Las estrategias de aplicación de probióticos en plataformas alimentarias de vegetales emergentes es de gran importancia ya que incentiva el desarrollo *de novo* de sistemas matriciales con características especiales y aplicación general.

6.3 Importancia para el desarrollo

6.3.1 Pertinencia Económica

El cultivo de microgreen se da en un lapso relativamente corto de tiempo (7-14 días), razón por la cual la inversión en su producción es baja mientras que el

ingreso resulta elevado dado el gran valor que presentan en el mercado los alimentos funcionales. Es decir, resulta una actividad económica redituable.

6.3.2 Pertinencia Ambiental

La agricultura es una actividad de alto impacto ambiental debido a varios factores, uno de los más importantes es el uso indiscriminado de agua. Para evitar el derroche de tan preciado líquido vital en zonas desérticas por ejemplo, se manejan variantes diversas de esta práctica. Los microgreens pertenecen a una de estas variantes debido a su cultivo relativamente corto (7-14 días) y poco consumo de agua. Además, no es necesario el uso de grandes extensiones de tierra para el cultivo de microgreens evitando así otro factor negativo de la agricultura convencional, ya que se estima deja al año miles de km² de tierra infértil alrededor del mundo.

Por otro lado, en la agricultura por métodos modernos es común la aplicación de fungicidas, en el presente trabajo se propone el uso de control biológico para mitigar colonizaciones negativas para el consumidor, además el agente seleccionado es cosmopolita por tanto se evita la liberación de agentes sintéticos tóxicos al ambiente o de microorganismos patógenos para el humano.

6.3.3 Pertinencia Social

El riesgo alimenticio-sanitario se incrementa en los productos de exportación, ya que con la globalización del suministro de comida se hace posible la dispersión a nivel mundial de alimentos contaminados. Para evitar esto, en la actualidad se utiliza un agente de limpieza denominado cloro, este compuesto es el más utilizado por la industria por su mediana actividad antimicrobiana y su bajo costo. Sin embargo, ha habido un aumento en la preocupación por la salud pública acerca de la formación de compuestos órgano-clorados carcinógenos con gran impacto ambiental. Por tanto, existe una creciente necesidad por investigar la eficacia de nuevos agentes desinfectantes biológicos para microgreens que además pudieran estimular/modular su perfil nutricional.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 plantas y microorganismos

7.1.1 *D. hansenii*

D. hansenii (DhhBCS003) se obtuvo de la colección del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, SC. Su activación se realizó bajo condiciones de esterilidad en la campana de flujo laminar (Telstar BIO-II-A) a temperatura ambiente. Mediante inoculación en caldo YEPD (Yeast Extract Peptone Dextrose, DIFCO®), se incubó a 30 °C por 24 h a 250 x g en un agitador rotatorio (LabLine®). Posterior a esto se tomaran 100 µL del cultivo en 10 mL de Tween 80 al 0.1 % (v/v) y NaCl al 0.9 % (p/v) (Reyes-Becerril *et al.*, 2008; Hernández-Montiel *et al.*, 2010a). Se determinó la concentración celular mediante la cámara de Neubauer (Loptik Labor) (1). Para ajustar concentración celular se realizaron diluciones (2).

$$\frac{\text{No. de células}}{\text{ml}} = \frac{(x \text{ células}) * 4 \times 10^6}{\text{No. de cuadros contados}} \quad (1)$$

Dónde:

x = Número de células observadas en la cámara.

4x10⁶ = Volumen de los 25 cuadros en la cámara de Neubauer (mL).

Para ajuste de concentración se utilizó la ecuación 2.

$$V_2 \frac{V_1 C_1}{C_2} \quad (2)$$

Dónde:

V₁ = Volumen final de la solución a preparar (mL).

C₁ = Concentración de la solución requerida (células/mL).

V₂ = Volumen de la solución stock.

C₂ = Concentración de la solución stock (células/mL).

7.1.2 Microgreens

Semillas de cinco variedades de microgreens (*O. basilicum*, *A. cruentus*, *E. sativa*, *B. oleracea* var. *gemmifera*, *A. graveolens*) fueron obtenidas de la empresa de agricultura orgánica Xaxenii, Inc. (Edo de México, México). Fueron germinadas dentro de cámaras de plástico en sustrato (0105, ProMix, USA) esterilizado a 121°C, 15 psi durante 15 minutos y colocadas en cámara ambiental (CONVIRON®) a una temperatura de 25°C durante 12 días (Xiao, *et al.*, 2012).

7.1.3 Patógenos

Las enterobacterias *E. coli* O157:H7 y *S. typhimurium* fueron proporcionadas por la Universidad de Guadalajara. Su activación se realizó en placas de agar y medio líquido de soya tripticaseína (TSB, DIFCO®, por sus siglas en inglés) a 37°C durante 24 horas (Gurtler *et al.*, 2014). La concentración celular de cada bacteria se midió utilizando un Multisizer™ Coulter Counter (Reineke, *et al.*, 2015).

La cepa fúngica de *Aspergillus flavus* se obtuvo de la colección de hongos del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, SC. Fue activada en medio PDA (Papa Dextrosa Agar, DIFCO®) a una temperatura de 30°C durante 7 días (Martínez-Camacho *et al.*, 2014). Para preparar el inóculo, se obtuvieron las esporas adicionando 10 mL de agua estéril a la caja Petri, enseguida se cuantificó la concentración de esporas del líquido resultante utilizando la cámara de Neubauer y un microscopio (Motic BA 300) (1). Para ajuste del inóculo se realizaran diluciones con Tween 80 al 0.1 % (v/v) y NaCl al 0.9 % (p/v) (Hernández-Montiel *et al.*, 2010a) (2).

7.2 Control biológico

7.2.1 Evaluación *in vitro*

Para determinar la interacción antagonista-patógeno en medio sólido, se inició con un diseño tipo antibiograma en medio sólido con $n=3$ y 3 réplicas, en medio YEPD. Cada placa se inoculó por picadura con *A. flavus*, y se incubó a 30°C durante 72 horas, enseguida se inoculó con 100 μ L de una solución de *D. hansenii* con una concentración de 1×10^8 cel/mL aplicada de manera longitudinal y frente a la colonia fúngica, posteriormente se incubó bajo las mismas condiciones. Se utilizó como control químico sulfato de cobre pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$). (Ashraf *et al.*, 2014).

Bajo el mismo contexto, se evaluó el efecto de *D. hansenii* sobre la germinación de esporas para *A. flavus* y densidad celular para *E. coli* O157:H7 y *S. Typhimurium*, en 15 mL de medio líquido YEPD. Se adicionaron 100 μ L de levadura (1×10^8 cel/mL) y 100 μ L de patógeno (1×10^5 cel/mL), cada patógeno se evaluó en experimentos independientes y por triplicado, enseguida se incubó en agitador rotatorio a 250 x *g* a 30°C. El porcentaje de germinación de espora fúngica se cuantificó utilizando un microscopio óptico (NIKONN® HB-10101-AF), a las 6, 12 y 24 h. Es necesario aclarar que una espora se considera germinada cuando la longitud del tubo germinativo es igual o mayor al diámetro de la espora (Yao *et al.*, 2004). Por otro lado, la cuantificación de densidad bacteriana se realizó a las 6, 12 y 24 h, por plaqueo en agar selectivo McConkey (DIFCO®) (Ashraf *et al.*, 2014).

7.2.2 Evaluación *in vivo*

Para determinar la existencia de algún tipo de antagonismo por parte de *D. hansenii* en alguna de las cinco especies de microgreens a evaluar (*O. basilicum*, *A. cruentus*, *E. sativa*, *B. oleracea var. gemmifera*, *A. graveolens*), se realizaron seis bioensayos, los cuales presentaron una $n = 25$, y 3 réplicas. Las plantas se mantuvieron a 25°C con humedad relativa del 85% durante 12 días.

7.2.2.1 Ganancia de peso

Con la finalidad de evaluar si *D. hansenii* presentaba algún efecto negativo sobre la biomasa de la planta, cada especie (*O. basilicum*, *A. cruentus*, *E. sativa*, *B. oleracea* var. *gemmifera* y *A. graveolens*) en estadio de microgreen fue asperjada con la levadura (1×10^8 cel/mL) los días 3 y 5 después de la germinación. Se tuvo como tratamiento control aspersion con agua destilada estéril. Se midió el peso fresco el día 12 para ambos tratamientos.

7.2.2.2 Bioensayos

7.2.2.2.1 Influencia en la germinación

Para determinar la existencia de algún tipo de influencia del tratamiento con *D. hansenii* en la germinación de la semilla, así como la efectividad contra el patógeno fúngico, se realizó el siguiente ensayo. Las semillas de cada especie de microgreen fueron sumergidas en los siguientes tratamientos durante 15 min: 1) agua destilada; 2) sulfato de cobre pentahidratado (25 ppm); 3) *D. hansenii* (1×10^8 cel/mL); 4) *A. flavus* (1×10^5 esporas/mL); 5) *A. flavus* (1×10^5 esporas/mL) + *D. hansenii* (1×10^8 cel/mL); y 6) *A. flavus* (1×10^5 esporas/mL) + sulfato de cobre pentahidratado (25 ppm). Después de esto se dejaron secar durante 15 min en campana de flujo laminar y posteriormente se colocaron en sustrato (0105, Promix, USA) y condiciones basales (Sección 7.2.2). Para medir la presencia de cada uno de los microorganismos se tomaron tres plantas de cada especie/tratamiento/réplica y se enjuagaron en 10 mL de agua destilada estéril. Enseguida, de los tratamientos que contenían células de *D. hansenii* se sembraron 100 μ L por dispersión en YEPD agar, mientras que los que contenían esporas de *A. flavus* se cuantificaron en la cámara de Neubauer y con el microscopio óptico. Los muestreos se realizaron los días 3, 5, 7 y 10.

7.2.2.2.2 Dinámica poblacional

Con el objetivo de conocer la cinética de cada uno de los microorganismos sobre cada una de las especies de microgreen, se realizó el siguiente ensayo. Las

semillas fueron sumergidas en una solución de concentración patogénica igual a 1×10^5 cel/mL y de *D. hansenii* igual a 1×10^8 cel/mL durante 15 min, enseguida se dejaron secar durante 15 min en una cámara de flujo laminar, posteriormente se colocaron en sustrato (0105, Promix, USA) y condiciones basales (Sección 7.2.2). Los muestreos se realizaron los días 5, 7 y 10. Para cada tiempo de muestreo se lavaron 3 semillas en 10 mL de agua destilada estéril. Para determinar la cinética bacteriana se tomaron 100 μ L y se sembraron por la técnica de dispersión en medio selectivo McConkey, mientras que para la cinética de *D. hansenii* se tomaron 100 μ L y se sembraron en medio YEPD. En cuanto a la cepa fúngica, la presencia y cantidad de esporas se cuantificó en cámara de Neubauer y bajo el microscopio óptico.

7.2.2.2.3 Pretratamiento con *D. hansenii*

Con la finalidad de establecer alguna estrategia de aplicación del tratamiento con *D. hansenii* se realizó el siguiente ensayo. Las semillas fueron sumergidas en una solución de *D.hansenii* a 1×10^8 cel/mL durante 15 min, enseguida se dejaron secar durante 15 min en una cámara de flujo laminar, posteriormente se colocaron en sustrato (0105, Promix, USA) y condiciones basales (Sección 7.2.2). Se asperjaron el día 3 después de la germinación, con la misma concentración de levadura. El día 5 después de la germinación cada planta fue inoculada con una concentración patogénica (un patógeno por ensayo) de 1×10^5 cel/mL. Los muestreos se realizaron los días 5, 7 y 10. Para cada tiempo de muestreo se lavaron 3 semillas en 10 mL de agua destilada estéril. Para determinar la cinética bacteriana se tomaron 100 μ L y se sembraron por la técnica de dispersión en medio selectivo McConkey, mientras que para la cinética de *D. hansenii* se tomaron 100 μ L y se sembraron en medio YEPD. En cuanto a la cepa fúngica, la presencia y cantidad de esporas se cuantificó en cámara de Neubauer y bajo el microscopio óptico.

7.2.2.2.4 Desplazamiento de patógeno. Dosis única.

Continuando con la determinación de una estrategia de aplicación para el tratamiento con *D. hansenii* se realizó el siguiente ensayo. Las semillas fueron sumergidas en una solución de concentración patogénica igual a 1×10^5 cel/mL mL durante 15 min, enseguida se dejaron secar durante 15 min en una cámara de flujo laminar, posteriormente se colocaron en sustrato (0105, Promix, USA) y condiciones basales (Sección 7.2.2). Se asperjaron el día 5 después de la germinación con la misma concentración de levadura (1×10^8 cel/mL) pero no de patógeno. Los muestreos se realizaron los días 5, 7 y 10. Para cada tiempo de muestreo se lavaron 3 semillas en 10 mL de agua destilada estéril. Para determinar la cinética bacteriana se tomaron 100 μ L y se sembraron por la técnica de dispersión en medio selectivo McConkey (DIFCO®), mientras que para la cinética de *D. hansenii* se tomaron 100 μ L y se sembraron en medio YEPD. En cuanto a la cepa fúngica, la presencia y cantidad de esporas se cuantificó en cámara de Neubauer y bajo el microscopio óptico.

7.2.2.2.5 Desplazamiento del patógeno. Múltiples dosis.

De acuerdo a los resultados obtenidos en el apartado anterior se decidió evaluar dos especies de plantas en estadio de microgreen donde existió desplazamiento patogénico, pero el tratamiento con *D. hansenii* tuvo comportamiento inverso (aumento y disminución). Se siguió la metodología del apartado 7.2.2.2.4 modificando los tiempos de aplicación, siendo el tratamiento asperjado cada 48 horas.

7.2.3 Microscopia Electrónica de Barrido (MEB)

La interacción antagonista-patógeno fue visualizada mediante microscopía electrónica de barrido (HITACHI S3000N, 2004, Japón). Se realizaron las siguientes micrografías: 1) tejidos sanos; 2) tejidos infectados; y 3) tejidos con agente de control biológico.

Por cada tratamiento y especie se utilizaron 3 individuos. Cada muestra se lavó 3 veces con agua destilada estéril. Enseguida se fijaron con glutaraldehído al 2.5%

(v/v), durante 15 min por tres ocasiones. Para el post-fijado y con el fin de prevenir la deformación y mejorar la fijación de lípidos, así como aumentar la conductividad de las muestras, se trataron con tetraóxido de osmio (OsO_4) al 1 %, se aplicó por saturación en cámara herméticamente cerrada durante 1 h, enseguida se deshidrataron utilizando un cambio gradual de alcohol, etanol al 30, 50 y 70 % en agua, las muestras se sometieron al 30 % durante 1 h, al 50 % 1 h y al 70 % dos tiempos de 1 h. Finalmente se colocaron en etanol 100% dos tiempos de 15 min. Enseguida se desecaron por punto crítico de CO_2 (Samdri-PVT-3B). Las muestras secas se colocaron en laminillas de aluminio utilizando un metal para recubrimiento Au, en el equipo Sputter Coater Denton Vacuum Desk II bajo las siguientes condiciones; 20 mTorr, corriente de 40 mA por 35s en dos ocasiones, finalmente se procedió a observarlas (Martínez-Camacho, 2014).

7.2.4 Microscopia Electrónica de Barrido Confocal (MEBC) y microscopía confocal

La interacción antagonista-patógeno fue visualizada mediante microscopía electrónica de barrido confocal y microscopía confocal. Se aplicaron los siguientes tratamientos a las cinco diferentes especies de microgreen: 1) agua destilada; 2) *D. hansenii* 1×10^8 ceL/mL; 3) *A. flavus* 1×10^5 ceL/mL; por último, 4) *D. hansenii* 1×10^8 - *A. flavus* 1×10^5 ceL/mL.

Por cada tratamiento y especie se utilizaron 3 individuos. Las muestras se colocaron en una solución de fijación 1 (PBS pH 7.0, 50 mM NaCl, 2.5% glutaraldehído) a 4°C durante 12 horas. Enseguida se lavaron las muestras utilizando buffer PBS (pH 7.0, 50 mM NaCl) a 18°C durante 20 min a 500 x g (Eppendorf®), este proceso se repitió tres veces. Después de esto se inició el proceso de deshidratación alcohólica (50%, 70% y 100% etanol/agua) a 450 x g, 14°C, 15 min cada paso. Posteriormente, se inició con la decoloración de las muestras colocándolas durante 105 minutos en EET (etanol 70%, etilacetato 25%

y ácido tricloroacético 15%) a 250 x g (Eppendorf®), inmediatamente después se transfirieron a tubos eppendorf® con 0.2 M NaOH a 50°C por 5 min, enseguida se lavaron durante 5 min en Tris-HCl-NaOH pH 5.8, para después enjuagarse en buffer PBS durante 30 s. Posteriormente, las muestras se colocaron sobre un portaobjetos donde fueron teñidas por goteo con Fungiquil A® al 1%, el colorante se dejó actuar por 5 min, para enseguida ser lavado durante 1 min con buffer PBS. Por último se colocò sobre las muestras un cubreobjetos y fueron analizadas mediante el microscopio electrónico de barrido confocal (Zeiss, Alemania) y confocal (Zeiss, Alemania).

7.2.4 Microscopia Electrónica de Reflexión (MER)

La interacción antagonista-patógeno fue visualizada mediante microscopía electrónica de barrido reflexión. Se aplicaron los siguientes tratamientos a las cinco diferentes especies de microgreen: 1) agua destilada; 2) *D. hansenii* 1×10^8 cel/mL; 3) *A. flavus* 1×10^5 cel/mL; por último, 4) *D. hansenii* 1×10^8 - *A. flavus* 1×10^5 cel/mL.

Por cada tratamiento y especie se utilizaron 3 individuos. Se cortaron cuadrados de 1x2 mm por muestra. Se colocaron en una solución de fijación 2 (2.5% Glutaraldehído, 1.9% formaldehído en buffer PBS, pH 7.2) durante 48 h a temperatura ambiente, enseguida se lavaron tres veces durante 15 min en buffer PBS. Se inició con el proceso de deshidratación en acetona (25%, 40%, 50%, 60%, 70%, 100% y 100% en agua destilada, v/v) durante 60 min cada paso. Para completar el proceso anterior las muestras se deshidrataron a punto crítico con CO₂ (Zeiss), y enseguida se montaron sobre "stubs" para someterse a baño de carga con Au/Pd. Finalmente se observaron al microscopio electrónico de reflexión (Zeiss, Alemania).

7.3 Evaluación de compuestos bioactivos

Se realizó la evaluación de compuestos bioactivos por especie de microgreen. Se tuvo una $n=3$ y 5 réplicas. Se analizaron los siguientes tratamientos: 1) agua destilada; 2) sulfato de cobre pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 25 ppm); 3) luz UV (20 W/m^2); finalmente 4) *D. hansenii* (1×10^8 cel/mL).

7.3.2 Evaluación de tocoferoles

Haciendo modificaciones menores a la metodología reportado por Becker *et al.* (2015) para extracción de tocoferoles, se realizó lo siguiente para cada especie de planta en estadio de microgreen. Se tomaron 50 mg de tejido fresco (foliar/hipocotilo) y se colocaron en un tubo Eppendorf®, y fueron pulverizados bajo N_2 líquido, enseguida se agregaron 500 μL de éter de petróleo y 500 μL de acetona. De esta solución se tomaron 500 μL para extracción de carotenoides. Posteriormente se centrifugó a $12,000 \times g$ durante 10 min (ThermoScientific), la fase superior se filtró en un filtro de nylon ($0.22 \mu\text{m}$) y se analizó por HPLC (UFLC SHIMADZU Prominence, Shimadzu Scientifics Instruments, Inc., Columbia, MD, USA), acoplada a un espectrómetro de masas de triple cuádruplo y trampa de iones (API3200 Q TRAP, SCIEX, Framingham, MA, USA), utilizando como interfase a ESI.

7.3.3 Evaluación de carotenoides

Siguiendo con la metodología reportada por Becker *et al.* (2015) con modificaciones menores, para cada microgreen se realizó el siguiente procedimiento. Se colocaron los 500 μL del extracto para tocoferoles y se agregó 500 μL de hidróxido de potasio (KOH, 1.5 N, etanol), enseguida se llevó a oscuridad por 18 h. A esta mezcla se agregaron 800 μL de éter de petróleo y 800 μL de agua para HPLC. En este paso se formaron 2 fases, que fueron separadas; a la fase superior se agregaron 400 μL de agua para HPLC; a la fase inferior se agregaron 400 μL de éter de petróleo. De ambas mezclas se tomó la fase superior y se llevó a un rotavapor (BIORAD) a 35°C durante 10 min. Entonces se agregaron 100 μL de metanol:acetonitrilo (30:70, v/v). Se filtró con un filtro de

nylon (0.22 μm) y se analizó por HPLC, acoplada a un espectrómetro de masas de triple cuádruplo y trampa de iones utilizando como interfase a ESI.

7.3.4 Evaluación de polifenoles

De acuerdo a la metodología reportada por Sun *et al.* (2013), se realizó lo siguiente para cada especie de planta en estadio de microgreen. Se tomaron 100 mg de tejido fresco (foliar/hipocotilo) y se pulverizaron en N_2 líquido. Enseguida se agregaron 5 mL de metanol:agua (60:40, v/v), esto se llevó a sonicar (SONOREX TK30, Bandelin Elektronik, Berlin, Germany), durante 4 períodos de 15 min a temperatura ambiente. La solución se centrifugó a 1000 x g durante 5 min. El sobrenadante se filtró con un filtro de nylon (0.22 μm) y se analizó por HPLC, acoplada a un espectrómetro de masas de triple cuádruplo y trampa de iones, utilizando como interfase a ESI.

7.3.5 Análisis químico proximal. Análisis nutricionales

La evaluación de compuestos bioactivos fue desarrollada por especie de microgreen. Se utilizó una $n = 3$ y 3 réplicas. Los tratamientos analizados fueron los siguientes: 1) agua destilada y 2) *D. hansenii* (1×10^8 cel/mL). La aplicación de los tratamientos fue desarrollada en una campana de flujo laminar, la aplicación fue por aspersión de 15 mL de cada tratamiento. Todos los análisis proximales se realizaron por extracciones individuales. Cada dato esta reportado como la media de tres réplicas con su error estándar. Las diferencias estadísticas en el contenido nutricional entre tratamientos fueron analizadas mediante un ANOVA de una vía.

7.3.5.1 Energía (Kcal/g)

Para evaluar el contenido calórico de las especies de microgreens tratadas con *D. hansenii* se utilizó un calorímetro adiabático (Parr). Este aparato mide la energía o calor de las reacciones químicas, en este caso, el calor liberado por los procesos de combustión de las sustancias orgánicas analizadas. Brevemente, para la preparación de la muestra se utilizó 1 g de masa fresca, que fue triturado a punto de polvo. Enseguida se encapsuló; esta capsula fue colocada 70°C por 12 horas.

Finalmente la cápsula, fue colocada dentro del calorímetro adiabático y se llevó a cabo la medición.

7.3.5.2 Proteína (%)

Para evaluar la cantidad de proteínas presentes en los microgreens se utilizó el método reportado por Kjeldahl (1883) con algunas modificaciones menores. Brevemente, se desarrolló una digestión a 430°C (Foss Tecator Mod. 2040) con ácido sulfúrico, usando 0.1 g EDTA como estándar interno, seguido de una etapa de destilación usando el mismo aparato.

7.3.5.4 Lípidos (g)

Para extraer tantos lípidos como es posible, se utilizó el método Soxtec-Avantii reportado por MAFF (1981). Brevemente, fueron colocados 0.5 g de cada muestra por 80 de éter de petróleo; la solución formada fue llevada a 10 min de inmersión y 40 minutos de goteo de solvente, enseguida fue llevada a 15 min de pre-secado. Finalmente, las muestras fueron secadas a 103°C por 1 hora; el contenido lipídico fue cuantificado por diferencias de peso.

7.3.5.3 Humedad (%) y peso fresco (g)

Para determinar las diferencias de peso entre los tratamientos se desarrolló el mismo procedimiento para todas las especies de microgreens. Las plantas fueron lavadas y pesadas en una balanza analítica.

El proceso para determinar humedad en las muestras se llevó a cabo de acuerdo a lo estipulado por la norma in NMX-F-083-1986. Brevemente, fueron analizados 2 g por muestra, colocados a punto fusión (previamente puesto a peso constante), enseguida se colocó la muestra a 105°C por 4 horas. Inmediatamente después se colocó a temperatura ambiente por 40 min. Finalmente, la muestra resultante fue pesada en una balanza analítica.

7.3.5.4 Fibra (%)

La fibra es un residuo orgánico no soluble extraído del material libre de lípidos, cuando se diluye en agua bajo condiciones controladas ácido/alkalí. En este caso,

se utilizó el método de hidrólisis sucesivas reportado por Tejada (1985). Brevemente, fueron pesados 2 g por muestra, enseguida se realizó un paso de hidrólisis ácido con ácido sulfúrico (0.255 N) y lavados sucesivos con 50 mL de agua destilada. Entonces se realizó una hidrólisis alcalina con hidróxido de sodio (0.255 N) y lavados sucesivos con 50 mL de agua destilada. Finalmente, las muestras fueron lavadas con 50 mL de alcohol etílico. La cantidad de fibra por muestra fue determinada por diferencia de peso.

7.4 Microgreens como vehículo para *D. hansenii*

Se seleccionó como plataforma alimentaria (vehículo de probiótico) aquel microgreen en el que *D. hansenii* tuvo un mayor control biológico (*A. cruentus*) y una mayor modulación de compuestos bioactivos.

7.4.1 Dietas

Al seleccionar solamente un microgreen se obtuvieron las dietas explicadas en la tabla II.

Tabla II. Dietas experimentales para evaluar microgreens como plataforma alimentaria de *D. hansenii*.

Dieta	Componentes	Efecto a evaluar
1. Control	Maíz y harina de soya	Microgreen sobre el desarrollo del crecimiento y sistema inmune
2. Control	Microgreen (1 especie)	Crecimiento normal
3. Tratamiento	Microgreen (1 especie) + <i>D. hansenii</i> (1 g/Kg de alimento)	Modulación del sistema inmune y morfología intestinal por efecto de vehículo y probiótico

7.4.2 Bioensayo en *G. gallus*

Un total de 180 pollos de engorda (*G. gallus domesticus*) de un día de edad fueron obtenidos de una granja local (Avícola Huichapa, S.A). La temperatura de mantenimiento fue de 32°C la primera semana, disminuyendo hasta llegar a los

25°C a las 3 semanas. Se utilizó un ciclo de luz/oscuridad de 8/16 respectivamente. El experimento consistió en 3 dietas experimentales que fueron suministradas durante 4 semanas. Cada tratamiento consistió de 3 jaulas y en cada jaula se colocaron veinte pollos ($n = 60$ pollos/tratamiento). Las dietas (Tabla II) y el agua fueron provistas *ad libitum*.

7.4.2.1 Muestreo

Se realizó el pesaje de 3 pollos por corral, seleccionados de manera aleatoria a los días 1, 5, 15 y 30. Enseguida fueron sacrificados. Inmediatamente se tomaron muestras de segmentos de 5 cm de duodeno y fueron conservadas en solución de Bouin (15% ácido pícrico, 5% formol, 1% ácido acético en H₂O) para el análisis histológico (Kuonyoung *et al.*, 2015), mientras que otros segmentos de duodeno, yeyuno e íleon, así como de médula ósea, timo y bolsa de Fabricio fueron conservados en Trizol® (Invitrogen) para extracción de mRNA (Kuong-Woo *et al.*, 2015).

7.4.3 Análisis histológico

Todas las muestras fueron tomadas de la misma sección espacial de tracto digestivo. Las muestras de duodeno conservadas en solución de Bouin se deshidrataron en alcohol etílico (30, 50, 70 y 100%) y fueron embebidas en parafina. Se realizaron laminillas de un décimo de cada sección de tejido (5 µm) y se tiñieron con hematoxilina-eosina (Avwiro, 2011). Este procedimiento genera una sección transversal y longitudinal del tracto digestivo. Utilizando un microscopio óptico BMX50, se tomaron micrografías a diferentes aumentos, 4x, 10x, 20x, 40x, 100x. La altura y área del villus se realizó medida mediante un software de análisis de imagen (ImagePro Plus®). Cada medición histológica reportada es la media de 30 mediciones (3 secciones y 10 villus por sección).

7.4.4.1 Diseño de cebadores

Se seleccionaron los genes pertenecientes a *G. gallus domesticus* que representan diferentes tipos de respuesta inmune y que han sido reportados para probióticos en el trabajo de Kuonyoung *et al.* (2015). Para cada par de cebadores

se realizó el siguiente procedimiento. Se descargó el archivo en formato FASTA de la región codificante del gen seleccionado, enseguida se realizó el diseño de cebadores en el programa Primer3Plus, estableciendo los siguientes parámetros: tamaño de 18-22 nucleótidos, 55°C de alineamiento, 50% de GC. Una vez seleccionado. Una vez que el software detectó un par de cebadores con las características adecuadas se procedió a evaluar el parámetro de GC clamp < 2 en oligoevaluator (Sigma-Aldrich) para determinar la fuerza de unión y corroborar los parámetros de Primer3Plus®. Teniendo todos los parámetros con las características adecuadas se evaluó cada par de cebadores en FastPCR®, en este software se determinó su funcionalidad para el PCR y el tamaño esperado del amplicón *in silico*.

7.4.4.2 Evaluación de temperatura de alineamiento para cebadores

De acuerdo al diseño de cebadores se decidió evaluar la temperatura de alineamiento de los mismos utilizando PCR de gradiente, esto para estandarizar las pruebas subsecuentes de qPCR. El gradiente utilizado así como, el tipo de tejido, se muestran en la tabla III. El análisis de los productos del PCR de gradiente se realizó mediante gel de agarosa al 1% a 60 V y tinción con SyberSafe® (Sigma-Aldrich).

7.4.4 Extracción de ARN y síntesis de ADNc

El ARN total fue extraído de los tejidos muestreados usando el método de Trizol® como lo describe Park *et al.* (2008). 1 µg de ARN total por muestra fue tratado con 1.0 U de ADNasa I y 1.0 µL de buffer de reacción 10x (Sigma-Aldrich®), incubados por 15 min a temperatura ambiente. Enseguida se agregó 1.0 µL de solución de paro, la mezcla fue calentada a 70°C por 10 min. El ARN fue transcrito de manera reversa usando el sistema de GoScript (Promega, USA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Tabla III. Estandarización de temperatura de alineamiento de cebadores para RT-qPCR.

Gen	Temperaturas (°C)	Tejido
<i>18S</i>	58 – 60 – 62	Todos
<i>GAPDH</i>	58 – 60 – 62	
<i>β-Actina</i>	58 – 60 – 62	
<i>IFN</i>	50 – 52 – 54	No estómago
<i>IL1β</i>	58 – 60 – 62	
<i>IL10</i>	58 – 60.4 – 62	
<i>IL13</i>	55.3 – 58.8 – 62	
<i>IL8</i>	54 – 56.3 – 60	
<i>IL6</i>	58 – 59.8 – 61.9	
<i>IL4</i>	57	
<i>IL12</i>	54 – 56.2 – 58	
<i>IL2</i>	53	
<i>CTRC</i>	59 – 60 61.5	
<i>PGA</i>	56.5 – 58.6 – 62	
<i>PNLIP</i>	54.3 – 56.8 – 60	
<i>AMY</i>	52 – 55.5 59.9	
<i>NPY</i>	56 – 57.7 – 59.6	

7.4.3 Curva de calibración y RT-qPCR

Se utilizó el kit Sso Fast Evagreen Supermix (BIORAD®) para la evaluación de curvas de calibración y muestras problema, de acuerdo a lo siguiente: 5 µL de Sso Fast Evagreen Supermix, 0.3 µL de cada cebador (forward y reverse), 3.9 µL de agua destilada miliQ, y por último 0.5 µL de ADNc, teniendo un volumen final de 10 µL. Las curvas de calibración tanto del gen de referencia (*GAPDH*) como de los genes problema (*IL8* y *AMY2A*) fueron realizadas tomando ADNc de una mezcla de todas las muestras, y utilizando diluciones seriadas 1:0, 1:5, 1:10, 1:20 y 1:40. Todas las reacciones se llevaron a cabo en placas de 96 pozos (Hard Shell Plates C50, BIORAD®) en el equipo CFX96 Real-Time System (BIORAD®). El programa de amplificación utilizado fue: 95°C durante 5 min, 40 ciclos de 95°C durante 15 s, 58°C durante 20 s y 72°C por 25 s, por último se agregó al programa una curva de disociación evaluando cada 0.5°C en el rango 65°C-95°C. Con lo anterior se determinó la concentración de ADNc a utilizar (1:40).

Los valores de C_T obtenidos de todas las reacciones se trasladaron a hojas de cálculo después de un proceso de normalización respecto a la curva de calibración del gen de referencia, esto mediante el software Bio-Rad CFX Manager (BIORAD®). Para el análisis se utilizó la fórmula $2^{-\Delta\Delta C_t}$ utilizando como gen de referencia a *GAPDH* (Kuonyoung *et al.*, 2015). De acuerdo al tipo de datos obtenidos se analizaron mediante el análisis estadístico ANOVA ($P < 0.05$) y Holm-Sidak ($P < 0.05$) mediante el software SigmaPlot v.11.0 (Livak y Schmittgen, 2001).

7.5 Análisis estadístico

A los resultados obtenidos de cada uno de los tres objetivos específicos se les realizó un análisis de normalidad, homocedasticidad e independencia de medias. Para la evaluación del control biológico *in vitro* se tuvo un diseño bifactorial (tratamiento y tiempo).

Para la evaluación de control biológico *in vivo*, evaluación de compuestos bioactivos y prueba como vehículo de probiótico sólo se tiene un factor (concentración de *D. hansenii*) teniendo como variables de respuesta el área de inhibición, concentración de compuestos bioactivos y desarrollo, respectivamente.

Se utilizaron análisis de varianza (ANOVA) con prueba de Tukey HSD con un mínimo de significancia de $P < 0.05$ para cada paquete de datos obtenidos. El software SigmaPlot (v.11.0.0) fue utilizado para el análisis y creación de gráficos.

8. RESULTADOS

8.1 Control biológico.

8.1.1 Evaluación *in vitro*

Para determinar la existencia de inhibición o algún tipo de control biológico se realizó un ensayo *in vitro* en medio YEPD, esto con la finalidad de proveer a la levadura marina de condiciones favorables para su desarrollo. Se retó a *D. hansenii* contra el crecimiento de dos enterobacterias patógenas para humanos (*E. coli* O157:H7 y *S. typhimurium* y una cepa fúngica patógena para plantas y humanos (*A. flavus*). En cada ensayo se evaluó tanto la cinética del patógeno en cuestión, como la cinética de la levadura en presencia de éste. De acuerdo al análisis estadístico realizado (ANOVA) se determinó que la disminución en la densidad celular bacteriana es estadísticamente significativa cuando los patógenos estuvieron en presencia de la levadura marina (Fig. 2) mientras que ésta última mantuvo una densidad celular relativamente constante.

8.1.2 Evaluación *in vivo*

8.1.2.1 Ganancia de peso

Con la finalidad de evaluar la influencia por la presencia de *D. hansenii* como tratamiento sobre la biomasa de las plantas en estadio de microgreen, se realizó el bioensayo de ganancia de peso, en el cual se midió a tiempo final la ganancia ó pérdida de peso fresco de las cinco especies. El análisis de los datos nos indica que el tratamiento aumenta el peso fresco de las plantas (Fig. 3), de manera significativa para *A. cruentus*, *E. sativa* y *B. oleracea* var. *gemmifera*, mientras que de manera altamente significativa para *A. graveolens*. El caso contrario sucede con *O. basilicum* dónde se observa una disminución en el peso fresco en plantas tratadas con la levadura marina.

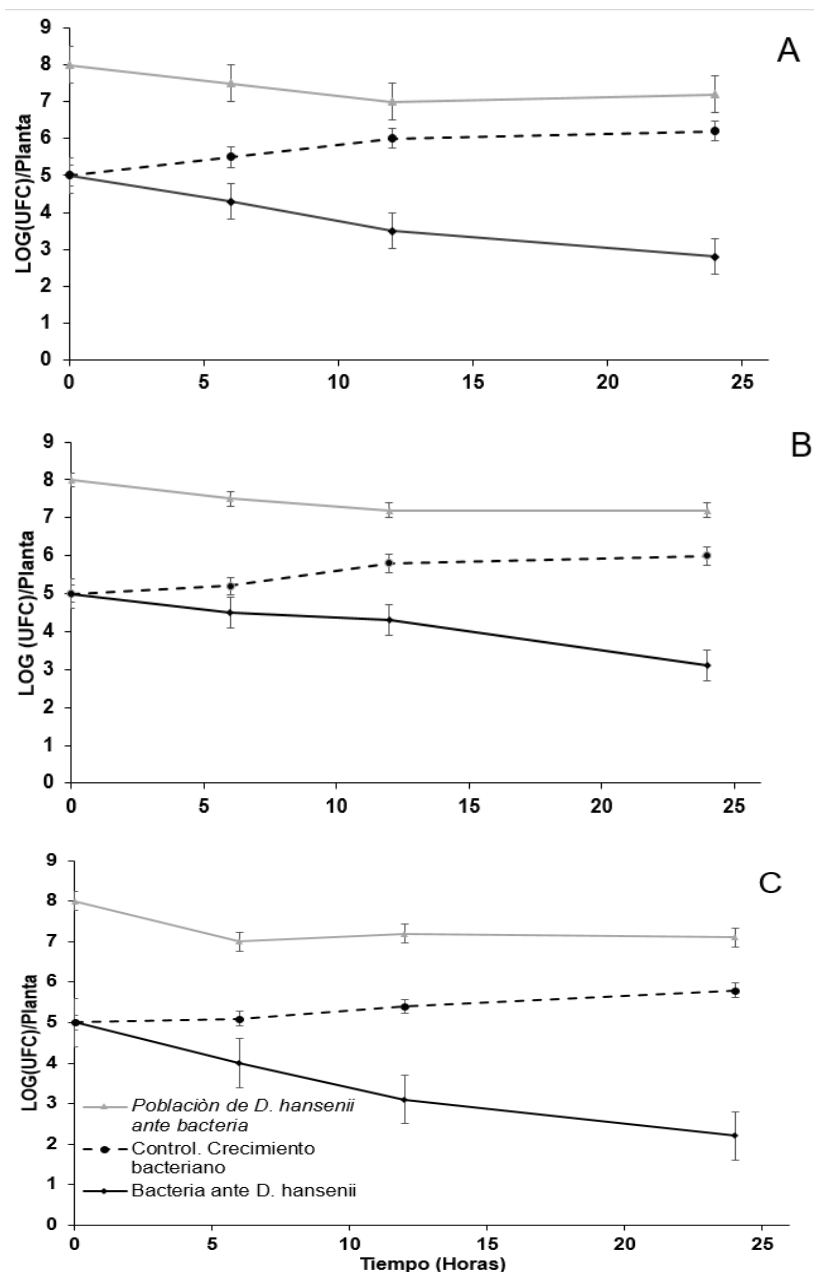


Figura 2. Actividad *in vitro* de *D. hansenii* contra A) *E. coli* O157:H7, B) *S. typhimurium* y C) *A. flavus* en medio líquido YEPD. Las barras verticales representan \pm el error estándar, y las letras representan la significancia estadística de acuerdo al análisis de ANOVA.

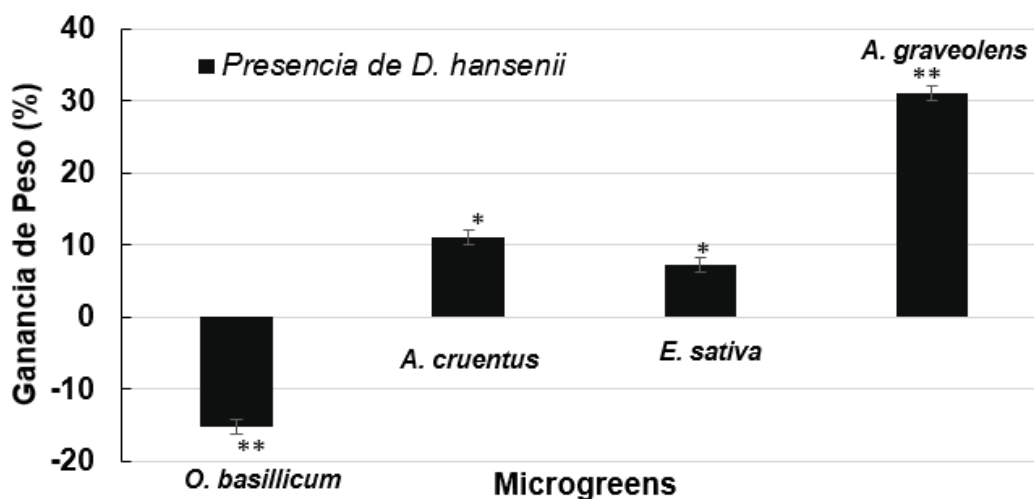


Figura 3 Ganancia de peso de *O. basilicum*, *A. cruentus*, *E. sativa*, *B. oleracea* var. *gemmifera* y *A. graveolens* en estadio de microgreen y tratados con *D. hansenii* mediante aspersión sobre las especies de microgreen el día 3 después de la germinación. Los datos se encuentran normalizados respecto al tratamiento control. Las barras verticales representan \pm error estándar. En análisis de ANOVA * = $P > 0.05$ significancia, ** $P > 0.01$ altamente significativo.

8.1.2.2 Influencia en la germinación

En la búsqueda de estrategias de aplicación del tratamiento antifúngico y determinación de su influencia en la germinación de la semilla de alguna de las cinco especies, encontramos que como se muestra en la figura 4, el comportamiento del tratamiento es dependiente del tiempo. Analizamos la influencia de *D. hansenii* por planta. En el caso de *O. basilicum* (Fig.4 A) la levadura presenta un efecto positivo en la germinación, es decir, las semillas germinan más rápido que las no tratadas, teniendo el mismo comportamiento protector en presencia del patógeno fúngico. Para *A. cruentus* (Fig. 4 B) la presencia de la levadura marina no promueve la germinación pero tampoco afecta el proceso, mientras que brinda protección contra el patógeno; el mismo comportamiento se observa con *E. sativa* (Fig.4 C). En *A. graveolens* (Fig. 4 D) la presencia de nuestro agente no afecta la germinación, es decir, se observa el mismo número de plantas germinadas que cuando solamente se trataron con agua destilada, mientras que a protección es similar a la ofrecida por el agente

químico. Por último, para *B. olaracea* (Fig. 4 E) se observa que la levadura promueve la germinación, y ejerce el efecto anti-fúngico.

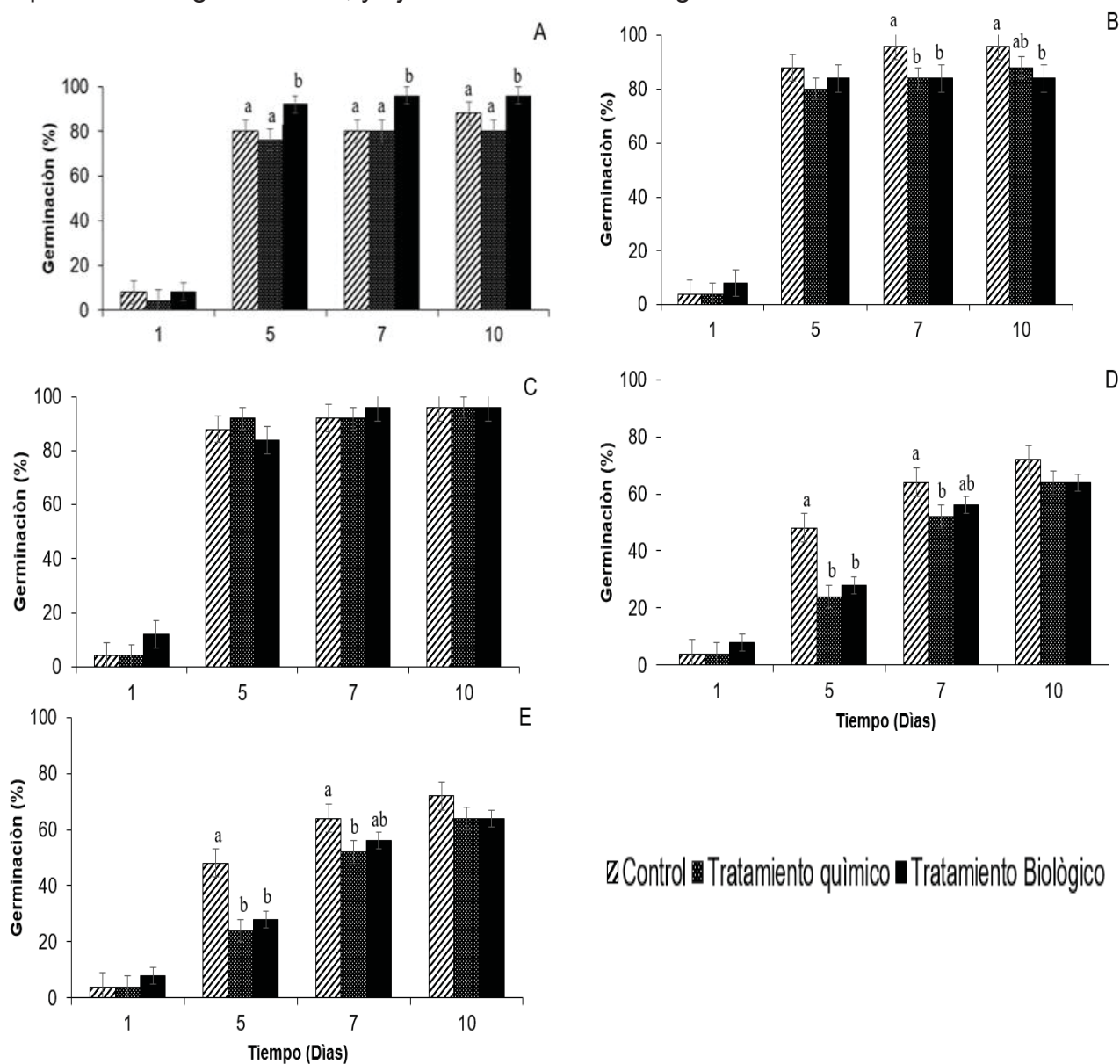


Figura 4. Influencia de *D. hansenii* sobre la germinación de: A) *O. basilicum*, B) *A. cruentus*, C) *E. sativa*, D) *A. graveolens* y E) *B. olaracea* var. *gemmifera* en estadio de microgreen. Las barras verticales representan \pm error estándar. Las letras representan la significancia ($P < 0.05$) de acuerdo al análisis de ANOVA entre tiempos.

8.1.2.3 Dinámica poblacional

La dinámica poblacional es diferente para cada patógeno aunque colonicen el mismo sustrato, por ello, se decidió evaluar este comportamiento para los tres patógenos sobre cada una de las especies de microgreens tratados con *D. hansenii* un día después de la germinación. Se obtuvieron cinéticas de inhibición bacteriana (*E. coli* O157:H7 y *S. enterica*) similares para cuatro de las cinco especies (Fig. 5 A, B, C y D). Se observó que la densidad celular disminuye a partir del día 3, sin embargo, a partir del día 7 se mantiene constante, lo que podría sugerir que es necesaria la aplicación de otra dosis de *D. hansenii* para que se mantenga el efecto. Para el caso de *A. graveolens* (Fig. 5 E) las cinéticas de inhibición bacteriana aunque mostraron un comportamiento similar al anteriormente descrito, lo hicieron manteniendo una densidad celular mayor. Para la cepa fúngica (*A. flavus*) se observó una disminución más pronunciada en densidad de esporas que a partir del día 7 se mantuvo constante para *O. basilicum* (Fig. 5 A), mientras que continuo disminuyendo para las otras cuatro especies (Fig. 5 B, C, D, y E).

8.1.2.4 Pre-tratamiento

Otro fenómeno a conocer fue determinar qué sucede cuando la levadura marina coloniza primero al microgreen y luego aparecen los patógenos. Para ello, se trató a las semillas (sección Materiales y Métodos) con una concentración de *D. hansenii* y el día 3 después de la germinación se asperjaron con igual concentración de levadura, inoculando con las tres cepas patógenas el día 5. Para el caso del patógeno *E. coli* O157:H7 el microgreen donde se observó una mayor disminución en densidad celular fue *O. basilicum* (Fig. 6, A), mientras que para *S. entérica*, la mayor disminución se observó en tres especies de microgreens *O. basilicum*, *A. cruentus* y *B. Olaracea* (Fig. 6 A, B y E); para el patógeno fúngico *A. flavus* éste mantuvo una disminución a punto final igual en todas las especies de microgreen.

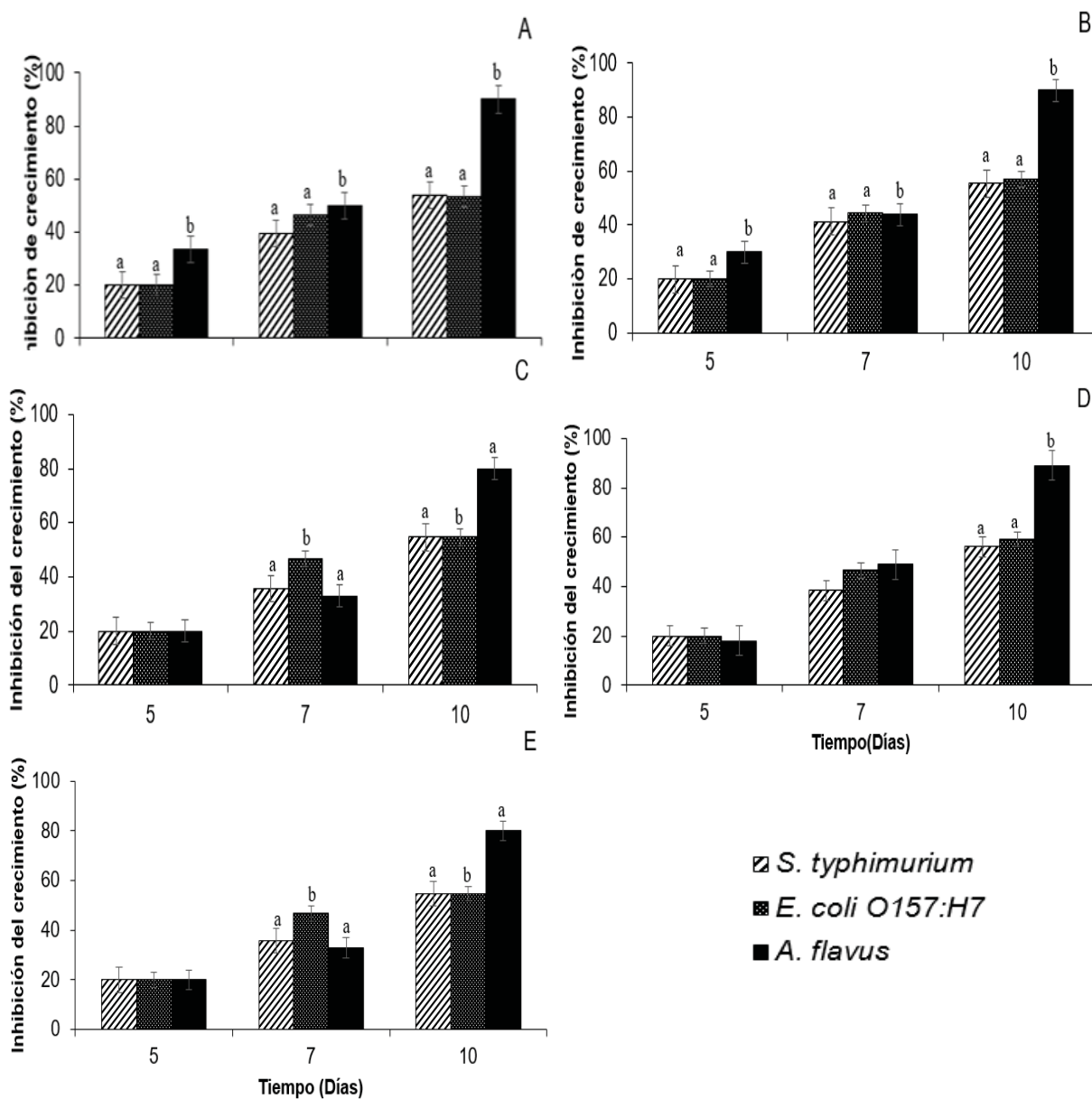


Figura 5. Inhibición de colonización fúngica y bacteriana en cinco especies de plantas en estado de microgreen tratados con *D. hansenii* un día después de la germinación. A) *O. basilicum*, B) *A. cruentus*, C) *E. sativa*, D) *B. oleracea* var. *gemmifera* y E) *A. graveolens*. Las barras verticales representan \pm el error estándar. Las letras representan la significancia ($P < 0.05$) de acuerdo al análisis de ANOVA entre tiempos.

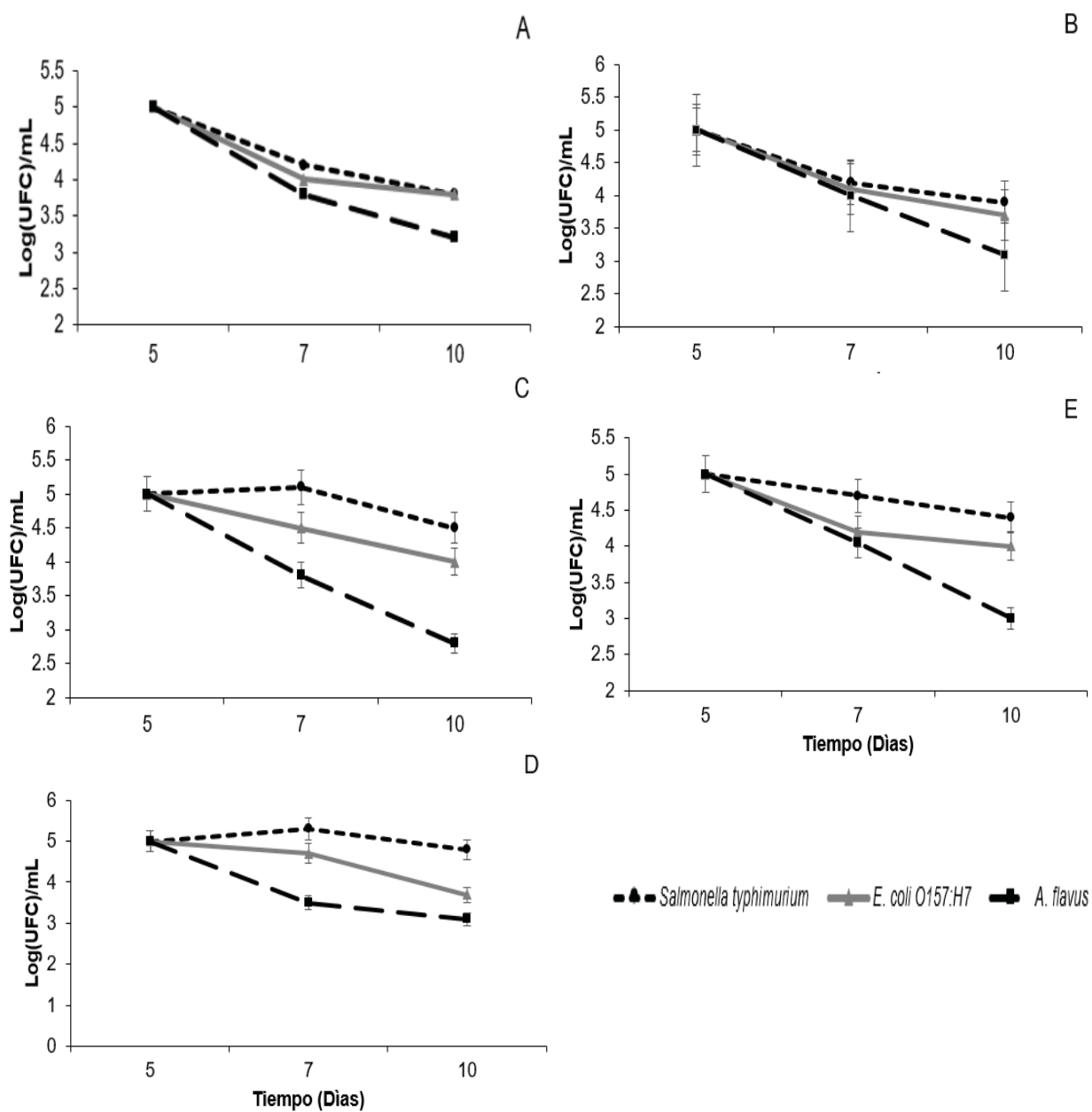


Figura 6. Pretratamiento con *D. hansenii* de cinco especies de plantas en estadio de microgreen. A) *O. basilicum*, B) *A. cruentus*, C) *E. sativa*, D) *B. oleracea* var. *gemmifera* y E) *A. graveolens*.

8.1.2.5 Desplazamiento patogénico y dosis única

Con la finalidad de determinar si la levadura es capaz de desplazar a un patógeno se realizó el siguiente ensayo, en el que las semillas de las cinco especies de plantas fueron tratadas con una concentración conocida de patógeno y el día 5 después de la germinación se inocularon con *D. hansenii*. La especie de planta donde se observó un mayor desplazamiento patogénico fúngico (*A. flavus*) fue en *B. oleracea* (Fig. 7 E) sin embargo, en esta misma especie, al igual que en *E. sativa* (Fig. 7 C) la densidad de levadura disminuyó de manera significativa. Por otro lado, la especie de planta donde se observó una mayor disminución patogénica bacteriana (*E. coli* O157:H7 y *S. enterica*) fue en *O. basilicum* (Fig. 7 A) para este caso la densidad de levadura marina se vio incrementada hasta el día 7 y a partir de ese día se mantuvo constante. El comportamiento mostrado por *D. hansenii* fue misceláneo mostrando un aumento de densidad celular en *A. cruentus* (Fig. 7 B).

8.1.2.6 Desplazamiento patogénico y múltiples dosis

De acuerdo a los resultados obtenidos en la sección 8.1.2.5, se tomaron dos especies de plantas donde el tratamiento con *D. hansenii* provocó una disminución patogénica, pero que la densidad celular de la levadura fue inversa, por ello, se seleccionó a *A. cruentus* y *A. graveolens* (Fig. 8). Modificando la aplicación se obtuvo que la concentración patogénica tanto fúngica (*A. flavus*) como bacteriana (*E. coli* O157:H7 y *S. enterica*) disminuyó hasta tener una concentración menor a 100 microorganismos.

8.1.2.6 Colonización de *D. hansenii* sobre microgreens

Con la finalidad de explorar si *D. hansenii* podría colonizar la superficie de los microgreens fue desarrollado el siguiente experimento. *D. hansenii* colonización presenta variaciones de acuerdo a la especie de microgreen colonizada. Para *O. basilicum* (Fig. 9 A y A1) la levadura marina mostró amplia colonización sobre tallos y hojas, mientras que sobre *A. cruentus* esta se dio preferentemente sobre los tallos (Fig. 9 B y B1).

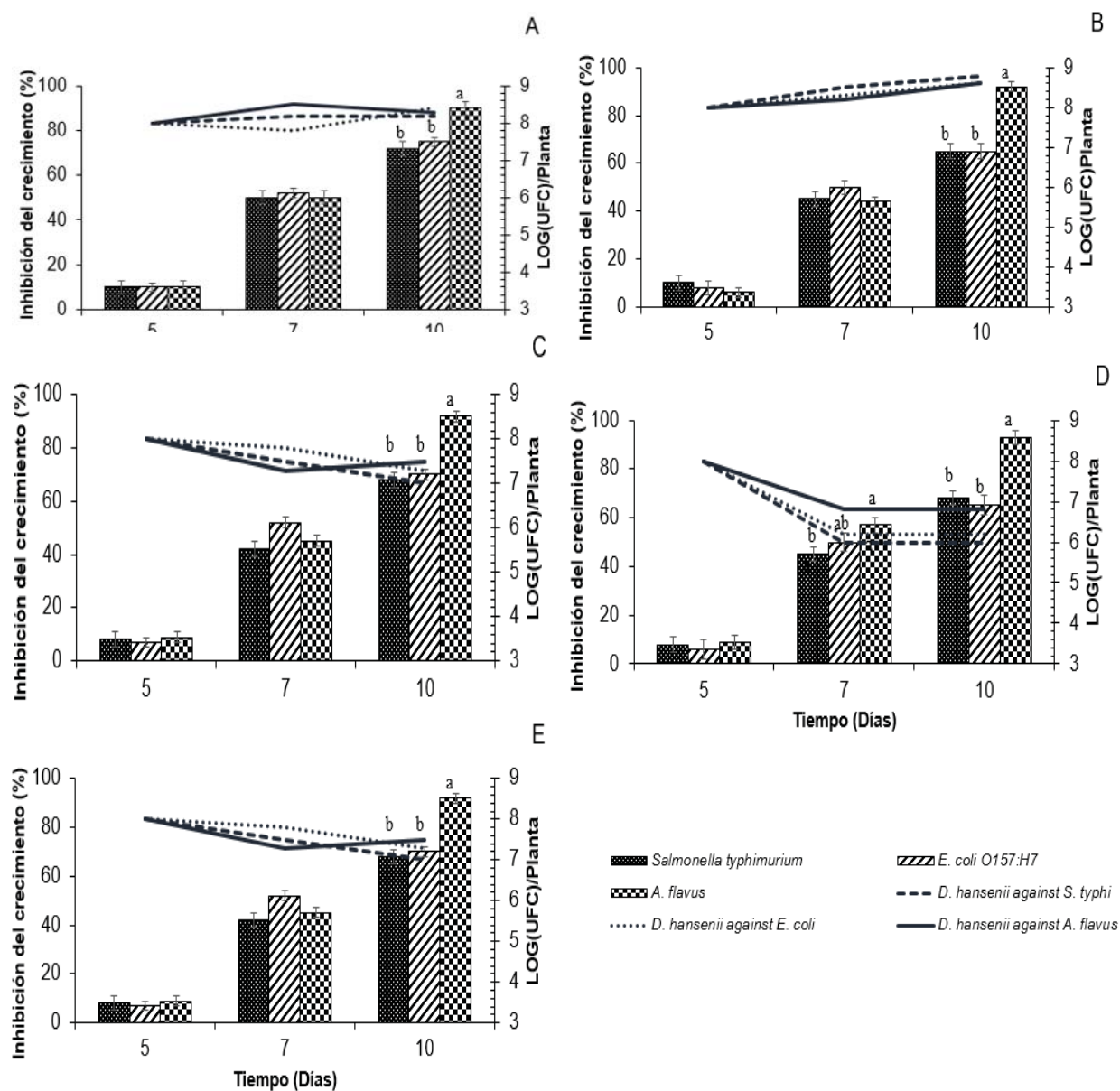


Figura 7. Desplazamiento de los patógenos adheridos por la presencia de *D. hansenii* en microgreens después de 2 días de tratamiento. A) *O. basilicum*, B) *A. cruentus*, C) *E. sativa*, E) *A. graveolens* y D) *B. oleracea* var. *gemmifera*.

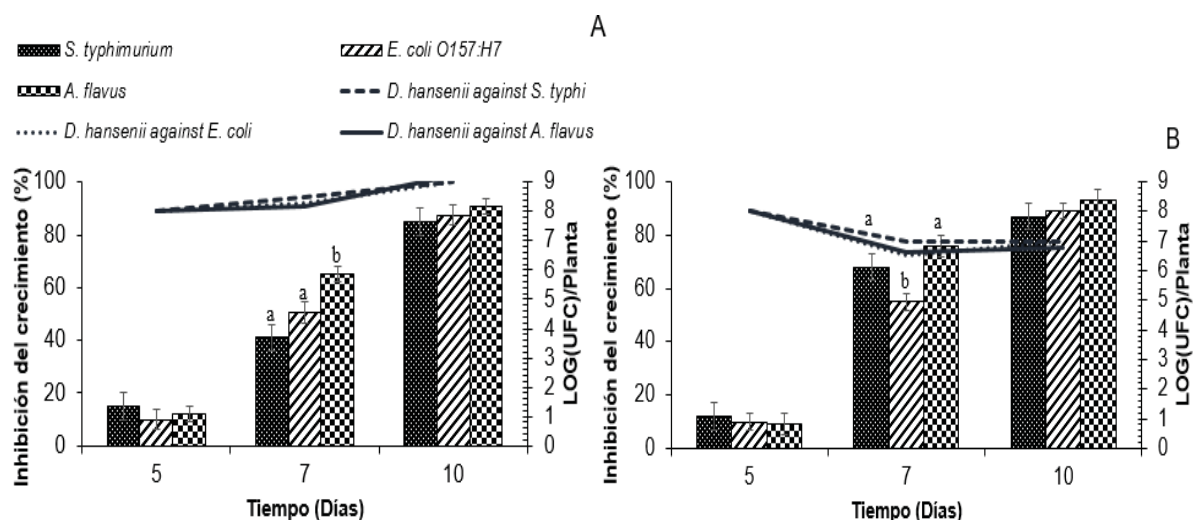


Figura 8. Desplazamiento del patógeno adherido en microgreens tratados con *D. hansenii* cada 48 horas. A) *A. cruentus* y B) *A. graveolens*.

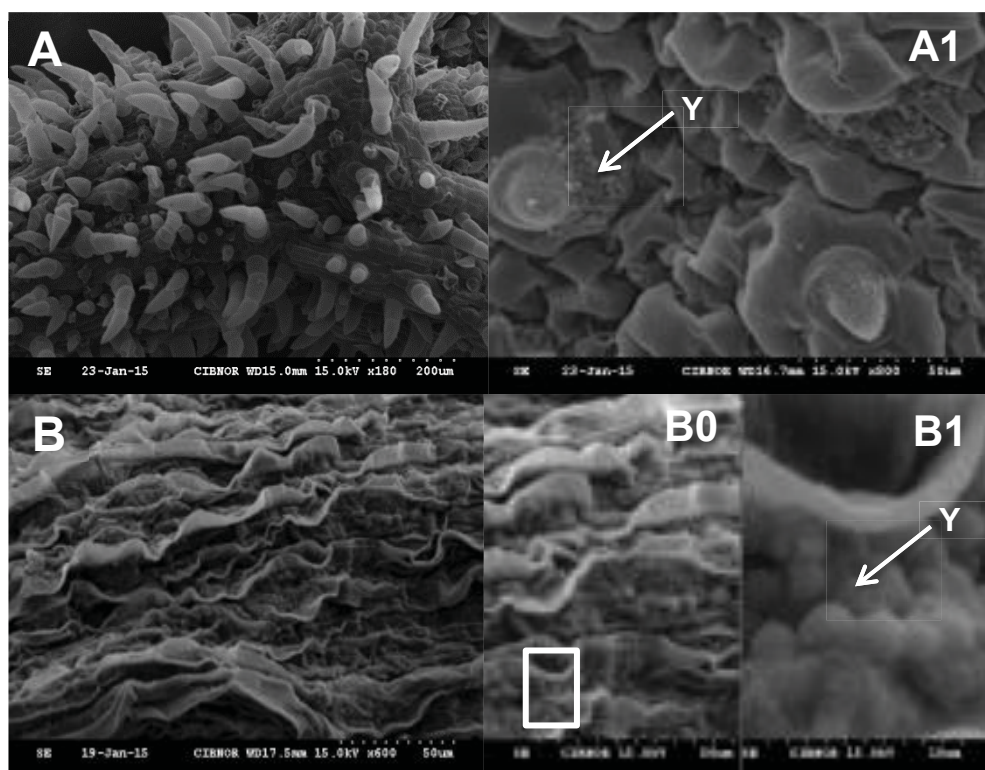


Figura 9. Colonización de *D. hansenii* al día 10 después de su inoculación sobre la superficie de albahaca y amaranto. A) *O. basilicum* tratado con agua destilada, A1) *O. basilicum* tratada con *D. hansenii*; B) *A. cruentus* tratada con agua destilada; B0) *A. cruentus* tratada con *D. hansenii*; B1) aumento de B0 a 100X; (Y) Presencia de *D. hansenii*.

El establecimiento de *D. hansenii* sobre col de brúselas (*B. oleracea* var. *gemmifera*) fue muy particular porque se formaron agregados celulares que pueden observarse en la figura 10 A y A1, teniendo una amplia distribución sobre hojas y tallos. Por otro lado, la colonización de levadura sobre *E. sativa* formó grandes agregados celulares con liberación extracelular de una película de polisacáridos, mientras que la colonización sobre *A. graveolens* (Fig. 10 B, B0 y B1) presentó liberación de una matriz pero la el número de células de *D. hansenii* fue visiblemente menor que en otras superficies evaluadas.

LSCM confirmó que la colonización por *D. hansenii* presenta diferentes conformaciones de acuerdo a la superficie colonizada (Fig. 11, columnas 2-3) y la capa que forma durante esta colonización presenta diferente profundidad y forma. En el caso de *O. basilicum* la capa presenta 30 μm de profundidad, mientras que *A. cruentus* sólo mostró 8 μm , *E. sativa* 15 μm y *A. graveolens* 15 μm .

La MER mostró que *D. hansenii* secreta de acuerdo a la superficie donde se desarrolle una capa de lo que parecen ser polisacáridos, bajo esta, la levadura presenta una conformación tipo biopelícula. Esta conformación, es dependiente de superficie (Fig. 12), en el caso de microgreens de albahaca (Fig. 12, A) la secreción se presenta en toda el área colonizada y de manera abundante; para microgreens de amaranto la levadura colonizada de manera dispersa y con secreción esporádica (Fig. 12 B); para microgreens de arugula, la colonización se dio de manera similar que en albahaca (Fig. 12 C); en microgreens de col de Bruselas la colonización se dio de manera agresiva, pudiéndose observar una degradación de la hoja del microgreen; y por último, en microgreens de eneldo, *D. hansenii* logra colonizar, se presenta secreción esporádica de polisacáridos aún con conformación tipo biopelícula.

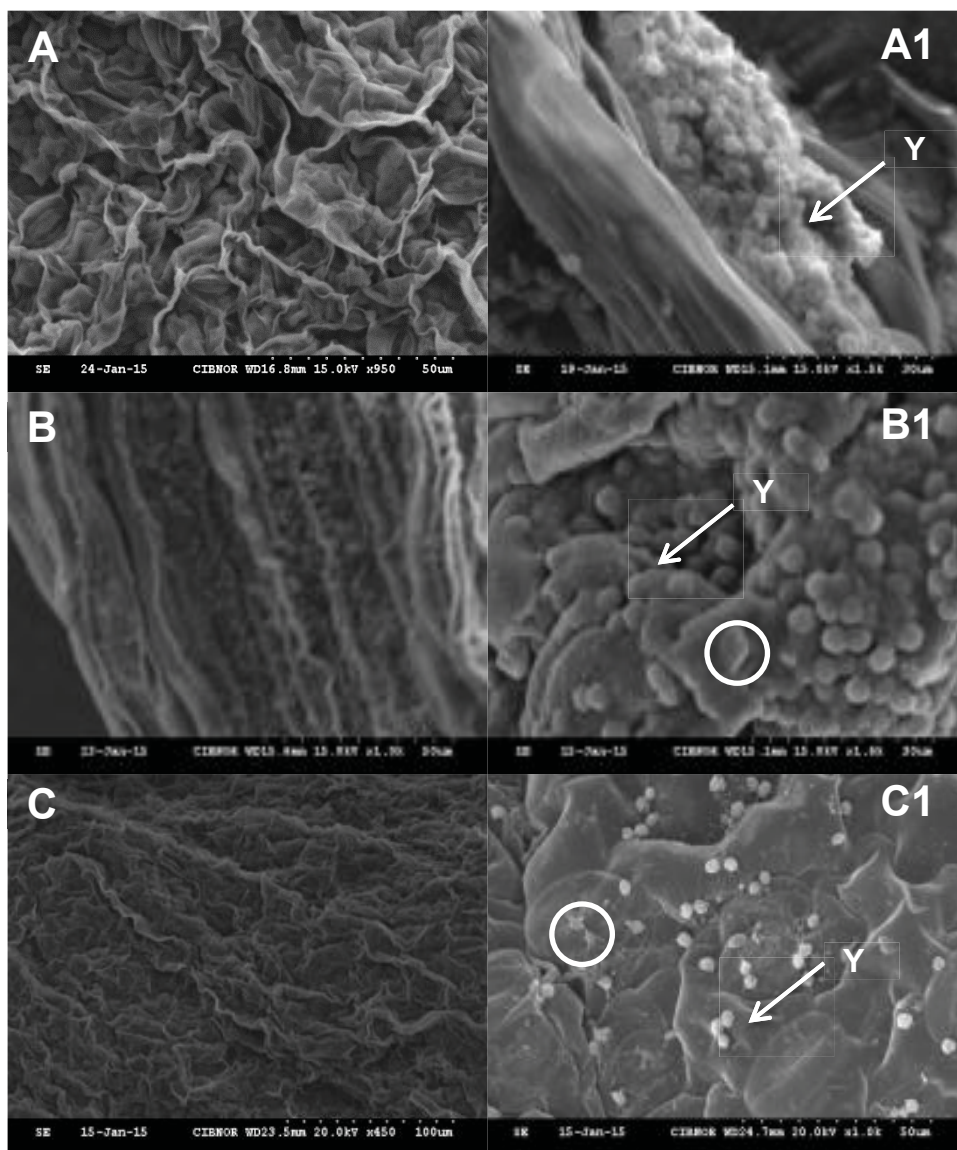


Figura 10. Colonización de *D. hansenii* al día 10 después de su inoculación sobre col de brúselas, arugula y eneldo. A) *B. oleracea* tratada con agua destilada; A1) *B. oleracea* tratada con *D. hansenii*; B) *E. sativa* tratada con agua destilada; B1) *E. sativa* tratada con *D. hansenii*; C) *A. graveolens* tratada con agua destilada; C1) *A. graveolens* tratada con *D. hansenii*; (Y) presencia de *D. hansenii*; liberación de matriz dentro del círculo.

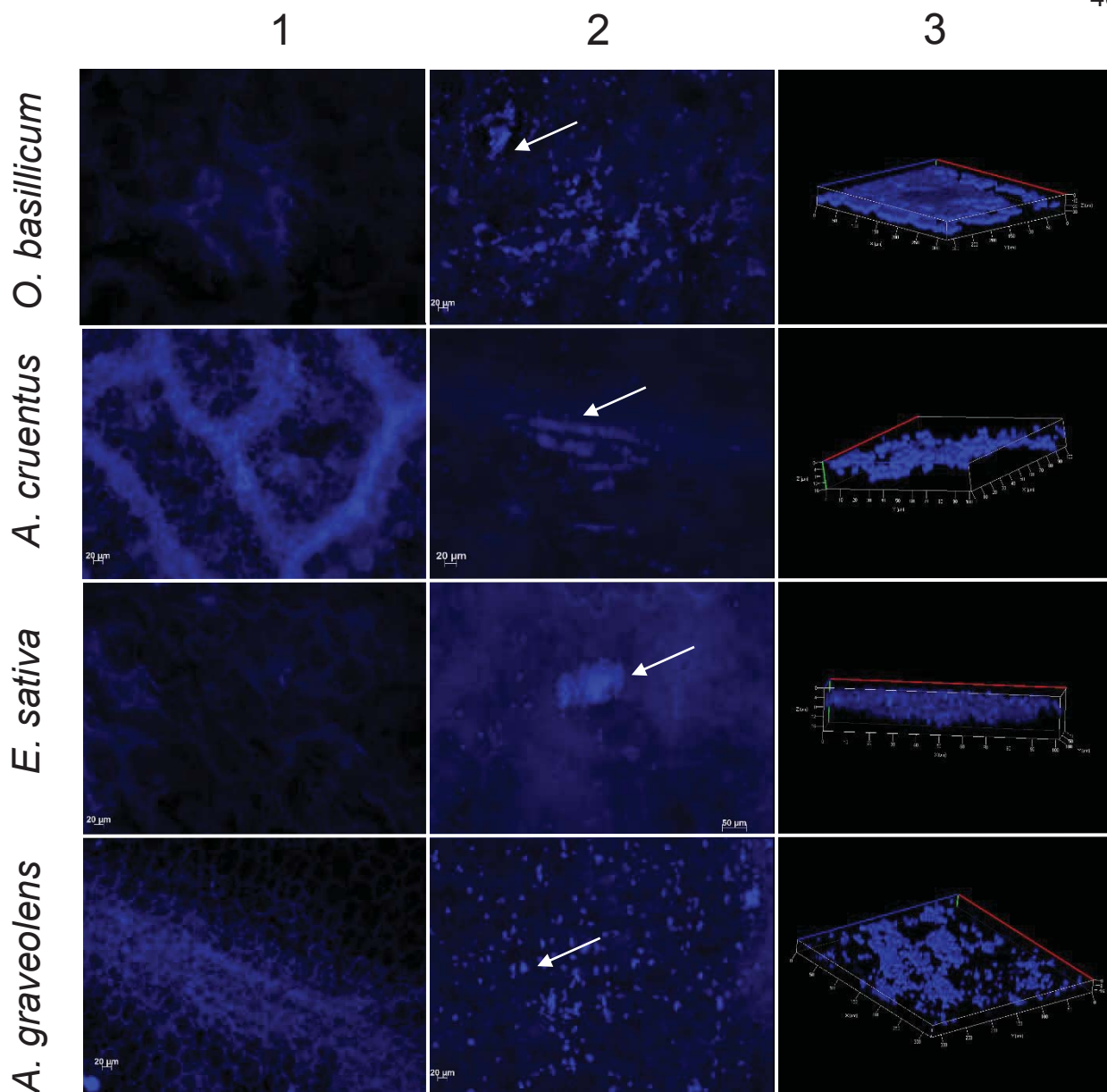


Figura 11. Conformación especial de *D. hansenii* sobre hojas de cuatro especies de microgreen. LSCM muestra autofluorescencia de cuatro especies de microgreens (columna 1). Imágenes de superficie muestran la ubicación exacta de la levadura (columna 2); finalmente un modelo en 3 dimensiones (3D) muestra la conformación espacial de la estructura tipo biopelícula formada por *D. hansenii* (columna 3).

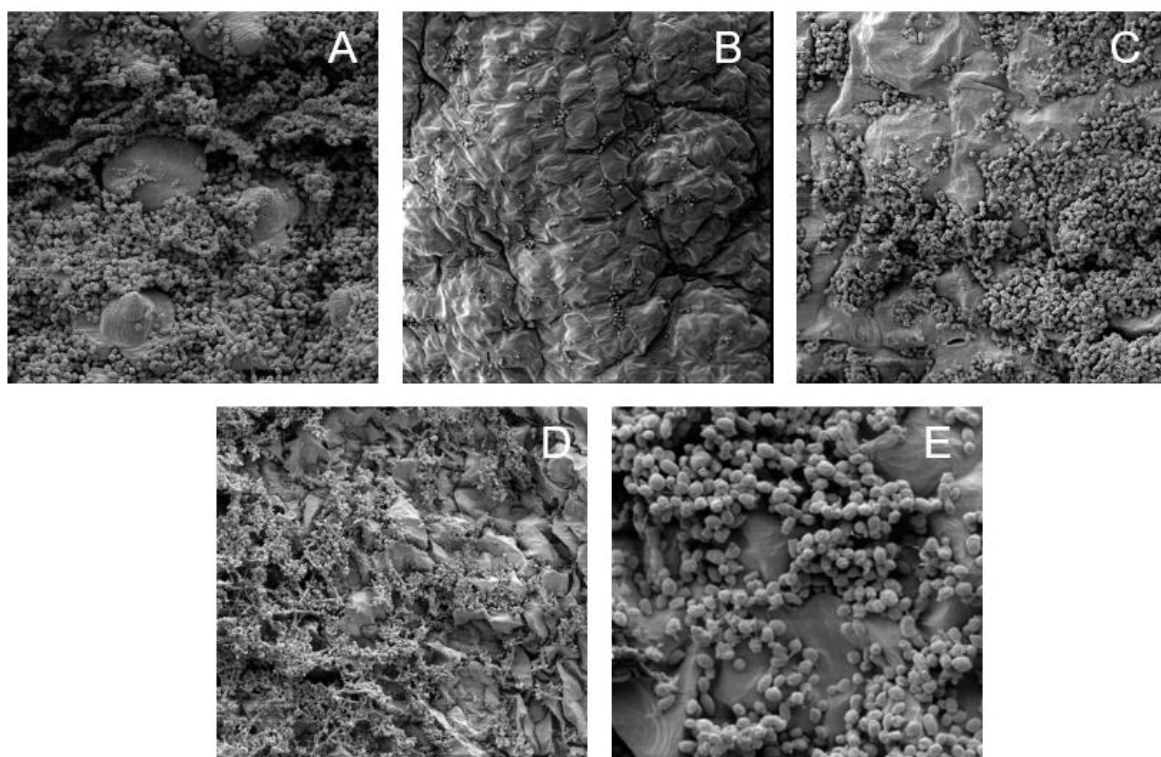


Figura 12. Liberación de matriz extracelular por *D. hansenii* sobre diferentes especies de microgreens. MER muestra la presencia de una matriz extracelular tipo polisacárido diferente para cada especie colonizada. Imágenes de superficie muestran la conformación de *D. hansenii* tipo biopelícula sobre *O. basilicum* (A), *A. cruentus* (B), *E. sativa* (C), *B. oleracea* var. *gemmaifera* (D) y *A. graveolens* (E).

8.1.3 Evaluación de la aplicación del tratamiento con *D. hansenii*

En relación a la aplicación del tratamiento, *D. hansenii* presentó el mismo comportamiento contra los tres patógenos (Fig. 13 renglones 1-3), mientras que no fue así para la colonización en superficies diferentes (Fig. 13, columnas). En albahaca, arugula y eneldo, el tratamiento con la levadura fue más efectivo cuando su aplicación fue directa sobre la semilla; mientras que en amaranto la mejor manera de aplicar el tratamiento de control biológico es usando más de una dosis. Finalmente, para col de brúselas, no funcionaron los tratamientos de semillas y una vez germinada la planta.

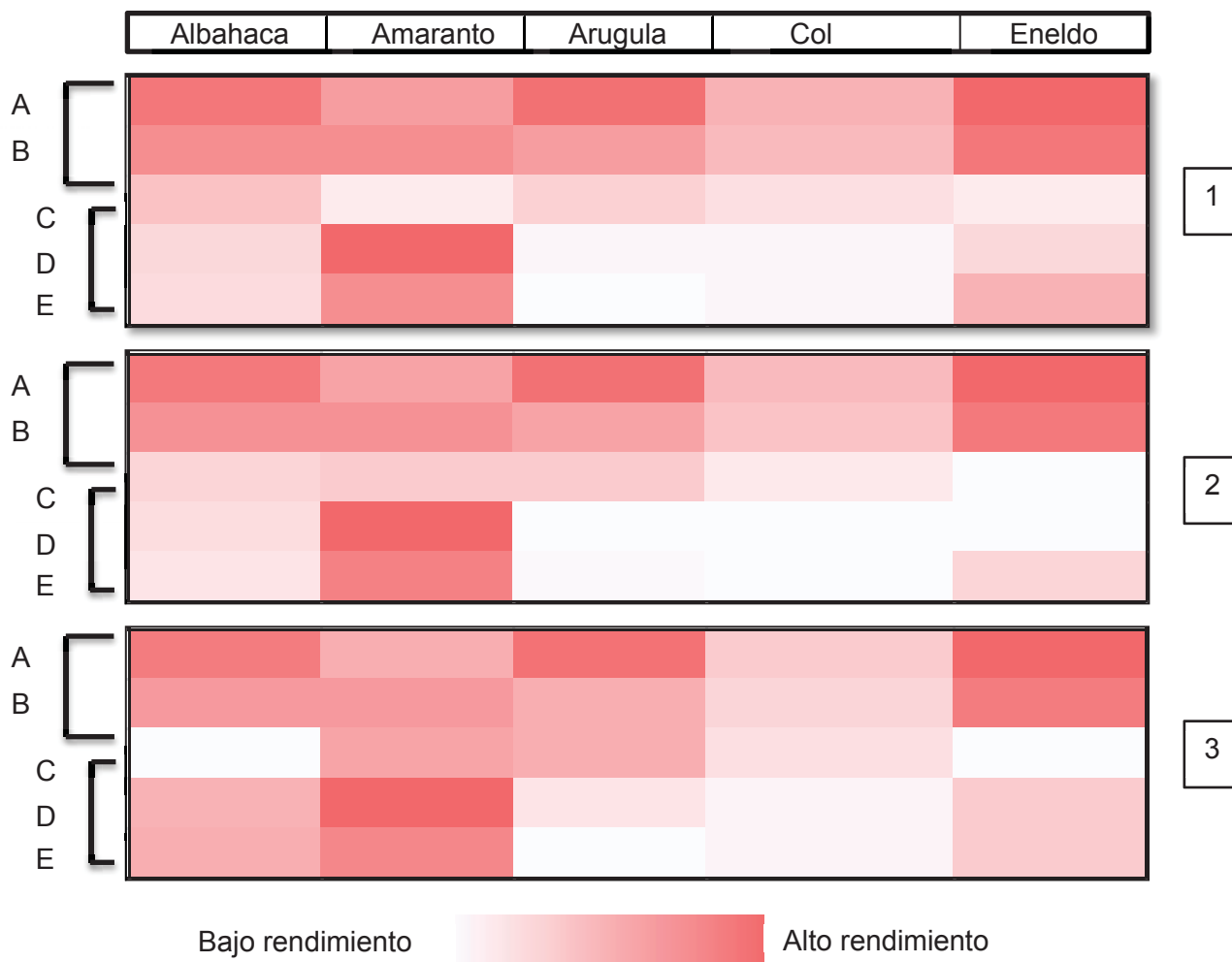


Figura 13. Mapa de calor de la aplicación del tratamiento con *D. hansenii* por patógeno inhibido. Patógenos: 1) *S. typhimurium*; 2) *E. coli* O157:H7; y 3) *A. flavus*. Los bioensayos correlacionados fueron: A) Promoción de la germinación; B) Protección de la semilla; C) Dosis 1; D) Dosis 2; finalmente E) Desplazamiento patogénico. Los datos fueron analizados mediante la prueba de correlación de Pearson.

8.2 Evaluación de compuestos bioactivos

8.2.1 Análisis químico proximal. Análisis nutricional

Los análisis nutricionales mostraron que la aplicación del tratamiento de *D. hansenii* tuvo diferente influencia de acuerdo a la especie de microgreen donde fue aplicado. En albahaca y eneldo, el contenido de proteínas, fibra y energía fueron influenciados por la presencia del agente (Tabla IV, filas 1,5). Mientras que para col de Bruselas sólo el contenido de proteína y fibra fue afectado por el agente (Tabla IV, fila 4), para amaranto lo fueron los contenido de humedad y fibra (Tabla IV, fila 2); finalmente el menos afectado fue el microgreen de arúgula en la que sólo el contenido proteico fue modificado por la presencia del agente (Tabla IV, fila 3).

Tabla IV Evaluación nutricional de cinco especie de microgreens expuestas a tratamiento con *D. hansenii*.

Microgreen	Tratamiento	Análisis			
		Humedad (%)	Proteína (%)	Fibra (%)	Energía (Kcal/g)
<i>Occimum basilicum</i>	<i>D. hansenii</i>	95.6	39.33 ^a	17.03 ^a	3.76 ^a
	Control	95.83	30.87	11.95	3.34
<i>Amaranthus cruentus</i>	<i>D. hansenii</i>	92.2 ^a	40.5 ^a	NE	3.46
	Control	94.4	38.2	NE	3.39
<i>Eruca sativa</i>	<i>D. hansenii</i>	92.71	44.25 ^a	NE	3.56
	Control	93.12	40.53	14.21	3.71
<i>Brassica oleracea</i> var. <i>gemmifera</i>	<i>D. hansenii</i>	94.9	34.89 ^a	16.06 ^a	3.3
	Control	95.9	31.84	15.32	3.58
<i>Anethum graveolens</i>	<i>D. hansenii</i>	92.65	30.15 ^a	21.82	3.38 ^a
	Control	92	21.87	22.21	3.83

^a Los valores seguidos por letras en la misma fila presentaron diferencias significativas respecto al tratamiento control por especie de microgreen evaluada ($P < 0.05$). NE = No Evaluado.

8.2.2 Evaluación de vitaminas hidrosolubles

En esta sección fue evaluado el papel del tratamiento de *D. hansenii* como modulador del metabolismo de síntesis de vitaminas hidrosolubles. Los resultados de la evaluación en albahaca muestran que el tratamiento no afecto el contenido

de vitamina B5, mientras que la vitamina C mostró un incremento significativo (Fig. 14 A); en cuanto a amaranto el agente no tuvo influencia sobre el contenido de vitamina C, contrariamente a lo observado para el tratamiento químico y de radiación UV, mientras que el contenido de vitamina B5 se vio afectado por la presencia de *D. hansenii* (Fig. 14 B); el contenido de vitamina C en col de Bruselas se vio afectado por los cuatro tratamientos empleados mientras que el contenido de vitamina B5 tuvo un comportamiento inverso (Fig. 14 C); en el microgreen de arúgula el contenido tanto de vitamina B5 como de vitamina C no se vieron afectados por el agente y si por los tratamientos radiación/químico (Fig. 14 D); finalmente, el contenido de vitamina C y B5 tuvieron un comportamiento inverso cuando fueron tratados con *D. hansenii* sobre eneldo.

8.2.3 Evaluación de polifenoles y flavonoides

Múltiples compuestos bioactivos fueron evaluados en las diferentes especies de plantas en estadio de microgreen (Tablas V – IX). En el caso del microgreen de albahaca, al ser expuesto a *D. hansenii* se observó una significativa disminución en el 71% de los compuestos evaluados (Tabla V). Sin embargo se presentó un incremento de la cantidad de ác. cítrico (Fig. 15); en el caso del microgreen de amaranto la presencia de *D. hansenii* estimulo la síntesis de luteolina y catecina, compuestos del grupo de los flavonoides, mientras que mitigó la síntesis de polifenoles, como el ácido cafeico, principal precursor de este grupo (Fig. 16); el microgreen de arúgula la presencia del agente de biocontrol estimuló la síntesis de precursores de flavonoides como luteolina y apigenina (Fig. 17); en el microgreen de col de Bruselas, *D. hansenii* logró estimular la síntesis de flavonoides (Fig. 18); y por último, en el microgreen de eneldo, el tratamiento biológico estimulo la síntesis de ácido gálico, un compuesto precursor del grupo de los polifenoles (Fig. 19).

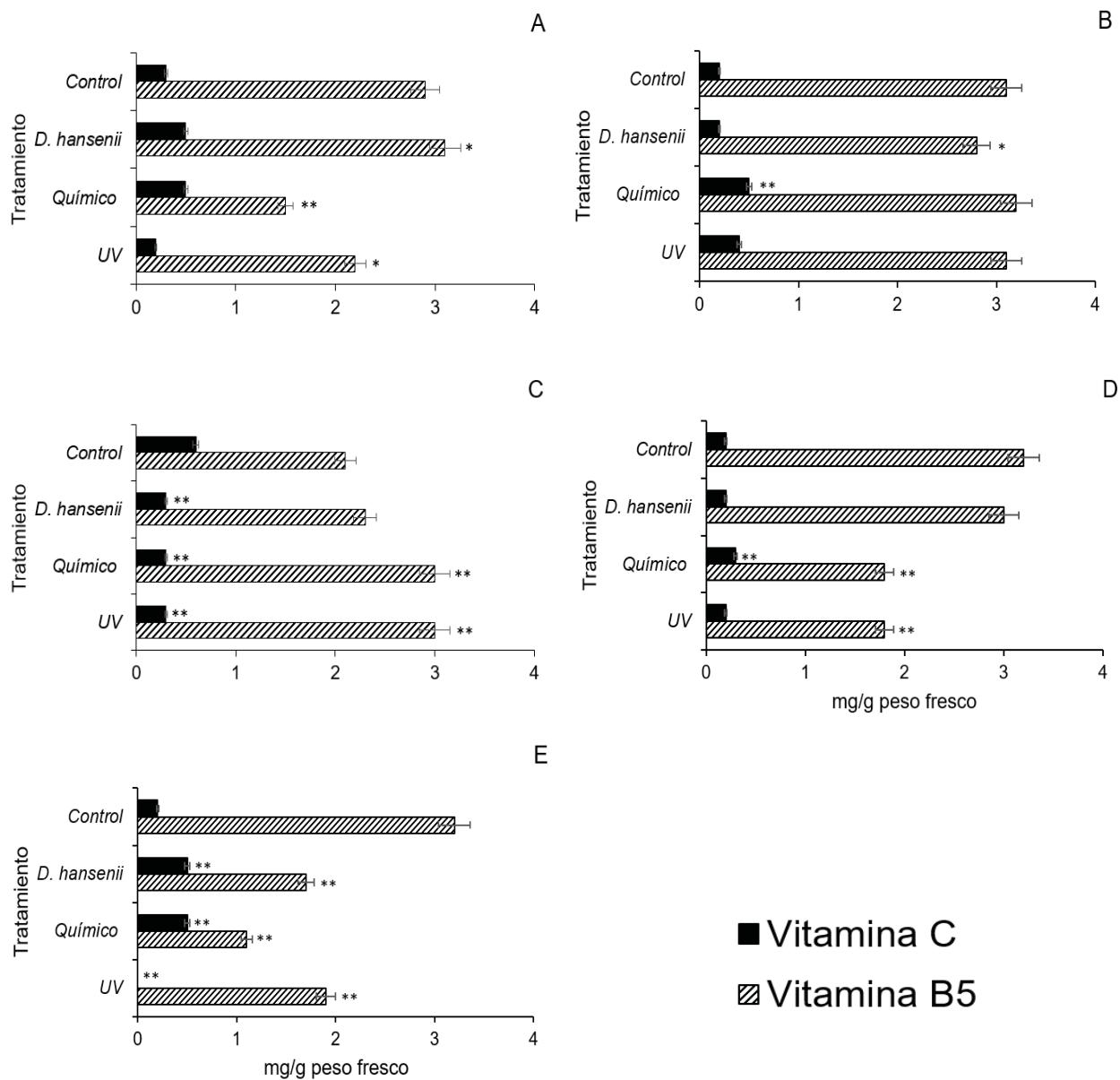


Figura 14. Evaluación de vitaminas hidrosolubles por HPLC/LSM en cinco especies de microgreens expuestas a *D. hansenii*. A) *O. basilicum*; B) *A. cruentus*; C) *B. oleracea*; D) *E. sativa*; y E) *A. graveolens*. Las barras horizontales representan el error estándar. (*, $P > 0.05$; **, $P > 0.01$).

Tabla V. Comparación del contenido de compuestos bioactivos en microgreens de albahaca (*O. basillicum*) expuestos a *D. hansenii* y otras estrategias de protección.

Compuesto	Tratamiento			
	Control (H ₂ O _{dest})	<i>D. hansenii</i> (1x10 ⁸ cél/mL)	Radiación (20 W/m ²)	Químico (CuSO ₄ ·5H ₂ O, 25 ppm)
Ác. caféico	14.262 ^a	9.18 ^b	11.04 ^b	12.29 ^b
Ác. Ferúlico	11.496 ^a	11.72 ^a	0 ^b	14.53 ^c
Ác. Elágico	9.6 ^a	4.325 ^b	7.12 ^b	11.5 ^c
Apigenina	13.725 ^a	13.85 ^a	11.52 ^b	13.07 ^a
Cianidina	13.72 ^a	10.91 ^b	19.18 ^c	12.7 ^b
Luteolina	10.751 ^a	5.67 ^b	7.23 ^b	15.73 ^c
Pelargonidina	15.52 ^a	9.14 ^b	19.26 ^c	8.415 ^b

Los valores (mg/g de peso fresco) son presentados como la media aritmética de $n=3$ y cinco réplicas experimentales. NC = Cantidad menor a la Cuantificable. ^{a,b} Los valores seguidos por letras en la misma columna presentaron diferencias significativas respecto al tratamiento control por especie de microgreen evaluada ($P<0.05$).

Tabla VI. Comparación del contenido de compuestos bioactivos en microgreens de amaranto (*A. cruentus*) expuestos a *D. hansenii* y otras estrategias de protección.

Compuesto	Tratamiento	
	<i>D. hansenii</i> (1x10 ⁸ cél/mL)	Químico (CuSO ₄ ·5H ₂ O, 25 ppm)
Ác. caféico	8.59 ^a	8.64 ^a
Ác. cítrico	1.93 ^a	8.75 ^b
Matairesinol	16.74	NC
Pinoreisol	11.82 ^a	18.89 ^b
Secoisoliriciresinol	10.03 ^a	20.77 ^b
Hidroximatairsinol	10.22 ^a	5.62 ^b
Formonomentina α	20.67 ^a	15.05 ^b
Epicatecina	19.52 ^a	5.11 ^b
Catecina	19.52 ^a	5.11 ^b
Cianidina	13.5 ^a	17.97 ^b
Luteolina	15.96 ^a	13.24 ^a
Delfinidina	10.75 ^a	11.07 ^a
Pelargonidina	9.56 ^a	1.97 ^b
NL 162 hexosa	1.78 ^a	9.7 ^b
NL 324 disacárido glucopiranosil glucosa	8.52 ^a	11.11 ^a

Los valores (mg/g de peso fresco) son presentados como la media aritmética de $n=3$ y cinco réplicas experimentales. NC = Cantidad menor a la Cuantificable. ^{a,b} Los valores seguidos por letras en la misma columna presentaron diferencias significativas respecto al tratamiento control por especie de microgreen evaluada ($P<0.05$).

Tabla VII. Comparación del contenido de compuestos bioactivos en microgreens de arúgula (*E. sativa*) expuestos a *D. hansenii* y otras estrategias de protección.

Compuesto	Tratamiento		
	Control (H ₂ O _{dest})	<i>D. hansenii</i> (1x10 ⁸ cél/mL)	Químico (CuSO ₄ ·5H ₂ O, 25 ppm)
Ác. caféico	12.37 ^a	11.85 ^a	13.51 ^a
Ác. rosmarínico	11.72 ^a	NC	11.72 ^a
Ác. cítrico	9.63 ^a	6.87 ^b	15.74 ^c
Ác. salicílico/ p-hidroxibenzoico	12.15 ^a	NC	9.63 ^b
Ác. clorogénico	NC	11.27 ^a	10.92 ^a
Apigenina	10.87 ^a	9.43 ^a	11.84 ^a
Kaempferol	18.9 ^a	17.02 ^a	19.7 ^a
Quercetina	2.68 ^a	2.28 ^b	2.68 ^a
Naringina	10.91 ^a	11.13 ^a	15.23 ^b
Hesperetina	10.32 ^a	11.87 ^b	11.71 ^b
Luteolina Cianidina	11.31 ^a	11.07 ^a	10.59 ^a
Pelargonidina	10.83 ^a	2.56 ^b	10.59 ^a
Delfinidina			
NL 162 hexosa	2.87 ^a	4.56 ^c	10.36 ^b
NL 324 disacárido glucopiranosil glucosa	10.31 ^a	2.16 ^b	10.16 ^a

Los valores (mg/g de peso fresco) son presentados como la media aritmética de $n=3$ y cinco réplicas experimentales. NC = Cantidad menor a la Cuantificable. ^{a,b} Los valores seguidos por letras en la misma columna presentaron diferencias significativas respecto al tratamiento control por especie de microgreen evaluada ($P<0.05$).

Tabla VIII. Comparación del contenido de compuestos bioactivos en microgreens de col de brúselas (*B. oleracea* var. *gemmifera*) expuestos a *D. hansenii* y otras estrategias de protección.

Compuesto	Tratamiento			
	Control (H ₂ O _{dest})	<i>D. hansenii</i> (1x10 ⁸ cél/mL)	Radiación (20 W/m ²)	Químico (CuSO ₄ ·5H ₂ O, 25 ppm)
Ác. caféico	12.08 ^a	NC	20.07 ^b	NC
Ac. p-cumárico	3.69 ^a	10.47 ^b	NC	3.07 ^a
Ac. gálico	7.13 ^a	9.63 ^a	20.94 ^b	20.94 ^b
Ac. ferúlico	6.71 ^a	5.46 ^a	6.98 ^a	16.64 ^b
Ác. cítrico	2.25 ^a	5.23 ^b	11.23 ^c	NC
Matairesinol	4.39 ^a	11.13 ^b	9.11 ^b	15.28 ^c
Pinoresinol	11.07 ^a	NC	NC	10.54 ^a
Hesperetina	2.52 ^a	8.3 ^b	2.76 ^a	2.93 ^a
Genisteina α	NC	4.61 ^a	4.67 ^a	10.04 ^b
Epicatecina	11.13 ^a	3.02 ^b	9.92 ^a	11.02 ^a
Catecina	5.27 ^a	3.02 ^b	9.92 ^c	2.06 ^b
Epigallocatecina	6.87	NC	NC	NC
Galocatecina	8.71	NC	NC	NC
Cianidina	4.95 ^a	6.03 ^b	7.05 ^{b,c}	7.75 ^c
Luteolina	7.05 ^a	6.73 ^a	10.95 ^b	8.5 ^{a,b}
Pelargonidina	10.32 ^a	5.93 ^b	10.1 ^a	11.5 ^a
NL 162 hexosa	10.37	10.37	10.36	10.37
NL 324 disacárido glucopiranosil glucosa	9.85 ^a	2.14 ^b	11.51 ^a	11.52 ^a

Los valores (mg/g de peso fresco) son presentados como la media aritmética de $n=3$ y cinco réplicas experimentales. NC = Cantidad menor a la Cuantificable. ^{a,b} Los valores seguidos por letras en la misma columna presentaron diferencias significativas respecto al tratamiento control por especie de microgreen evaluada ($P<0.05$).

Tabla IX. Comparación del contenido de compuestos bioactivos en microgreens de eneldo (*A. graveolens*) expuestos a *D. hansenii* y otras estrategias de protección.

Compuesto	Tratamiento			
	Control (H ₂ O _{dest})	<i>D. hansenii</i> (1x10 ⁸ cél/mL)	Radiación (20 W/m ²)	Químico (CuSO ₄ ·5H ₂ O, 25 ppm)
Ác. caféico	NC	18.63 ^a	NC	2.57 ^b
Ac. gálico	NC	10.12 ^a	11.56 ^b	12.88 ^b
Ac. tánico	11.23 ^a	20.4 ^b	NC	NC
Ac. ferúlico	3.53 ^a	NC	NC	17.72 ^b
Ac. sinápico	NC	0.32 ^a	13.17 ^b	NC
Ác. cítrico	2.2	2.23	2.41	2.57
Ác. clorogenico	NC	10.25 ^a	NC	13.27 ^b
Resveratrol	0.26 ^a	NC	NC	19.95 ^b
Enterolactona	NC	12.47	NC	NC
Matairesinol	1.3 ^a	6.2 ^b	21.03 ^c	NC
Pinoresinol	13.11 ^a	NC	5.4 ^b	NC
Medioresinol	5.88 ^a	11.1 ^b	NC	NC
Apigenina	NC	2.36	NC	NC
Kaempferol	NC	16.21 ^a	10.04 ^b	NC
Quercetina	NC	1.99 ^a	22 ^b	11.52 ^c
Hesperetina	4.31	3.17	3.01	NC
Daidzeina α	NC	5.25 ^a	7.82 ^b	NC
Genisteina α	18.53 ^a	NC	NC	7.02 ^b
Biochanina A α	7.18 ^a	NC	11.59 ^b	NC
Epigallocatecina	NC	NC	13.46 ^a	3.88 ^b
Epicatecina galato	NC	NC	10.58 ^a	7.48 ^b
Epigallocatecina galato	NC	7.54 ^a	9.25 ^{a,b}	11.77 ^b
Cianidina	15.23 ^a	4.16 ^b	9.94 ^c	16.05 ^a
Luteolina	12.99 ^a	7.52 ^b	21.06 ^c	11.4 ^a
Delfinidina	NC	8.18 ^a	11.07 ^{a,b}	14.35 ^b
Pelargonidina	3.68 ^a	2.72 ^a	11.55 ^c	9.62 ^b
NL 162 hexosa	7.56 ^a	8.23 ^a	13.31 ^b	10.93 ^a
NL 324 disacarido glucopiranosil glucosa	2.14 ^a	2.19 ^a	10.68 ^b	2.32 ^a

Los valores (mg/g de peso fresco) son presentados como la media aritmética de $n=3$ y cinco réplicas experimentales. NC = Cantidad menor a la Cuantificable. ^{a,b} Los valores seguidos por letras en la misma columna presentaron diferencias significativas respecto al tratamiento control por especie de microgreen evaluada ($P<0.05$).

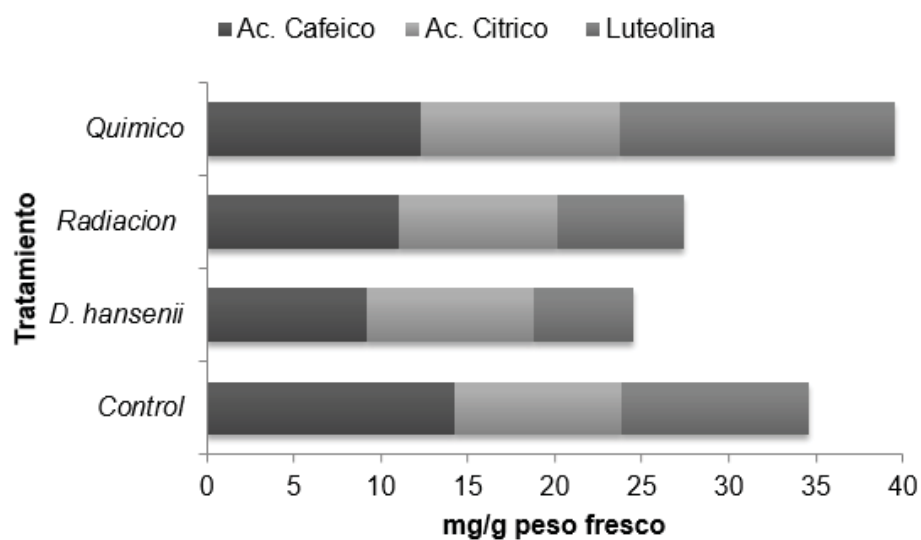


Figura 15. Evaluación de polifenoles y flavonoides más representativos en microgreen de albahaca (*O. basilicum*) expuestos a *D. hansenii*.

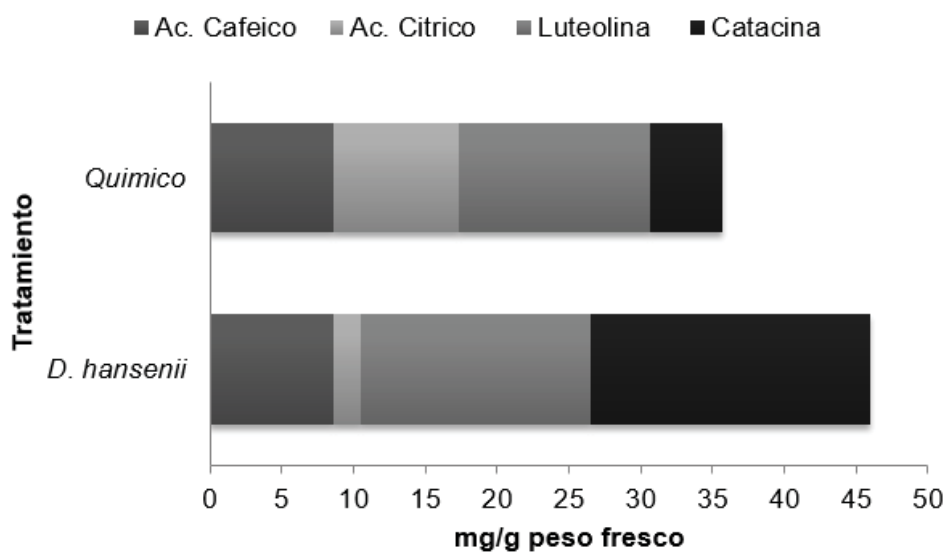


Figura 16. Evaluación de polifenoles y flavonoides más representativos en microgreen de amaranto (*A. cruentus*) expuestos a *D. hansenii*.

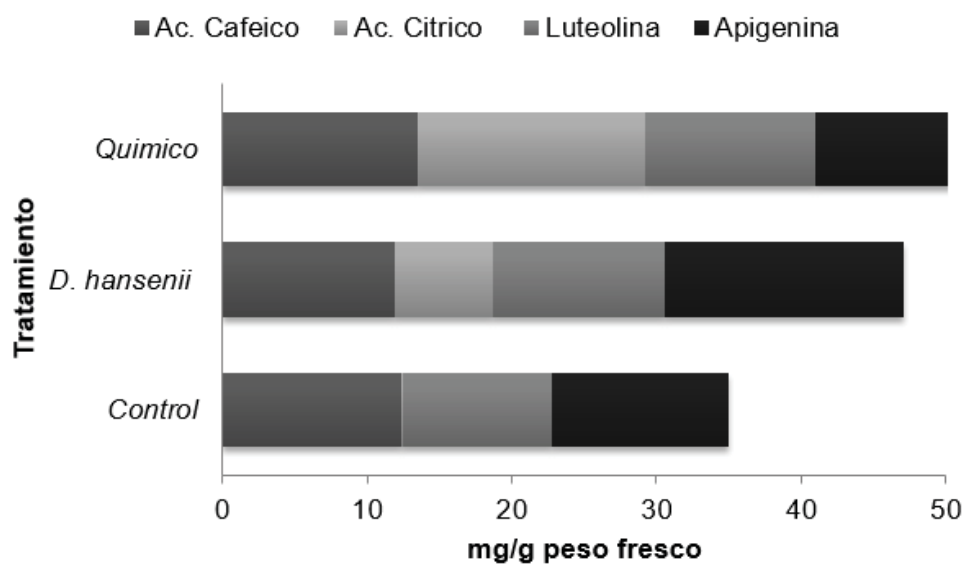


Figura 17. Evaluación de polifenoles y flavonoides más representativos en microgreen de arugula (*E. sativa*) expuestos a *D. hansenii*.

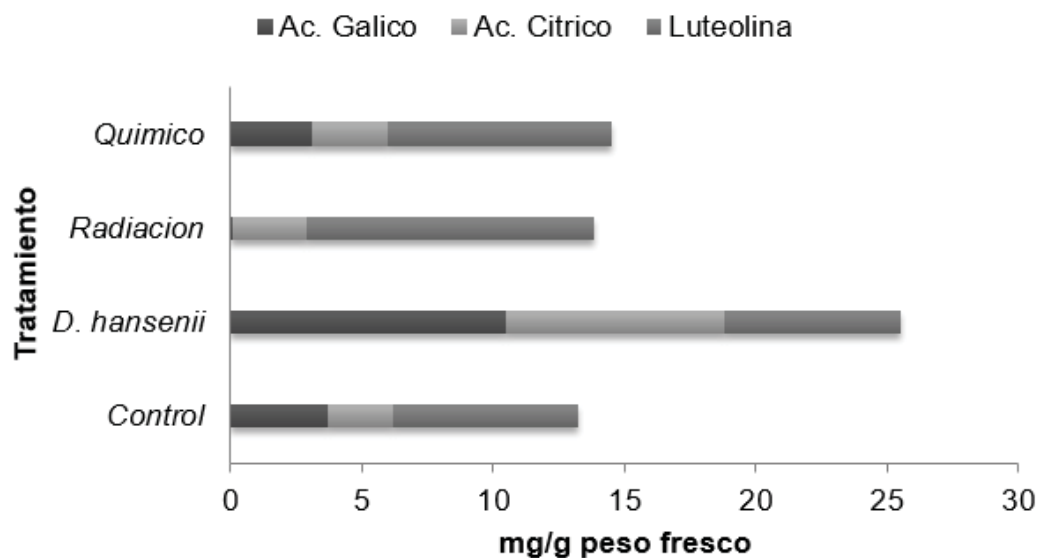


Figura 18. Evaluación de polifenoles y flavonoides más representativos en microgreen de col de brúselas (*B. oleracea* var. *gemmifera*) expuestos a *D. hansenii*.

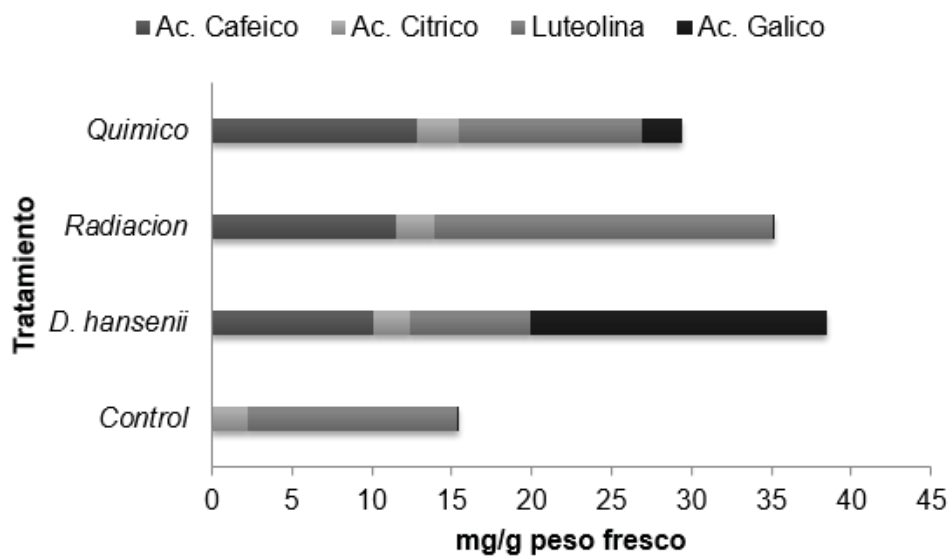


Figura 19. Evaluación de polifenoles y flavonoides más representativos en microgreen de eneldo (*A. graveolens*) expuestos a *D. hansenii*.

8.3 Microgreens como vehículo para *D. hansenii*

8.3.1 Evaluación de la influencia sobre el desarrollo

Los resultados de la evaluación de la plataforma alimentaria muestran que la suplementación de *A. cruentus* no presenta una influencia negativa sobre el desarrollo de los pollos de engorda, esto respecto a la alimentación comercial (Tabla X); mientras que la plataforma alimentaria (*A. cruentus* + *D. hansenii*) promueve ligeramente un aumento en la ganancia de peso respecto a la dieta comercial, aunque no con significancia estadística.

Tabla X. Efecto de la plataforma alimentaria sobre el crecimiento de pollos de engorda¹ a través del tiempo.

Tiempo (Semana)	Dietas		
	Control (n = 60)	<i>Amaranthus cruentus</i> (n = 60)	<i>A. cruentus</i> + <i>D. hansenii</i> (n = 60)
1	120.2 ± 8.23	118.56 ± 7.35	122.45 ± 7.83
2	437 ± 11.69	439.41 ± 13.73	436.8 ± 10.75
3	835.75 ± 11.5	841.16 ± 13.41	847.84 ± 13.9
4	2,897.3 ± 17.5	2,986.71 ± 15.97	2,997.13 ± 12.03

¹ Los resultados están reportados en gramos como medias ± SEM (n = número de aves).

8.3.2 Evaluación de la influencia histológica de la plataforma alimentaria

Las medias de la altura de las vellosidades duodenales, así como, la proporción altura de vellosidades:ancho de criptas están presentadas en la tabla XI. El ancho de cripta se vio afectado de manera positiva por las dietas evaluadas a través del tiempo ($P > 0.05$). Sin embargo, la altura de las vellosidades y la proporción altura de vellosidades:ancho de cripta se vieron disminuidas ($P < 0.05$). La dieta de *A. cruentus* no presentó cambios estadísticamente significativos sobre los parámetros histomorfológicos al final del ensayo. La dieta *A. cruentus* + *D. hansenii* aumento de manera significativa ($P < 0.05$) el ancho de cripta, respecto a la dieta comercial.

Tabla XI. Efecto de la suplementación de aditivos alimentarios sobre parámetros histomorfológicos en duodeno de pollos de engorda¹.

Parámetro	Tiempo (Días)	Dieta		
		Control (n = 10)	<i>Amaranthus cruentus</i> (n = 10)	<i>A. cruentus</i> + <i>D. hansenii</i> (n = 10)
Altura de vellosidades (µm)	5	775.92 ^a ± 58.4	634.41 ^b ± 53.73	796.8 ^a ± 107.5
	15	1,035.88 ^a ± 80	1,201.16 ^b ± 43.41	1,147.84 ^b ± 63.9
	30	1,074.2 ± 7.55	1,090.71 ± 15.97	1,085.16 ± 12.03
Ancho de cripta (µm)	5	222.36 ^a ± 9.2	344.84 ^b ± 22.76	375.85 ^b ± 11.50
	15	254.17 ± 8.18	253.56 ± 28.12	274.91 ± 12.45
	30	373.79 ^a ± 12	372.26 ^a ± 17.38	1,051.46 ^b ± 65.03
Altura : Ancho		3.48 ^a	1.83 ^b	2.11 ^b
		4.07	4.73	4.17
		2.87 ^a	2.92 ^a	1.03 ^b

^{a,b} Las medias dentro de la misma fila con diferentes súper índices presentan diferencia significativa ($P < 0.05$, ANOVA, Tukey 's test). ¹ Los resultados están reportados como la media ± SEM (n = número de aves).

8.3.3 Evaluación de la influencia de la plataforma alimentaria sobre la expresión génica

8.3.3.1 Diseño de cebadores

Se seleccionaron genes pertenecientes a *G. gallus domesticus* que representaran a los dos tipos de respuesta inmune que existen en las aves y que además hayan sido evaluados en trabajos donde se suplementaron aditivos alimentarios, entonces fueron diseñados nueve pares de cebadores (Tabla XII, Kyun-Woo *et al.*, 2015). Además, se seleccionaron genes del sistema digestivo para evaluar la existencia de alguna influencia del suministro de la plataforma alimentaria, entonces fueron diseñados cinco pares de cebadores (Tabla XIII).

Tabla XII. Diseño de cebadores para el Sistema inmune de pollos de engorda.

Gene	Secuencia (5'-3')	No. acceso GeneBank	Amplicon (pb)
<i>IL1-β</i>	TACACCCGCTCACAGTCCTT TTGTAGCCCTTGATGCCAG	NM_204524	209
<i>INF</i>	ATGTAGCTGACGGTGGA TGAGAATCCAGCGCAA	NM_205149	263
<i>IL 10</i>	CGGGAGCTGAGGGTGAA GTGAAGAAGCGGTGACAGC	NM_001004414	225
<i>IL 8</i>	GTGAGAAAGAGCATGGGAA CTTCATCTTCTCTCGGCAGT	NM_204608	225
<i>IL 6</i>	CATGCTCTCCATACCAATCG GTCTTTCCCTCCAACAATGC	NM_001277996	210
<i>IL 2</i>	AGACCCAGGAGTGCAC ATCTTGCATTCACTTCCGG	NM_204153	178
<i>IL 12</i>	AGACTCCAATGGGCAAATGA AGATTTATCAGTGCGAGCCA	NM_213571	217
<i>IL 4</i>	GAGCATCCGGATAGTGAATG GACGCATGTTGAGGAAGA	NM_001007079	182
<i>IL 13</i>	CTTGCTCTCCTCTGTCTGG GACAGCTTCCGATCCTTGA	NM_001007085	173
<i>GAPDH</i>	GAGAAACCAGCCAAGTATGATG CCAAACTCATTGTCATACCAGG	NM_204305.1	209
<i>β-Actina</i>	TATTGTGATGGACTCTGGTGAT GCTGTAGCCTCTCTCTGT	X00182.1	148
<i>18S</i>	ATAACGAACGAGACTCTGGCA CGGACATCTAAGGGCATCACA	AF173612.1	136

Tabla XIII. Diseño de cebadores para el Sistema digestivo de pollos de engorda.

Gene	Sequence (5'-3')	No. acceso GeneBank	Amplicon (pb)
<i>PNLIP</i>	CTTGTGGTTCATATGATGCTTT CCAGAGAGCTTCACAGATAC	NM_001277382.1	190
<i>AMY2A</i>	GTCATTACTAATCCGAACAGG TTGAAATAGCTCCCACATGT	NM_001001473.2	212
<i>PGA</i>	ATCCAAATTACACCACCAAAGG GTCCTTGATGATGCGATTGTAG	NM_204878.1	191
<i>NPY</i>	AAGCGTACCCCTCCAAAC TGTGCTTTCCCTCAACAAGA	NM_205473.1	170
<i>CTRC</i>	CTGAGGTGGAGAAGATCGTTG CGCAAGGGTAGTCATTCTCC	NM_001277917.1	162

8.3.3.2 Temperatura de alineamiento de cebadores

El diseño de cebadores nos otorga una temperatura de alineamiento teórica, sin embargo es necesario determinar la real. Para este experimento se evaluaron los genes *18S*, *GAPDH* (Fig. 20, temperatura óptima para bolsa de Fabricio es 60°C y para íleon es 58°C) y β -Actina en todos los tejidos muestreados (bolsa de Fabricio, íleon, estómago, yeyuno, bazo, timo y duodeno), mientras que los genes para IL1 β , 2, 4, 6, 8, 10, 12, 13 e IFN, se evaluaron en todos los tejidos excepto en estómago; en el caso de los cebadores digestivos *CTRC*, *PGA*, *PNLIP*, *AMY2A* y *NPY*, se evaluaron en duodeno, yeyuno, íleon y estómago. Lo anterior con la finalidad de diseñar un programa óptimo para la evaluación de la expresión génica mediante la técnica de qPCR.

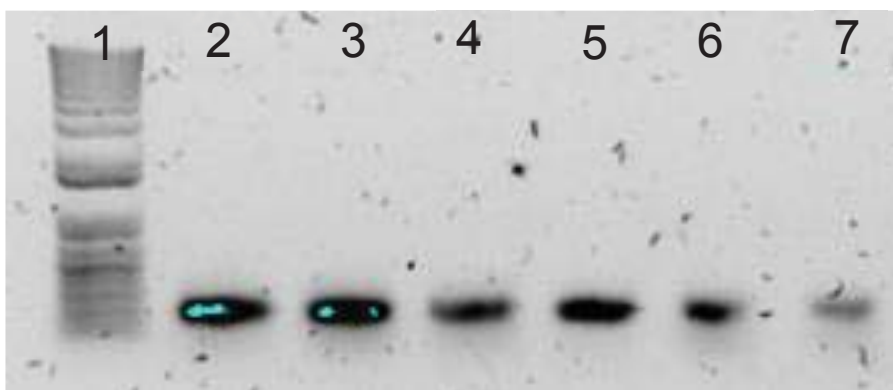


Figura 20. Prueba de temperatura de alineamiento de cebadores para RT-qPCR en gel de agarosa al 1.5%. Lineas: 1, marcador de peso molecular, kbplus®; 2,3 y 4, prueba de juego de cebadores para el gen *GAPDH* en tejido de duodeno a 58°C, 60°C y 62°C, respectivamente; 5, 6 y 7 prueba de juego de cebadores para el gen *IL1β* en tejido de duodeno a 58°C, 60°C y 62°C, respectivamente.

8.3.3.3 Expresión relativa de genes

En la evaluación de microgreens como plataforma alimentaria fue seleccionado *A. cruentus* para este fin. Para lograrlo se decidió evaluar los cambios en la expresión relativa dos genes, uno del sistema inmune (*IL-8*) y uno del sistema digestivo (*AMY2A*). La adición solamente del microgreen a la dieta de los pollos de engorda mostró un aumento en la expresión del gen relacionado con el sistema digestivo a partir del día 7 de administración hasta ocho veces mayor y una estabilización del mismo al término del bioensayo al día 30 (Fig. 21); mientras que en esta misma dieta el gen relacionado con el sistema inmune se mantuvo sin cambios significativos a partir del día 7 de la adición del microgreen a la dieta (Fig. 21). En cambio cuando se adicionó a la dieta el microgreen tratado con *D. hansenii* se observa los días cero y siete los mismos niveles de expresión que la dieta anterior, sin embargo, para el día 15 la expresión de *IL-8* ha aumentado tres veces (Fig. 21), para el día 30 ha aumentado 5 veces (Fig. 21), esto con respecto al gen relacionado con el sistema inmune a esos tiempo y normalizado por tiempo y dieta control ($2^{-\Delta\Delta Cq}$).

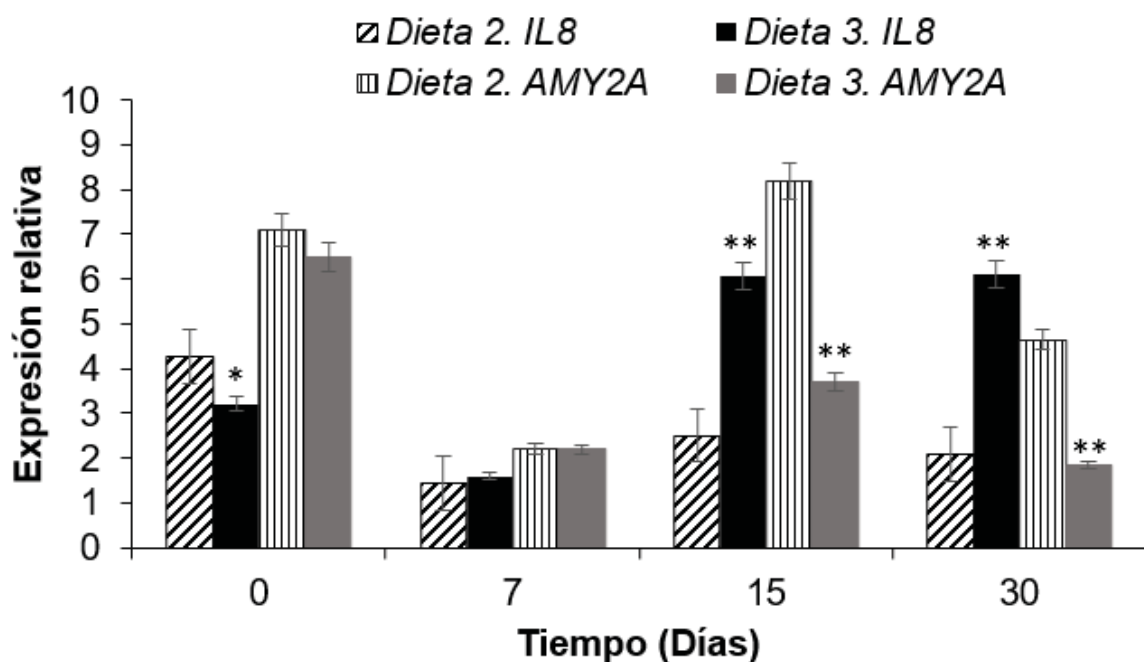


Figura 21. Evaluación de la plataforma alimentaria (*D. hansenii* + *A. cruentus*) en estadio de microgreen como plataforma alimentaria. Se muestra la evaluación de un gen relacionado con el sistema inmune (*IL-8*) y un gen relacionado con el sistema digestivo (*AMY2A*) en tejido de duodeno. Dieta 2: *A. cruentus*; Dieta 3: *A. cruentus* mas *D. hansenii*. Los valores son la media con desviación estándar de tres réplicas por tratamiento, se encuentran normalizados por un gen de referencia (*GAPDH*).^{a,b} Prueba de Mann-Whitney.

9. DISCUSIÓN

9.1 Control biológico

Para nuestro conocimiento, este es el primer reporte sobre el uso de una levadura marina como agente de control biológico bacteriano y fúngico en cinco especies de plantas como microgreens. *D. hansenii* (DhhBCS003) fue aislada de las profundidades del Golfo de California pero es un género cosmopolita. Esta especie fue elegida porque ha sido usada contra hongos patogénicos en muchos alimentos y no contra patógenos bacterianos (Liu y Tsao, 2009; Andrade *et al.*, 2014; Núñez *et al.*, 2015); la particular cepa *DhhBCS003* fue seleccionada porque ha inhibido el crecimiento fúngico patogénico en granos de maíz y en las vainas de frijol ejotero, mostrando como potencial mecanismo de acción la competencia por espacio y nutrientes (Martínez-Camacho, 2014; Medina *et al.*, 2016).

Primero, la cepa de *D. hansenii* (DhhBCS003) fue probada en un ensayo de inhibición en la germinación de esporas y densidad celular (Fig. 2) donde mostró inhibición significativa contra dos enterobacterias patógenas para humanos *E. coli* O157:H7 (99 %), *S. typhimurium* (97.7 %) y *A. flavus* (80 %) una cepa fúngica patogénica para plantas y humanos, sin embargo, la población de la levadura se mantuvo constante a lo largo del ensayo. Las levaduras han sido ampliamente utilizadas como antagonistas y presentan tasas de inhibición fúngica similares (Fiori *et al.*, 2014; Zhu *et al.*, 2015). En el caso de la inhibición fúngica causada por la presencia de *D. hansenii* ha sido ampliamente sugerido que el mecanismo que promueve el control biológico es la competencia por espacio y nutrientes sin embargo aún no se ha esclarecido. Por otro lado, existen pocos trabajos donde se utilicen levaduras para inhibir bacterias pero Leverentz *et al.* (2006) probaron 17 levaduras antagonistas contra *S. enterica* encontrando dos cepas con tasas de inhibición similar a *D. hansenii* (Fig. 2) sin embargo, debido a lo poco estudiado de este fenómeno, el mecanismo aún no se ha esclarecido.

El ensayo *in vivo* en el cual se aplicó *D. hansenii* como tratamiento de la semilla de cada especie de microgreen tuvo como objetivo visualizar el efecto del agente sobre la germinación de la misma, así como, sobre el desarrollo de la planta respecto a la influencia sobre el peso fresco. Nuestros resultados demostraron que una aplicación de *D. hansenii* promueve la germinación en semillas de *O. basilicum*, *E. sativa* y *B. oleracea* (Fig. 4). Es bien sabido que la inoculación de plantas con microorganismos benéficos provoca, entre muchas otras características positivas, la reducción de infección por patógenos sin embargo estos trabajos se han centrado en el uso de bacterias como agentes promotores de crecimiento y agentes de control biológico contra bacterias (Vessey, 2003) dejando para este último objetivo de lado el uso de levaduras (Nassar *et al.*, 2005). Amprayn *et al.* (2012) reportaron que la inoculación de arroz con la levadura *Candida tropicalis* aumentaba el peso seco, germinación y elongación de raíces, y que esto podría estar relacionado con una sobreexpresión de la enzima ACC desaminasa, la cual promueve la síntesis de etileno y la elongación de las raíces. Este fenómeno de aumento de biomasa coincide con nuestros resultados (Fig. 3) donde hubo un aumento positivo de materia fresca cuando se aplicó el tratamiento con *D. hansenii* así como, un aumento en la germinación de al menos tres especies de microgreens.

Con la finalidad de evaluar si el tratamiento con *D. hansenii* podría mitigar la presencia de patógenos sobre microgreens, fueron desarrollados múltiples ensayos *in vivo* contra tres patógenos (*S. typhimurium*, *E. coli* O157:H7 y *A. flavus*), en búsqueda de una estrategia para aplicar el tratamiento de control biológico de manera funcional sobre las cinco especies de plantas. En cada ensayo se observó que cada patógeno presenta diferentes estrategias de colonización sobre la misma planta pero en presencia de *D. hansenii* a diferentes dosis (Fig. 5, 6 y 7).

El primer ensayo que se realizó fue probando una aplicación del agente un día después de la germinación en presencia del patógeno, todo al mismo tiempo. En

este caso se observaron tres comportamientos diferentes (Fig. 5): 1) sobre *O. basilicum* y *A. cruentus* la población patogénica fue disminuyendo hasta el día cinco; 2) sobre *E. sativa* la población patogénica disminuyó a través del tiempo y de manera significativa; por último, 3) sobre *B. oleracea* y *A. graveolens*, la población patogénica tuvo un comportamiento en decadencia lento e irregular.

En el segundo ensayo, se aplicó el tratamiento con *D. hansenii* en dos dosis, una fue el tratamiento de la semilla y el siguiente tres días después de la germinación; en este caso se observaron cuatro comportamientos patogénicos (Fig. 6): 1) sobre *O. basilicum* la población patogénica fue disminuyendo de manera constante y lenta a través del tiempo; 2) sobre *A. cruentus* la población patogénica fue disminuyendo hasta el día, a partir de ahí el crecimiento se mantuvo constante, por lo que se recomienda aplicar una segunda dosis para este microgreen; 3) sobre *E. sativa* y *B. oleracea* la población patogénica disminuyó de manera rápida y constante a través del tiempo aunque no de manera significativa; por último, 4) Sobre *A. graveolens* los patógenos tuvieron un comportamiento de disminución rápido y regular.

El tercer ensayo fue la aplicación de *D. hansenii* en etapa de semilla, y al día tres después de la germinación, mientras que los patógenos se inocularon al día cinco después de la germinación, de esta manera se simuló una situación real de contaminación por manejo (Fig. 7). En este caso se observaron cuatro comportamientos patogénicos: 1) sobre *O. basilicum* la población patogénica fue disminuyendo lentamente mientras que la población del agente tuvo ligeros incrementos, manteniéndose constante; 2) sobre *A. cruentus* la población patogénica y el agente tuvieron comportamientos inversos, mientras que la primera disminuía, el agente aumentaba su población; 3) sobre *E. sativa* y *A. graveolens* la población patogénica disminuyó de manera lenta e irregular, este mismo sucedió para el agente; por último, 4) sobre *B. oleracea* la población patogénica presentó una disminución irregular mientras que el comportamiento de la levadura aumentó de manera logarítmica a través del tiempo.

El objetivo del cuarto bioensayo fue evaluar el comportamiento tanto patogénico como de *D. hansenii* aplicando dosis cada 48 horas de este último, por especie de microgreen. Por esta razón, se seleccionaron especies de microgreen (*A. cruentus* y *A. graveolens*), en las cuales la levadura tuvo comportamientos inversos de aumento y disminución ante los patógenos. En este caso pudimos observar que la población de patógenos sobre *A. cruentus* disminuyó de manera significativa mientras que la población del agente se mantuvo constante, hasta el día siete, en el cual se presentó un punto de inflexión a partir del cual aumentó la población de *D. hansenii* (Fig. 8 A); sobre *A. graveolens* la población patogénica disminuyó de manera significativa mientras que la población de la levadura se mantuvo constante, hasta el día siete, en el cual se presentó un punto de inflexión inverso, lo que significa que empezó a disminuir la población del agente (Fig. 8 B).

En un proceso de control biológico se encuentran relacionados muchos factores. El sistema (*D. hansenii* – Microgreen) presentó diferentes maneras de actuar, esto dependiendo del patógeno a atacar y del microgreen colonizado. Todos los resultados permiten hipotetizar que, primeramente, es probable que la habilidad para mitigar el crecimiento fúngico de *A. flavus* por *D. hansenii* una vez más está relacionada con la competencia por espacio y nutrientes, así como, la producción de compuestos volátiles liberados probablemente por la unión a sitios específicos, incluyendo tanto al patógeno como al hospedero (Wisniewski *et al.*, 2007; Hernández-Montiel *et al.*, 2010; Medina-Córdova *et al.*, 2016), en este proceso el microgreen no estaría ejerciendo ninguna estrategia para mitigar el patógeno, solo estaría actuando como base o soporte supliendo nutrientes a la levadura. Esta hipótesis se encuentra sustentada por los resultados donde se observó que al aumentar el número de dosis de *D. hansenii* la inhibición fúngica no aumentó de manera significativa (Figs. 5 – 8).

Segundo, cuando el patógeno es bacteriano, la presencia de *D. hansenii* y los metabolitos liberados ya no es suficiente para inhibir el crecimiento bacteriano, entonces la levadura estimula en la planta la producción de metabolitos activos

inducidos directamente por la interacción directa con el tejido, atacando o mitigando el crecimiento y colonización bacterianos (Droby *et al.*, 2002), esto se encuentra sustentado por los ensayos donde se observa que aumentar la dosis de levadura aumenta la inhibición del crecimiento bacteriano. Esta interacción podría ser más clara si relacionamos el aumento del peso fresco con este fenómeno, por lo menos en cuatro especies de microgreen (Fig. 3).

Los resultados muestran que la interacción anteriormente mencionada es especie-especifica dependiendo del microgreen colonizado. Como se pudo observar, *D. hansenii* coloniza hojas y tallos *O. basilicum* teniendo una distribución regular (Fig. 9 A y A1); para *A. cruentus* la colonización de la levadura marina se da preferentemente sobre los tallos (Fig. 9 B y B1); *B. oleracea* fue colonizada por la levadura formando grandes agregados celulares sobre hojas y tallos (Fig. 10) aunque *D. hansenii* no funciona como agente de control biológico en esta especie de microgreen (Fig. 10); *D. hansenii* presento un comportamiento similar colonizando a *E. sativa* y *A. graveolens*, teniendo una amplia distribución sobre hojas y tallos, así como, una liberación de una matriz extracelular tipo biopelícula (Fig. 9 B1 y C1). Este comportamiento especie-especifico de las levadura fue observado por Giobbe *et al.* (2007), ellos usaron a la levadura *Pichia fermentans* como agente de control biológico sobre manzanas mientras que para duraznos resulto patógena, teniendo diferentes formas de colonización ambos frutos. Por estas cuestiones de seguridad e inocuidad alimentaria que involucran la formación de biopelículas sería interesante evaluar la producción de enzimas líticas, otros compuestos anti patógenos en las biopelículas formadas sobre los microgreens, así como, la búsqueda de genes relacionados con adhesión (*HWP1* y *ALS*) que en la levadura *C. albicans* se ha demostrado que juegan un papel importante en el reconocimiento del hospedero, adhesión, invasión y formación de biopelículas (Biswas *et al.*, 2007). Además las colonizaciones por *D. hansenii* difieren de profundidad de acuerdo a la superficie colonizada (Fig. 11) según los resultados arrojados por LSCM, este fenómeno corresponde a lo observado nuevamente por

Giobbe *et al.* (2007). Además los resultados de MER mostraron que esta colonización presenta una liberación de matriz extracelular de polisacáridos de igual forma dependiente de superficie colonizada (Fig. 12).

Todos los resultados muestran que la eficiencia de la aplicación de *D. hansenii* en las especies de microgreen están relacionadas con dos factores: número de dosis y tipo de superficie. En relación al número de dosis contra los tres patógenos (Fig. 13 líneas 1-3) se recomienda el tratamiento de la semilla y una dosis para *O. basilicum* contra los dos tipos de patógenos; en *A. cruentus* la estrategia de protección recomendada es el uso de múltiples dosis después de la germinación; mientras que *E. sativa* y *A. graveolens* el tratamiento de la semilla sería efectivo; por el contrario no se recomienda el uso de *D. hansenii* como agente de control biológico sobre microgreens de *B. oleracea* de acuerdo a los resultados de colonización e inhibición patogénica (Figs. 5 – 8).

9.2 Contenido nutricional y compuestos bioactivos

En el contexto de los numerosos brotes de enfermedades relacionadas con los alimentos, que en años recientes han involucrado a los vegetales frescos, muchas agencias de seguridad alimentaria en todo el mundo han permitido el uso de diferentes tratamientos para mitigar los brotes (FDA, 2008). Entre estos tratamientos se han desarrollado múltiples ensayos para probar la eficiencia de lavados con cloro, radiación y biocontrol (Niemira, 2007; Lester *et al.*, 2010). Una combinación apropiada de estos tratamientos puede mejorar la descontaminación de vegetales frescos minimizando la posibilidad de contaminación cruzada (Niemira, 2007). A pesar que la FDA considera que la radiación en los alimentos, así como, los lavados con cloro son una tecnología segura, la preocupación radica en la posibilidad de perder la forma activa de los compuestos bioactivos y fitonutrientes. La disminución de nutrientes y eficiencia del tratamientos está relacionada con la superficie de los vegetales y el tipo de compuestos bioactivos evaluados (Lester *et al.*, 2010). Los resultados mostraron (Fig. 14) que los niveles

de ácido ascórbico fueron estadísticamente en aumento por el uso de *D. hansenii* como tratamientos en *O. basilicum* y *A. graveolens*; mientras que la aplicación de un tratamiento químico mejoró los niveles de ácido ascórbico en *A. cruentus* y *B. oleracea*; finalmente todos los tratamientos afectaron de manera altamente significativa los niveles de ácido ascórbico de *E. sativa*. El contenido de vitamina B₅ (Fig.14) muestra que el tratamiento con *D. hansenii* disminuye los niveles de esta vitamina sobre *A. cruentus*; mientras que el tratamiento químico mostró tener alto impacto estadístico sobre *O. basilicum*, *B. oleracea* y *A. graveolens*; finalmente el tratamiento con radiación UV presentó efectos negativos sobre *B. oleracea* y *A. graveolens*. Diferentes niveles de vitaminas entre los tratamientos y especies podría estar relacionado con los mecanismos de la planta para mitigar el estrés oxidativo (Kutter *et al.*, 2005; Niemira, 2007). Los vegetales son fuente importante de ácido ascórbico y complejo B provenientes de la dieta (Bergquist *et al.*, 2006; Xiao *et al.*, 2012). La importancia nutricional de los compuestos bioactivos ha tomado grandes dimensiones desde el reconocimiento de su papel en la terapia contra arteroesclerosis, enfermedades respiratorias, enfermedades cardíacas, cáncer, entre otras (Forbes-Hernández *et al.*, 2014).

Se evaluó el contenido nutricional de proteína, fibra, humedad y energía de las cinco especies de microgreens bajo el tratamiento con *D. hansenii*. Los resultados mostraron (Tabla IV) que el agente de control biológico puede aumentar de manera altamente significativa el contenido proteico de al menos cuatro de las especies evaluadas, además la presencia de la levadura provoca diversos efectos en el contenido de humedad, fibra y energía. El contenido proteico de las especies de microgreen presenta un perfil balanceado de aminoácidos, por esta razón es importante que el tratamiento no tenga un impacto negativo sobre este tema (Bejarano-Luján y Netto, 2010). Por esta razón es importante encontrar un método eficiente que disminuya o inhiba el crecimiento patogénico sin impactar de manera significativa el contenido de compuestos bioactivos.

Múltiples estudios soportan la existencia de una correlación entre una dieta rica en frutas y vegetales y la disminución en la incidencia de enfermedades relacionadas con daño oxidativo (Wang *et al.*, 2011). Este efecto se atribuye generalmente al contenido de β -carotenos, tocoferoles y ácido ascórbico de las frutas y /o verduras, sin embargo estos presentan un efecto limitado de inhibición de radicales libres. Entonces esto indica que existe una gran cantidad de antioxidantes no vitamínicos como compuestos fenólicos que contribuyen de manera sustancial en la inhibición por daño oxidativo (Harasym *et al.*, 2014). Nuestros resultados indican (Tablas V – IX) que existe una gran cantidad de compuestos fenólicos en las cinco especies de microgreen evaluadas y que esté contenido se ve modulado en mayor o menor medida por la presencia de *D. hansenii*, sin embargo no afecta de manera significativa en comparación con el tratamiento químico o de radiación.

Existe un creciente interés por determinar el contenido de compuestos fenólicos en componentes importantes de la dieta, en este caso, los microgreens. El ácido cafeico es un importante y representativo compuesto fenólico en las plantas. Se ha observado que promueve efectos interesantes sobre la salud humana, como, la prevención de enfermedades cardiovasculares (Prince *et al.*, 2012). En el caso de las especies de plantas evaluadas en este estudio, solamente se observó un aumento significativo en el nivel de ácido cafeico en microgreens de eneldo tratados con *D. hansenii*, dicha modulación no fue posible en microgreens de la misma planta sometidos a tratamiento químico o de radiación, estos podrían estar evitando directamente la generación de hidroxilaciones en la ruta metabólica de los fenilpropanoides, donde se sintetiza el ácido *p*-cumárico, precursor del ácido cafeico. Esta función antioxidante no sólo podría estar implicada en la mitigación de los efectos de radicales libres intrínsecos del hospedero sino además tener un efecto antibacteriano y/o antifúngico, tal y como lo probaron Lima *et al.* (2016), donde determinaron alta actividad antibacteriana del ácido cafeico, lo cual se ajusta a los resultados obtenidos en el objetivo 1, dónde se observa un efecto antibacteriano sinérgico entre el microgreen y la levadura marina aplicada. El

contenido de ácido gálico también mostró un aumento significativo con la aplicación de *D. hansenii* sobre microgreen de eneldo. Este compuesto se ha utilizado como protector de diversos compuestos antioxidantes, esto debido al efecto sinérgico encontrado (Roidoung *et al.*, 2016); además, se ha demostrado que ejerce un efecto positivo en la salud del consumidor final ya que participa activamente en el metabolismo del hierro (Corazzari *et al.*, 2016). Por otro lado, la aplicación del ácido gálico en conjunto con un método de radiación presenta un efecto en la mitigación de colonización bacteriana (Cossu *et al.*, 2016).

Además del contenido de polifenoles, el grupo de los flavonoides también ha generado gran interés en la comunidad científica. La luteolina es un flavonoide de plantas y catalogado como compuesto bioactivo debido a que presenta alta actividad citoprotectora y anticancerígena (Xiao-Shen *et al.*, 2014; Jeong *et al.*, 2016). La aplicación de *D. hansenii* moduló de manera negativa el contenido de luteolina en las cinco especies de microgreen evaluadas (Figs. 18-22), mientras que el tratamiento de radiación lo moduló de manera positiva. Esto podría estar relacionado con la estructura de los flavonoides, ya que la aplicación de radiación podría estar alterando los niveles energéticos de los dobles enlaces presentes en la estructura base de esta categoría de compuestos (Martínez-Luscher *et al.*, 2014), mientras que la levadura marina no tendría acceso a estos niveles de excitación energética.

De manera general diversos estudios demuestran que los polifenoles no sólo presentan actividad antioxidante en el consumidor final, sino que evitan colonizaciones bacterianas, sin embargo, no se ha determinado el mecanismo utilizado, mientras que los flavonoides presentan actividad citoprotectora. Razón por la cual fue importante la determinación del contenido de estos grupos de compuestos en presencia de *D. hansenii*, obteniéndose que en la mayoría de los microgreens evaluados no exista modulación negativa.

9.3 Plataforma alimentaria. Evaluación en pollos de engorda

Los aditivos alimentarios fitogénicos están definidos como plantas o compuestos derivados de plantas que incorporados en la dieta pueden mejorar la productividad de los animales de granja a través de la mejora de las propiedades del alimento, aumento de la producción del animal, así como, mejorar la calidad del alimento derivado de estos animales (Windisch *et al.*, 2008). Esta clase de aditivos alimentarios recientemente ha ganado gran interés, específicamente su uso en la producción de aves de corral (Alcaine *et al.*, 2016). Además, la suplementación de inmunoestimulantes a través de la dieta es una estrategia para mejorar la función inmune, reducir el uso de antibióticos, minimizar los residuos de fármacos y aumentar la resistencia a enfermedades en aves de corral y ganado (Lamont, 1998). Muchos estudios han evaluado el uso de aditivos alimentarios fitogénicos en pollos de engorda, encontrando resultados muy variables sobre la ganancia de peso (Denli *et al.*, 2005; Hong *et al.*, 2012; Banerjee *et al.*, 2013). La razón asociada a esto podría ser que los productos fitogénicos podrían incrementar la altura de las vellosidades del yeyuno, mientras que disminuyen la profundidad de las criptas en los pollos (Amad *et al.*, 2011). En el presente estudio, fue utilizado *A. cruentus* en etapa de microgreen adicionado con células vivas de *D. hansenii* esto como aditivo alimentario en pollos de engorda, los resultados muestran que el peso relativo de los individuos evaluados no se vio afectado por el suministro del aditivo alimentario (Tabla X). Sin embargo, el suministro de *D. hansenii* disminuyó de manera significativa la proporción altura de vellosidades:Profundidad de criptas, respecto a la dieta control (Tabla XI). Esto significa que la función de absorción del yeyuno fue más alta comparada con el tratamiento control. El intestino presenta altas tasas de recambio celular, puede cambiar su área superficial alargándose y/o por el aumento o disminución de la altura de las microvellosidades, cuando un inmunoestimulante es suministrado en la dieta (Peng *et al.*, 2016). Existen muchos factores que pueden contribuir a resultados inconsistentes en la ganancia de peso en los pollos de engorda cuando se suministra un aditivo fitogénico, algunos

pueden ser: parte suministrada de la planta, estación de cultivo, método de aplicación, origen geográfico, proceso de producción, y edad, condición ambiental, entre muchos otros.

Parte importante de la evaluación de una plataforma alimentaria es la determinación de influencia benéfica en el sistema inmune y/o digestivo del consumidor final (Wijk *et al.*, 2005). Se buscó evaluar ambos sistemas midiendo la expresión relativa de genes asociados mediante la técnica de RT-qPCR, mediante el diseño de 9 pares de cebadores para Sistema Inmune (SI) y 5 para el centro catalítico de enzimas relacionadas con el Sistema Digestivo (SD), (Tablas XII y XIII). De todos los pares de cebadores diseñados se evaluó temperatura de alineamiento (Fig. 20), esto para asegurar una correcta utilización de la técnica. Finalmente se seleccionaron dos genes a evaluar: *IL – 8* y *AMY2A*.

El gen *AMY2A*, codifica para una enzima digestiva de alta liberación en duodeno, la amilasa. Las enzimas α -amilasas se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza y han sido estudiadas en diversos organismos. Las amilasas de *G. gallus domesticus* se han estudiado desde un punto de vista bioquímico funcional (Benkel *et al.*, 1997). Dichas enzimas son liberadas por el páncreas en el intestino delgado, específicamente en duodeno y yeyuno, su función implica la hidrólisis del almidón procedente de la dieta, esto mediante la hidrólisis de los enlaces α -(1,4) glucosídicos de la amilosa y amilopectina (Zaefarian *et al.*, 2015). La glucosa producida en última instancia es absorbida por el intestino delgado y transportada a través de la pared intestinal. Según lo reportado por Zaefarian *et al.* (2015) en pollos de engorda, alta actividad de este grupo de enzimas depende de diversos factores que van desde un adecuado procesamiento del alimento, tamaño, dureza, incluso la genética del organismo modelo en cuestión. En nuestro caso se esperaba alta actividad de amilasa dado que el aditivo alimentario no presenta alta dureza ni algún tratamiento posterior, y los organismos se encontraban adaptados por generaciones a dietas comerciales. Los análisis de expresión mostraron que el suministro de solamente *A. cruentus* en estadio de microgreen estimula la

expresión de *AMY2A* (Fig. 21), esto podría deberse a que esta planta posee una peculiaridad, el empaquetamiento del almidón es el más fino que se haya estudiado, es decir, se ve favorecida su digestión.

Como se mencionó anteriormente, no sólo la fácil digestión de una plataforma alimentaria es importante en el consumidor final, también lo es, que esta plataforma logre estimular el sistema inmune. Por esta razón se evaluó la expresión relativa del gen *IL - 8*, relacionado con el sistema inmune en pollos de engorda. La interleucina 8 es una quimiocina producida por macrófagos entre otro tipo de células endoteliales. Es conocida como factor quimiotáctico para neutrófilos y presenta dos funciones principales en la célula blanco, primeramente logra que los neutrófilos aunque también otros granulocitos, migren hacia el sitio de infección, además *IL - 8* induce la fagocitosis. Además puede ser secretada por cualquier célula que presente receptores tipo toll, los cuales se encuentran implicados en la respuesta inmune innata (Petering *et al.*, 1999). Generalmente, la expresión de *IL - 8* se ve inducida en presencia de bacterias como *S. typhimurium*, al ser esta quimiocina de respuesta proinflamatoria (Shaughnessy *et al.*, 2009). Nuestros resultados muestran que aunque no se presentaron signos patológicos o daño histomorfológico, si se vio inducida la expresión de esta quimiocina proinflamatoria (Fig. 22) a partir del día 7 de administración de la dieta 3, es decir, cuando se adicionó a la dieta no sólo el microgreen sino también la levadura *D. hansenii*. Este tipo de patrones de expresión es común cuando se adiciona a la dieta organismos probióticos o compuestos inmunoestimulantes (Kuonyoung *et al.*, 2015).

10. CONCLUSIONES

El tratamiento con *D. hansenii* contra *A. flavus*, *S. typhimurium* y *E. coli* O157:H7 resultó eficiente en cuatro especies de plantas en estadio de microgreen (*O. basilicum*, *A. cruentus*, *E. sativa* y *A. graveolens*). Basándonos en la estrategia de aplicación, así como, en microscopía electrónica de barrido, reflexión y confocal, el proceso de biocontrol desarrollado por *D. hansenii* presenta diferentes pasos para inhibir el crecimiento patógeno, dependiendo del tipo de patógeno (bacteriano o fúngico) y de la formación de una estructura tipo biopelícula con diferente profundidad de acuerdo a la superficie colonizada.

El agente de biocontrol *D. hansenii* ejerce influencia positiva sobre el contenido proteico, de fibra y energía en por lo menos cuatro especies de plantas evaluadas en estadio de microgreen; mientras que los niveles de vitamina C y B₅ fueron afectados en diferentes estratos por el agente de control, esto podría estar relacionado con la respuesta a estrés oxidativo de cada especie de microgreen. El contenido de flavonoides y compuestos fenólicos evaluados se vio influenciado de manera positiva por la presencia de *D. hansenii* sobre la superficie del microgreen a tratar.

La administración de la plataforma alimentaria (Microgreen más *D. hansenii*) como aditivo alimentario no presenta efectos negativos sobre el desarrollo o ganancia de peso del pollo de engorda (*G. gallus domesticus*), así como, ningún daño histomorfológico, mientras que, la expresión relativa de genes relacionados con el sistema inmune nos indica una modulación positiva de este sistema en el consumidor final. ñ

11. LITERATURA CITADA

- Alcaine, S., L. Molla, S. Nugen, Kruse H. 2016. Results of a pilot antibiotic resistance survey of Albanian poultry farms. *J of Global Antimicrobial Resist.* 4:60-64.
- Alzamora, S., M. Salvatori, D. Tapia, M. S. López-Malo, A. Welti-Chanes, J., & Fito. 2005. Novel functional foods from vegetable matrices impregnated with biologically active compounds. *J of Food Eng.* 67:205–214.
- Amad, A.A., K. Manner, K.R. Wendler, K. Neumann, J. Zentek. 2011. Effects of a phytogetic feed additive on growth performance and ileal nutrient digestibility in broiler chickens. *Poult. Sci.* 90:2811–2816.
- Amprayn, K., M. Rose, M. Kecskes, N. Pereg, H. Nguyen, I. Kennedy. 2012. Plant growth promoting characteristics of soil yeast (*Candida tropicalis* HY) and its effectiveness for promoting rice growth. *Applied soil ecol.* 61:295-299.
- Andrade, M., A. Rodríguez, J. Córdoba, L. Jespersen. 2014. Inhibition of Ochratoxigenic moulds by *Debaryomyces hansenii* strains for biopreservation of dry-cured meat products. *Int. J. Microbiol.* 170:70-77.
- Andrea, C., E. Duygu, Q. Wang, W. Ann Peer, N. Nitin, R. Tikekar. 2016. Antimicrobial effect of synergistic interaction between UV-A light and gallic acid against *Escherichia coli* O157:H7 in fresh produce wash water and biofilm. *Inn Food Sci and Emerging Technol.* 37:44-52.
- Andreas, U., N. Harm, R. Xiangyu, B. Ton, G. René, A.M. Jack. Leunissen: Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3 *Nucleic Acids Research* 2007 35: W71-W74.
- Ashraf, M., S. Tadashi. 2014. Isolation and molecular characterization of *Salmonella enterica*, *Escherichia coli* O157:H7 and *Shigella* spp. from meat and dairy products in Egypt. *Int J of Food Microbiol.* 168-169, 57-62.
- Avwioro G. 2011. Histochemical uses of haematoxylin – A review. *JPCS*, 1:24-34.
- Banerjee, S., S.K. Mukhopadhyay, S. Ganguly. 2013. Phytogetic growth promoter as replacers for antibiotic growth promoter in poultry birds. *J. Anim. Genet. Res.* 1:6–7.
- Barkai, R. 2001. Postharvest diseases of fruits and vegetables (Development and Control). Elsevier. Primera edicion. Amsterdam, Netherlands. pp 3.

- Bautista, S., A. Hernández, M. Velázquez. 2007. Uso de microorganismos antagonistas en el control de enfermedades postcosecha de frutos. *Rev Mex Fitopatol.* 25:66-74.
- Bautista, S. 2006. El control biológico en la reducción de enfermedades poscosecha en productos hortofrutícolas: uso de microorganismos antagonistas. *Rev Ibero Tecnol Poscosecha.* 8:1-6.
- Becker, P., M. Sganzerla, A. Jacques, M. Barcia, R. Zambiasi. 2015. Carotenoids, tocopherols and ascorbic acid content in yellow passion fruit (*Passiflora edulis*) grown under different cultivation systems. *LWT Food Sci and Technol.* 64: 259-263.
- Bejarano-Luján, D., F. Netto. 2010. Effect of alternative processes on the yield and physicochemical characterization of protein concentrates from *Amaranthus cruentus*. *Food Sci and Technol.* 43:736-743.
- Benkel, B., T. Nguyen, N. Ahluwalia, K. Benkel, D. Hickey. 1997. Cloning and expression of a chicken α -amylase gene. *Gene.* 192:261-270
- Bergquist, S., U. Gertsson, M. Olsson. 2006. Influence of growth stage and postharvest storage on ascorbic acid and carotenoid content and visual quality of baby spinach (*Spinacia oleracea* L). *J Sci Food Agric.* 86:346-355.
- Bermudez-Brito, M., J. Plaza-Díaz, S. Muñoz-Quezada, C. Gómez-Llorente, A. Gil. 2012. Probiotic Mechanisms of Action. *Annals of Nutr and Metabol.* 61:160-174.
- Biswas, S., P. Van Dijck, A. Datta. 2007. Environmental sensing and signal transduction pathways regulating morphopathogenic determinants of *Candida albicans*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 71:348–376.
- Booth, S., K. Davidson, J. Sadowski. 1994. Evaluation of an HPLC method for the determination of phylloquinone (vitamin K1) in various food matrixes. *J. Agric. Food. Chem.* 42:295–300
- Breuer, U., H. Harms. 2006. *Debaryomyces hansenii* – an extremophilic yeast with biotechnological potential. *Yeast.* 23:415-437.
- Cardillo, R., C. Fungati, M. Barbeni, G. Allegrone. 1994. Process for the preparation of saturated delta lactones by bio-hydrogenation of the corresponding in saturated compounds by microorganisms. Pat. EP0577463.
- Carrillo, J. 2005. Control biológico de antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides* (Penz, Penz y Sacc) y su efecto en la calidad poscosecha del mango (*Mangifera indica* L.) en Sinaloa, México. *Rev Mex de Patol.* 23:24-32.

- Casarrubias-Castillo, K., N. Martínez, J. Délano. 2014. Treatments of *Amaranthus cruentus* with chemical and biological inducers of resistance has contrasting effects on fitness and protection against compatible Gram positive and Gram negative bacterial pathogens. *J of Plant Physiol.* 172:927-939.
- Chen, A., A. Mustapha. 2012. Survival of freeze-dried microcapsules of α -galactosidase producing probiotics in a soy bar matrix. *Food Microbiol.* 30:68–73.
- Clipson, N., D. Jennings. 1992. *Dendryphiella salina* and *Debaryomyces hansenii*: models for ecophysiological adaptation to salinity by fungi which live in the sea. *Can J of Botanic.* 70:2097-2105.
- Corazzari, I., M. Tomatis, F. Turci, S. Ferraris, E. Bertone, E. Prenesti, E. Verné. 2016. Gallic acid grafting modulates the oxidative potential of ferrimagnetic bioactive glass-ceramin SC-45. *Col and Surf: Biointerfaces.* 148:592-599.
- Daneshmand, A., G. Sdeghi, A. Karimi, A. Vaziry, A. Ibrahim. 2015. Evaluating complementary effects of ethanol extract of propolis with on growth performance, immune response and serum metabolites in male broiler chickens. *Livestock Sci.* 178:195-201.
- Denli, M., S. Cankaya, S. Silici, F. Okan, A.N. Uluocak. 2005. Effect of dietary addition of Turkish propolis on the growth performance, carcass characteristics and serum variables of quail (*Coturnix coturnix japonica*). *Asian-Australas. J. Anim. Sci.* 18:848–854.
- De Oliveira, M. A., V.M. de Souza, A.M. Bergamini, E.C.P. Martinis. 2011. Microbiological quality of ready-to-eat minimally processed vegetables consumed in Brazil. *Food Control.* 22:1400–1403.
- Doyle, M., M. Erickson. 2012. Opportunities for mitigating pathogen contamination during on-farm food production. *Inter J of Food Microbiol.* 152:54-74.
- Droby, S., E. Chalutz. 1994. Mode of action of biocontrol agents of postharvest diseases. En Wilson, C. L., Wisniewski, M. E. 1994. (eds.) *Biological Control of Postharvest Diseases. Theory and Practice.* CRC Press. Boca Raton, USA, pp. 63-75.
- Droby, S., M. Wisniewski, D. Macarasin, C. Wilson. 2002. Twenty years of postharvest biocontrol research: Is it time for a new paradigm?. *Post Biol and technol.* 52:137-145.
- 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.

Flanigan, P., E. Niemeyer. 2014. Effect of cultivar on phenolic levels, anthocyanin composition, and antioxidant properties in purple basil (*Ocimum basilicum* L.). *Food Chem.* 164:518-526.

Food and Drug Administration. 2008. Pat. Federal Register Final Rule - 73 FR49583 August 22, 2008.

Forbes-Hernández, T., F. Giampieri, M. Gasparri, L. Mazzoni, J. Quiles, J. Alvarez-Suarez, M. Battino. 2014. The effects of bioactive compounds from plants foods on mitochondrial function: A focus on apoptotic mechanisms. *Food and Chem Toxicol.* 68:154-182.

Furtado, E., A. Mota, E. Lago, P. Stringhete, C. Pinto, J. Martins. 2013. Products of vegetable origin: A new alternative for the consumption of probiotic bacteria. *Food Res Inter.* 51:764-770.

Giobbe, S., S. Marceddu, B. Scherm, G. Zara, V. Mazzarello, M. Budroni, Q. Migheli. 2007. The strange case of a biofilm-forming strain of *Pichia fermentans*, which controls *Monilinia* brown rot on apple fruit but is pathogenic on peach fruit. *FEMS Yeast Res.* 7:1389-1398.

Guneser, O., A. Demirkol, Y. Yuceer, S. Ozmen, M. Hosoglu, M. Elibol. 2015. Bioflavour production from tomato and pepper pomaces by *Kluyveromyces marxianus* and *Debaryomyces hansenii*. *Bioprocess Biosyst Eng.*

Harasym, J., R. Oledzki. 2014. Effect of fruit and vegetable antioxidants on total antioxidant capacity of blood plasma. *Nutrition*, 30(5), 511–517.

Hernández, L., J. Ochoa, E. Troyo, C. Larralde. 2010a. Biocontrol of postharvest blue mold (*Penicillium italicum* Wehmer) on Mexican lime by marine and citrus *Debaryomyces hansenii* isolates. *Posth Biol and Technol.* 56:181–187.

Hodges, D., C.F. Forney, W.V. Wismer. 2001. Antioxidant responses in harvested leaves of two cultivars of spinach differing in senescence rates. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 126:611–617.

Hong, J.C., T. Steiner, A. Aufy, T.F. Lien. 2012. Effects of supplemental essential oil on growth performance, lipid metabolites and immunity intestinal characteristics, microbiota and carcass traits in broilers. *Livest. Sci.* 144, 253–262.

- Simon, J.E., M.R. Morales, W.B. Phippen, R.F. Vieira, Z. Hao. 1999. A source of aroma compounds and a popular culinary and ornamental herb. in: J. Janick (Ed.), *Perspectives on New Crops and New Uses*. ASHS Press, Alexandria, VA. pp. 499e505
- Jensen, D., L. Friedrich, L. Harris, M. Danyluk, D. Schaffner. 2015. Cross contamination of *Escherichia coli* O157:H7 between lettuce and wash water during home-scale washing. *Food Microbiol.* 46:428-433.
- Jood, S., N. Khetarpaul, R. Goyal. 2012. Efficacy of barley based probiotic food mixture in treatment of pathogenic *E.coli* induced diarrhoea in mice. *J of Food Sci and Technol.* 49:200–206.
- Kalendar, R., D. Lee, A.H. Schulman. 2014. FastPCR software for PCR, *in silico* PCR, and oligonucleotide assembly and analysis. *DNA Cloning and Assembly Methods*, Methods in Molecular Biology, Svein Valla and Rahmi Lale (ed.), Humana Press, 1116: 271-302.
- Kranner, I., F. Minibayeva, R. Becket, C. Seal . 2010. What is stress? Concepts, definitions and applications in seed science. *New Phytologist.* 188: 655-673.
- Khon-young, D., K. Yamauchi, K. Suzuki. 2015. Influence of dietary fat sources and lysolecithin on growth performance, visceral organ size, and histological intestinal alteration in broiler chicken. *Livestock science.* DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.livsci.2015.03.011>
- Kutter, S., A. Hartmann, M. Schmid. 2005. Colonization of barley (*Hordeum vulgare*) with *Salmonella enterica* and *Listeria* spp. *FEMS Microbiol. Ecol.* 56:262–271.
- Lamont, S.J., 1998. Impact of genetics on disease resistance. *Poult. Sci.* 77:1111–1118.
- Lamy, E., J. Schroder, S. Paulus, P. Brenk, T. Stahl, V. Mersch. 2008. Antigenotoxic properties of *Eruca sativa* (rocket plant), erucin and erysolin in human hepatoma (HepG2) cells towards benzo(α)pyrene and their mode of action. *Food and Chem Toxicol.* 46:2415-2421.
- Lee, S.J., K. Umano, S.T. Ghibamoto, K.G. Lee. 2005. Identification of volatile components in basil (*Ocimum basilicum* L.) and thyme leaves (*Thymus vulgaris* L.) and their antioxidant properties. *Food Chem.* 91:131-137.
- Lester, G., E. Hallman, J. Perez. 2010. γ-Irradiation Dose: Effects on Baby-Leaf Spinach Ascorbic Acid, Carotenoids, Folate, α-Tocopherol, and Phylloquinone Concentrations. *J Agric Food Chem.* 58:4901–4906.

- Leverentz, B., W. Conway, W. Janisiewicz, M. Abadias, C. Kurtzman, M. Camp. 2006. Biocontrol of the Food-Borne pathogens *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* serovar Poona on fresh-cut apples with naturally occurring bacterial and yeast antagonists. *Applied and environ microbiol.* 72:1135-1140.
- Lima, V., C. Oliveira-Tintino, E. Santos, L. Morais, S. Tintino, T. Freitas, Y. Geraldo, R. Pereira, R. Cruz, I. Menezes, H. Coutinho. 2016. Antimicrobial and enhancement of the antibiotic activity by phenolic compounds: Gallic acid, caffeic acid and pyrogall. *Microbial Pathogen.* 99:56-61.
- Liu, S., M. Tao. 2009. Biocontrol of dairy moulds by antagonistic dairy yeast *Debaryomyces hansenii* in yoghurt and cheese at elevated temperatures. *Food Control.* 20:852-855.
- Magri, M., S. Tauk, S. Ceccato. 2010. Mechanisms of action in the biological control of phytopathogenic mold by a yeast. doi:10.1016/j.jbiotec.2010.09.864.
- Martínez, R. 2012. Aplicación de *Debaryomyces hansenii* como agente de biocontrol de la pudrición causada por *Penicillium citrinum* en limón persa. Universidad Autónoma de Nayarit.
- Martínez-Camacho, R. 2014. Uso de levadura marina como agente de biocontrol de infecciones fúngicas en la vaina verde de *Phaseolus vulgaris* L. CIBNOR. SC.
- Martínez-Luscher, J.,N. Torres, G. Hilbert, T. Richard, M. Sánchez-Díaz, S. Delrot, J. Aguirreolea, I. Pascual, E. Gomés. 2014. Ultraviolet-N radiation modifies the quantitative and qualitative profile of flavonoids and amino acids in grape berries. *Phytochemistry.* 102:106-114.
- Mitropouloi, G., V. Nedovic, A. Goyal, Y. Kourkoutas. 2013. Immobilization technologies in probiotic food production. *J of Nut and Metabol.* 716861.
- Muller, P.Y., H. Janovjak, A.R. Miserez, Z. Dobbie. 2002. Processing of gene expression data generated by quantitative real-time RT PCR. *Biotechniques.* 32:1372–1379.
- Muys, G., C. Verrips, V. Sylvian . 1976. Yeast containing food emulsions. Pat. No. US39995066.
- Nassar, A., K. El-Tarabily, K. Sivasithamparam. 2005. Promotion of plant growth by an auxin-producing isolate of the yeast *Williopsis saturnus* endophytic in maize (*Zea mays* L.) roots. *Biol. Fert. Soils.* 42:97–108.

- Niemira, B. 2007. γ -Irradiation Dose: Effects on baby-leaf spinach ascorbic acid, carotenoids, folate, α -tocopherol and phyloquinone concentrations. *J. Agric. Food Chem.* 58:4901-4906.
- Ochoa, J. L., J.R. Vazquez. 2004. Las levaduras marinas como herramientas científicas y biotecnológicas. *Universidad y Ciencia. Número Especial I*: 39-50.
- Orhan, I., F. Senol, N. Ozturk, S. Celik, A. Pultur, Y. Kan. 2013. Phytochemical contents and enzyme inhibitory and antioxidant properties of *Anethum graveolens* L. (dill) samples cultivated under organic and conventional agricultural conditions. *Food and Chem Toxicol.* 59:96-103.
- Pacheco, T., C. Geraldese, A. Ferreira, V. Biscola, K. Souza, A. Zerlotti, B. Cordenunsi, M. Landgarf. 2013. Changes in total ascorbic acid and carotenoids in minimally processed irradiated Arugula (*Eruca sativa* MILL) stored under refrigeration. *Rad Phy and Chem.* 90:125-130.
- Park, S., M. Valan, M. Lee, J. Chun, J. Min, S. Lee, N. Al-Dhabi, S. Kim. 2014. Quantification of glucosinolates, anthocyanins, free amino acids, and vitamin C in inbred lines of cabbage (*Brassica oleracea* L.). *Food Chem.* 145:77-85.
- Park, S.S., H.S. Lillehoj, P.C. Allen, D.W. Park, S. Fitzcoy, D.A. Bautista, E.P. Lillehoj. 2008. Immunopathology and cytokine responses in broiler chickens coinfecting with *Eimeria maxima* and *Clostridium perfringens* with the use of an animal model of necrotic enteritis. *Avian Dis.* 52 :14–22.
- Pattinson, D. J., A.J. Silman, N.J. Goodson, M. Lunt, D. Bunn, L. R. 2004. Vitamin C and the risk of developing inflammatory polyarthritis: prospective nested case-control study. *Annals of the Rheumatic Dis.* 63:843–847.
- Peng, Q., J. Li, Z. Li, Z. Duan, Y. Wu. 2016. Effects of dietary supplementation with oregano essential oil on growth performance, carcass traits and jejunal morphology in broiler chickens. *Ani Feed Sci and Technol.* 214:148-153.
- Petering, H., O. Gotze, D. Kimmig, R. Smolarski, A. Kapp, J. Elsner. 1999. The biological role of Interleukin-8: Functional analysis and expression of CXCR1 and CXCR2 on human eosinophils. *Blood.* 93(2): 694-702.
- Prince, P. S. M., K.S. Kumaran. 2012. Preventive effects of caffeic acid on lipids, lipoproteins and glycoproteins in isoproterenol induced myocardial infarcted rats. *Food Res Inter.* 45(1), 155–160.

- Prista, C., M. Loureiro. 2007. *Debaryomyces hansenii*, a salt loving spoilage yeast. In: A portrait of state-of-the-art research at the technical University of Lison. Pereira, M.S. (Ed). Springer. Holanda. 457-464 pp.
- Reineke, K., R. Sevenich, C. Hertwing, T. Janben, A. Frohling, D. Knorr, L. Wieler, O. Schluter. 2015. Comparative study on the high pressure inactivation behavior of the Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O104:H4 y O157:H7 outbreak strains and a non-pathogenic surrogate. *Food Microbiol.* 46:184-194.
- Reyes-Becerril, M., M. Esteban, D. Tovar-Ramírez, F. Ascencio-Valle. 2011. Polyamine determination in different strains of the yeast *Debaryomyces hansenii* by high pressure liquid chromatography. *Food Chem.* 127:1862-1865.
- Reyes-Becerril, M., I. Salinas, A. Cuesta, J. Meseguer, D. Tovar-Ramírez, F. Ascencio-Valle, M. Esteban. 2008a. 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 and Shell immunol.* 25:731-739.
- Reyes-Becerril, M., D. Tovar-Ramírez, F. Ascencio-Valle, R. Civera-Cerecedo, V. Gracia-López, V. Barbosa-Solomieu. 2008b. Effects of dietary live yeast *Debaryomyces hansenii* on the immune and antioxidant system in juvenile leopard grouper *Mycteroperca rosacea* exposed to stress. *Aquaculture.* 280:39-44.
- Roidoung, S., K. Dolan, M. Siddiq. 2016. Gallic acid as a protective antioxidant against anthocyanin degradation and color loss in vitamin-C fortified cranberry juice. *Food Chem.* 210:422-427.
- Shaughnessy, R., K. Meade, S. Cahalane, B. Allan, C. Reiman, J. Callanan, C. O'farrelly. 2009. Innate immune gene expression differentiates the early avian intestinal response between *Salmonella* and *Campylobacter*. *Vet Immunol and Immunopat.* 132: 191-198.
- Sampaio, F., P. Torre, F. Lopes, P. Perego, A. Converti. 2007. Influence of inhibitory compounds and minor sugars on xilitol production by *Debaryomyces hansenii*. *Applied Biochem and Biotechnol.* 136:165-181.
- Sani, H.A., A. Rahmat, M. Ismail, R. Rosli, S. Endrini. 2004. Potential anticancer effect of red spinach (*Amaranthus gangeticus*) extract. *Asia Pac J of Clin Nut.* 13 (4):396-400.

- Sarwar, M., G. Kaur, Z. Jabbar, K. Javed, M. Athar. 2007. *Eruca sativa* seeds possess antioxidant activity and exert a protective effect on mercuric chloride induced renal toxicity. *Food and Chem Toxicol.* 45:910-920.
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. <http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-estado/>. Tomado el 25/04/2015.
- Shyu, Y., J. Lin, Y. Chang, C. Chiang, D. Yang. 2009. Evaluation of antioxidant ability of ethanolic extract from dill (*Anethum graveolens* L.) flower. *Food Chem.* 115:515-521.
- Silimela, M., L. Korsten. 2007. Evaluation of pre-harvest *Bacillus licheniformis* sprays to control mango fruit diseases. *Crop Protection.* 26:1474–1481.
- Singh, Z., A. Sattar-Khan. 2012. Surfactant and Nutrient Uptake in Citrus. *Advances in Cit Nut.* 157-167.
- Singh, G., S. Maurya, M.P. Lampasona, C. Catalan. 2005. Chemical constituents, antimicrobial investigations, and antioxidative potentials of *A. graveolens* L. essential oil and acetone extract: Part 52. *J of Food Sci.* 70:M208–M215.
- Spadaro, D. 2003. Biological control of postharvest diseases of pome fruit using yeast antagonists. *Dottorato di ricerca in scienze agrarie, forestali ed agroalimentari.* Università degli studi di Torino. Torino, Italia.
- Sun, J., Z. Xiao, Z. Lin, G. Lester, Q. Wang, J. Harnly, P. Chen. 2013. Profiling Polyphenols in five *Brassica* species microgreens by UHPLC-PDA-ESI/HRMS. *J of Agricul and Food Chem.* 61:10960-10970.
- Tarchoune, I., C. Sgherri, R. Izzo, M. Lachaal, Z. Ouerghi, F. Navari-Izzo. 2010. Antioxidative responses of *Ocimum basilicum* to sodium chloride or sodium sulphate salinization. *Plant Physiol and Biochem.* 48:772-777
- Thind, T. 2012. *Fungicide Resistance in Crop Protection: Risk and Management.* CABI.
- Topcu, Y., A. Dogan, Z. Kasimoglu, H. Sahim-Nadeem, E. Polat, M. Erkan. 2015. The effects of UV radiation during the vegetative period on antioxidant compounds and postharvest quality of broccoli (*Brassica oleracea* L.). *Plant Physiol and Biochem.* 1-10.
- Vale, A., H. Cidade, M. Pinto, B. Oliveira. 2014. Effect of sprouting and light cycle on antioxidant activity of *Brassica oleracea* varieties. *Food Chem.* 165:379-387.

- Vessey, J.K. 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant Soil* 255:571–586.
- Wang, G., Z. Lei, Q. Zhong, W. Wu, H. Zhang, T. Min, H. Wu, F. Lai. 2017. Enrichment of caffeic acid in peanut sprouts and evaluation of its *in vitro* effectiveness against oxidative stress-induced erythrocyte hemolysis. *Food Chem.* 217:332-341.
- Wang, S., J.P. Melnyk, R. Tsao, M.F. Marcone. 2011. How natural dietary antioxidants in fruits, vegetables and legumes promote vascular health. *Food Res Inter.* 44(1), 14–22.
- Wijk, F., S. Nierkens, I. Hassing, M. Feijen, S. Koppelman, G. Jong, R. Pieters, L. Knippels. 2005. The effect of the food matrix on *in vivo* immune response to purified peanut allergens. *Toxicol Sci.* 86(2): 333-341.
- Windisch, W., S. Schedle, C. Plitzner, A. Kroismayr. 2008. Use of phytogetic products as feed additives for swine and poultry. *J. Anim. Sci.* 86:140-148.
- Wisniewski, M., C. Wilson, S. Droby, E. Chalutz, A. El Ghaouth, C. Stevens. 2007. Postharvest biocontrol: new concepts and applications. In: Vincent, C., Goettel, M.S., Lazarovits, G. (Eds.), *Biological Control A Global Perspective*. CABI, Cambridge, MA, USA. pp. 262–273.
- Xiao-Shen, L., Y. Teng, S. Zheng, X. Yang, X. Guo, X. Wang, K. Sha, G. Xu, H. Tian, X. Wang, X. Liu, J. Li, N. Huang. 2014. Luteolin decreases the attachment, invasion and cytotoxicity of UPEC in bladder epithelial cells and inhibits UPEC biofilm formation. *Food and Chem Toxicol.* 72:204-211.
- Xiao, Z., G. Lester, Y. Luo, Q. Wang. 2012. Assessment of vitamin and carotenoid concentrations of emerging food products: Edible microgreens. *Journal of Agricul and Food Chem.* 60, 7644-7651.
- Xiao, Z., Y. Luo, G. Lester, L. Kou, T. Yang, Q. Wang. 2014. Postharvest quality and shelf life of radish microgreens as impacted by storage temperature, packing film, and chlorine wash treatment. *Food Sci and Technol.* 55:551-558.
- Xiao, Z., X. Nou, Y. Luo, Q. Wang. 2014. Comparison of the growth of *Escherichia coli* O157:H7 and O104: H4 during sprouting and microgreen production from contaminated radish seeds. *Food Microbiol.* 44:60-63.
- Yan, F., S. Xu, Y. Chen, X. Zheng. (2014). Effect of rhamnolipids on *Rhodotorula glutinis* biocontrol of *Alternaria alternata* infection in cherry tomato fruit. *Posth Biol and Technol.* 97:32-35.

- Yao, H., S. Tian, Y. Wang. 2004. Sodium bicarbonate enhances Biocontrol efficacy of yeast in fungal spoilage of pears. *Inter J of Food Microbiol.* 93:297-304.
- Yu, Z. H., X. Zhang, S.Y. Li, C.Y. Li, D. Li, Z.N. Yang. 2012. *In vitro* evaluation of probiotic properties of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from Chinese Sauerkraut. *Afri J of Biotechnol.* 11:4868–4875.
- Zaefarian, F., M. Abdollahi, V. Ravindran. 2015. Starch digestion in broiler chickens fed cereal diets. *Ani Feed Sci and Technol.* 209:16-29.
- 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.
- Zúñiga, R., E. Troncoso. 2012. Improving nutrition through the design of food matrices. *Scientific, Health and Social Aspects of the Food Industry.* INTECH. Cap. 15.

12. ANEXOS

12.1 Microscopía Electrónica de Reflexión (MER)

12.1.1 Interacción *Aspergillus flavus* – *Debaryomyces hansenii*

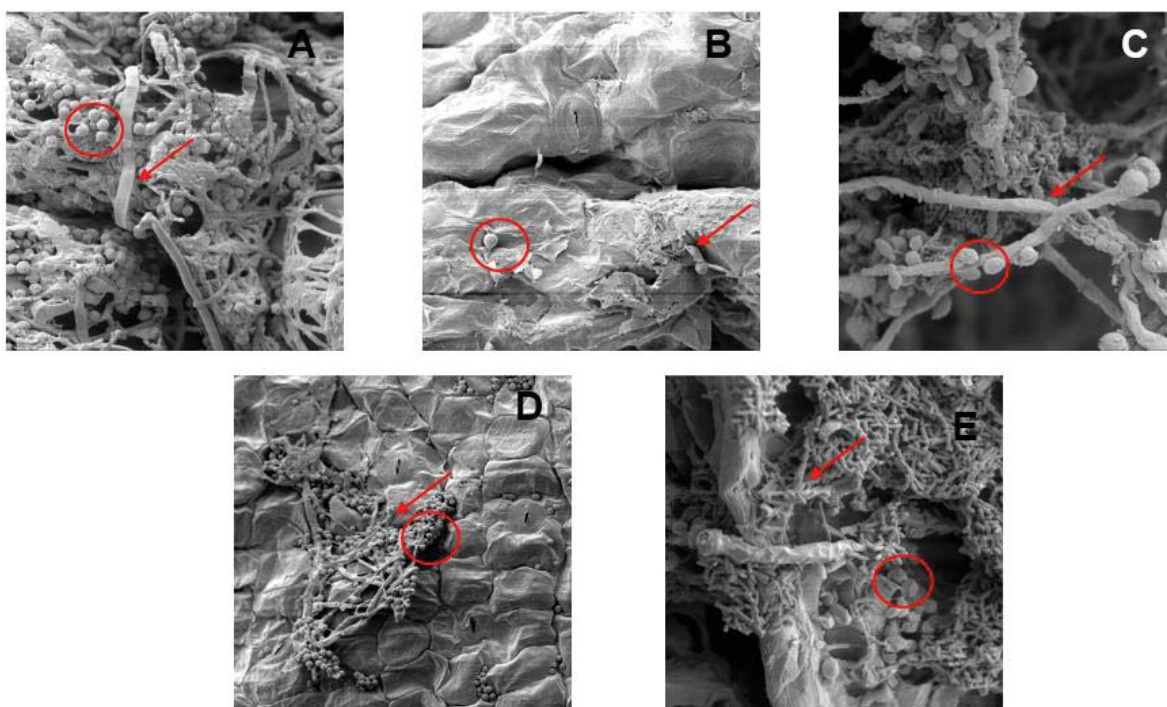


Figura 23. Interacción *A. flavus* – *D. hansenii* visualizado por MER. A) *O. basilicum*, B) *A. cruentus*, C) *E. sativa*, D) *B. oleracea* var. *gemmifera* y E) *A. graveolens*. Las flechas señalan la presencia de hifas de *A. flavus*; los círculos señalan la presencia de la levadura.