

Dos nuevas especies de levaduras pertenecientes a la biodiversidad Ecuatoriana con potencial actividad probiótica

Two new yeast species belonging to Ecuadorian biodiversity with potential probiotic activity

✉ Luis E. Gavilanes-Torres^{1,2}, Alma R. Koch², Patricia Portero¹, Enrique J. Carvajal-Barriga¹

✉ ¹ Colección de Levaduras Quito Católica (CLQCA), Centro Neotropical para Investigación de la Biomasa, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Escuela de Ciencias Biológicas, Quito, Ecuador

² Departamento de Ciencias de la Vida y Agricultura, Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, PO BOX 171-5231B, Sangolquí, Ecuador

✉ Luis Eduardo Gavilanes, luis.gavilanes.torres@gmail.com

RESUMEN

Objetivo: Evaluar aislados de levaduras pertenecientes la Colección de Levaduras Quito Católica (CLQCA) e identificar su potencial uso como probiótico en animales con sistema digestivo monogástricos. **Materiales y métodos:** Un grupo de 51 aislados pertenecientes a nueve nuevas especies caracterizadas de ambientes naturales del Ecuador fue evaluado por su capacidad de floculación, para realizar pruebas preliminares in vitro como: tolerancia a la temperatura, pH, sales biliares, hidrofobicidad de la superficie celular y adhesión de microorganismos patógenos, condiciones que simulan el tracto gastrointestinal de los animales. Además, se han llevado a cabo análisis de restricción de ADN mitocondrial para diferenciar cepas de aislados levaduras después del ensayo de floculación. **Resultados:** Se determinó que los aislados *Saturnispora quitensis* (CLQCA 10-114) y *Kazachstania yasuniensis* (CLQCA 20-374), mostraron las mejores resultados tolerar las condiciones del tracto gastrointestinal y adherir microorganismos patógenos a su pared celular. **Conclusión:** Los datos de este estudio ayudaron a elegir nuevos candidatos a probióticos de levaduras nativas con una eficacia probada in vitro. No obstante es indispensable realizar ensayos para determinar si estos dos aislados son reconocidos como GRAS en el futuro para incluirlos como probióticos inocuos.

Palabras Claves:

Probiótico, Floculación,
Tolerancia, Levadura Nativa.

Keywords:

Probiotic, Flocculation,
Tolerance, Native Yeast.

ABSTRACT

Objective: To evaluate yeast isolates from Colección de Levaduras Quito Católica (CLQCA) and identify their potential use as probiotic in monogastric animals. **Materials and methods:** A group of 51 isolates belonging to nine new characterized species from natural environments of Ecuador was evaluated by their flocculation capacity, in order to realize preliminary in vitro tests as: tolerance of temperature, pH, bile salts, cell surface hydrophobicity and adhesion of pathogenic microorganisms simulating gastrointestinal conditions in animal tract. In addition, mitochondrial DNA restriction analyses have been carried to differentiate yeast strains after flocculation assay. **Results:** It was determined that *Saturnispora quitensis* (CLQCA 10-114) and *Kazachstania yasuniensis* (CLQCA 20-374), showed the best characteristics in tolerate gastrointestinal tract conditions and adhere pathogenic microorganisms to their cell wall. **Conclusions:** Data from this study helped to choose new probiotic candidates from native yeasts with a proven in vitro effectiveness. Nevertheless it is essential to carry out tests to determine if these two isolates are recognized as GRAS in the future to include them as innocuous probiotics.

INTRODUCCIÓN

Durante la última década, las levaduras han sido consideradas como uno de los microorganismos capaces de ser usados como probióticos en la producción animal (1). La principal ventaja de utilizar levaduras como probióticos y no bacterias, es su mayor tamaño celular, característica que hace que aumente la protección intestinal del hospedero frente a microorganismos patógenos (2). La adherencia a microvelocidades intestinales representa otro factor

importante para que los microorganismos probióticos induzcan a la reducción de la flora microbiana patógena en la mucosa intestinal del huésped (3).

Las bacterias patógenas se unen a las manosas ubicadas en el exterior de las células intestinales, dicho mecanismo de unión se da a través de la fimbria tipo I manosa-sensible, estructura propia de bacterias patógenas (4). Manano oligosacáridos actúan previniendo la adherencia de lectinas bacterianas a los carbohidratos presentes en la superficie de las células intestinales y reducen la colonización de

patógenos en el tracto digestivo, los mismos que son posteriormente excretados por las heces del animal (5). Diferentes condiciones propias del intestino como: temperatura, pH ácido y sales biliares ponen en riesgo la supervivencia de microorganismos probióticos (6).

El objetivo de este estudio fue encontrar un potencial probiótico para ser usado en animales de producción con sistema digestivo monogástrico a partir de nuevas especies de levaduras aisladas y caracterizadas en el Ecuador.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se llevó a cabo una selección preliminar a partir de 51 aislados pertenecientes a nueve nuevas especies descritas y caracterizadas en la Colección de Levaduras Quito Católica (CLQCA), Quito, Ecuador, también se incluyó un aislado de *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*, probiótico comercial.

Determinación de capacidad de floculación de levaduras

Una suspensión de levaduras fue preparada y ajustada a 1×10^6 , 100 μL fueron inoculados con YEPD caldo e incubados en un agitador orbital a 25 °C durante un intervalo de tiempo de 18-22 h a 150 rpm. Posterior a la incubación, 10 μL del sobrenadante fueron removidos cuidadosamente y se determinó CFU/mL defloculadas. La suspensión fue centrifugada a 13000 rpm por 10 min, el sobrenadante fue descartado y se agregaron 900 μL de EDTA 0.05 M al tubo que contenía el pelet. El contenido fue resuspendido para homogenizar la células floculadas y defloculadas y se determinó CFU/mL total. El ensayo se realizó por triplicado.

El método Helm fue desarrollado para el cálculo del porcentaje de floculación (7), donde CFU/mL total fueron las células floculadas y defloculadas mientras que CFU/mL defloculadas, fueron las células que no flocularon.

$$\% \text{ Floculación} = \frac{\text{CFU/mL}_{\text{total}} - \text{CFU/mL}_{\text{defloculadas}}}{\text{CFU/mL}_{\text{total}}} \times 100$$

Análisis de restricción de ADN mitocondrial

Se realizó el análisis de polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) del DNA mitocondrial (mtDNA), digiriendo 20 μg de mtDNA extraído con 3U de enzima de restricción Hinf I (Promega™) por 1 h a 37 °C (8). Los patrones de restricción fueron observados por electroforesis en gel de agarosa 1% a 80V por 3 h.

Pruebas de tolerancia in vitro en aislados de levaduras

Tolerancia a temperatura de 37 °C

Una colonia de levaduras fue inoculada con YEPD caldo e incubada a 25 °C en agitación a 150 rpm. Posteriormente, la concentración se ajustó a 1×10^6 CFU/mL, se inoculó en YEPD caldo e incubó a 37 °C por 24, 48, y 72 h en agitación a 150 rpm. CFU/mL fue determinado en cada intervalo de tiempo.

Tolerancia a pH ácido y sales biliares

Cuatro tratamientos fueron establecidos para los ensayos *in vitro* de tolerancia a pH ácido y sales biliares (Tabla 1). YEPD caldo fue preparado con 0.3%, 0.6% (w/v) sales biliares (Difco, BD, USA) y diluido en una solución de buffer fosfato 1X (PBS, 10 mM fosfato, pH 7.4) ajustado previamente a pH 2.5 y 4.5 con HCl 1 M de acuerdo al tratamiento respectivo. Un tratamiento control fue incluido sin sales biliares ni pH ácido.

Tabla 1. Tratamientos *in vitro* a distintos valores de pH y concentraciones de sales biliares.

Tratamiento	Sales biliares (w/v)	pH
T1	0,3	2,5
T2	0,6	2,5
T3	0,3	4,5
T4	0,6	4,5

Una suspensión de 1×10^6 se inoculó en en YEPD caldo modificado con sales biliares y pH ajustado para cada tratamiento y se incubó a 37 °C en un agitador orbital a 150 rpm. Después de 24 h, se realizaron diluciones seriadas de las muestras con NaCl 0.9% (1/100, v/v) y 100 μ L fueron inoculados en YM agar para determinar CFU/mL viables.

El porcentaje de supervivencia fue calculado (9). CFU/mL modificado correspondían a los tratamientos T1, T2, T3, T4 y CFU/mL YPD tratamiento control.

$$\% \text{ Supervivencia} = \frac{\text{CFU/mL}_{\text{YPD modificado}}}{\text{CFU/mL}_{\text{YPD}}} \times 100$$

Hidrofobicidad de la superficie celular (HSC)

Se determinó la HSC utilizando el método bifásico agua-hidrocarburo MATH. Una colonia de levaduras se inoculó en YPD caldo a 25 °C en agitación a 150 rpm durante 24 h. Se centrifugó el contenido y se lavó el pellet tres veces con buffer PBS 1X (pH 7,4). Se resuspendió en el mismo buffer hasta llegar a una DO₄₉₂ de 0,4 (A_o). Se añadió 1 mL de xileno con 3 mL de la suspensión preparada. El contenido se agitó durante 1 min, se dejó separar las dos fases y se midió la DO₄₉₂ de la fase acuosa (A_f). La prueba se realizó por triplicado y el porcentaje de hidrofobicidad fue calculado (10).

$$\% \text{ Hidrofobicidad} = \frac{(A_o - A_f)}{A_o} \times 100$$

Aglutinación y adhesión de bacterias patógenas a la pared celular de levaduras

Se utilizaron *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Listeria monocytogenes* ATCC 15313, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Escherichia coli* ATCC 9637, *Staphylococcus epidermidis* 12228 y *Staphylococcus aureus* ATCC 6538. La habilidad de levaduras en aglutinar microorganismos patógenos fue evaluada (11) al igual que la capacidad de adhesión por microscopía óptica y tinción Gram (12).

Análisis estadístico

Los resultados experimentales se analizaron utilizando el software IBM SPSS Statistics 23 (2016). Se realizó un diseño completamente aleatorio con una disposición factorial 3x2x2 (especie, sales biliares, pH) y un análisis de varianza (ANOVA). Los valores de CFU/mL se transformaron en log₁₀. Las pruebas de Tukey y LSD Fisher se usaron para realizar comparaciones entre medias de especies y tratamientos, respectivamente. Las diferencias entre los datos se consideraron significativas para $P < 0,05$.

RESULTADOS

Capacidad floculante de aislados de levaduras

Los 51 aislados presentaron resultados variados en su capacidad de floculación. *Kodamaea transpacifica* (n=29) obtuvo resultados dispersos en todos sus aislados, (CLQCA 24F-012) tuvo un porcentaje de $86,74 \pm 2,37$ y (CLQCA 24i-158) de $11,84 \pm 4,34$. *Kazachstania yasuniensis* (n=7) mostró el mejor resultado obteniendo valores superiores al 90%. *Candida theae* (n=6) entre $56,83 \pm 3,38$ (CLQCA 10-062) y $94,37 \pm 2,92$ (CLQCA 10-045). El resto de aislados obtuvo valores superiores al 80% y *Saturnispora quitensis* (CLQCA 10-114)

de $95,84 \pm 1,21$. Los aislados con un porcentaje de floculación más alto que *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* $95,84 \pm 1,21$, fueron considerados para los siguientes ensayos in vitro (Figura 1).

Diferenciación de cepas de levaduras basado en análisis de restricción de ADN mitocondrial

El análisis de restricción de ADN mitocondrial permitió la identificación de dos patrones moleculares diferentes de *Kazachstania yasuniensis* (Figura 2). Estas cepas fueron identificadas para reducir el número de muestra en los siguientes ensayos.

Figura 1.

Aislados de levaduras pre-seleccionados con porcentaje de floculación \geq *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*.

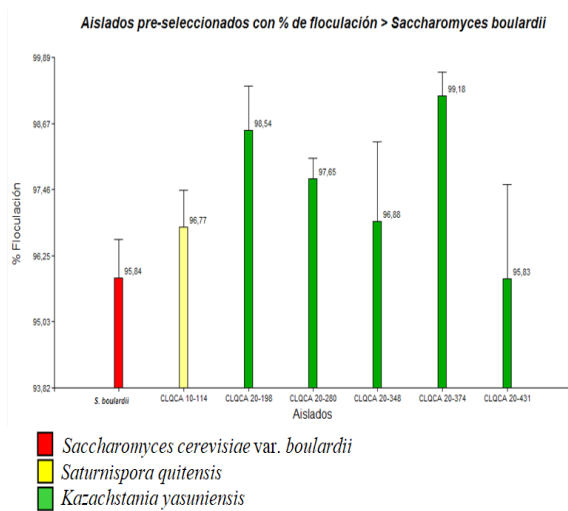
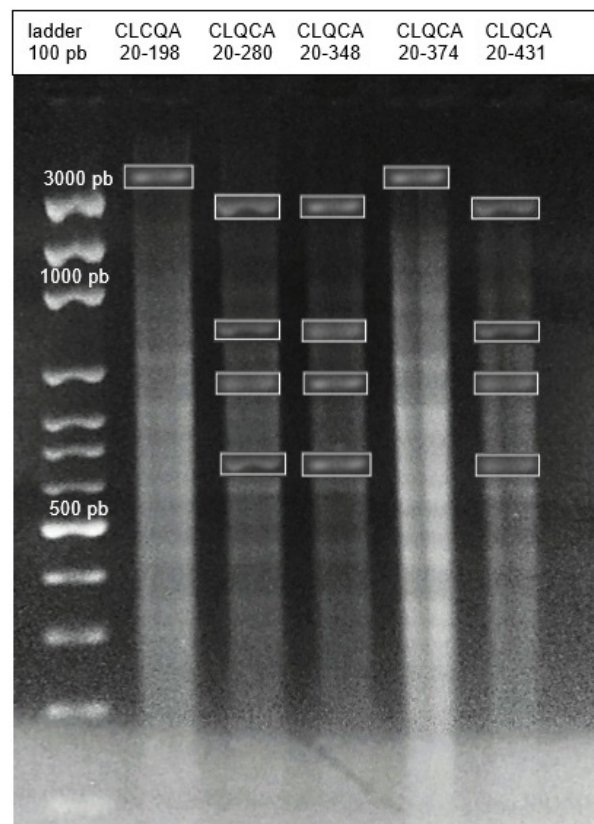


Figura 2.

Patrones de bandas después de RFLP del mtDNA usando Hinf I. Cepa 1 (CLQCA 20-198), (CLQCA 20-374); cepa 2 (CLQCA 20-280), (CLQCA 20-374), (CLQCA 20-431).



Pruebas in vitro a aislados pre seleccionados

Los aislados mostraron crecimiento cinético de 10^8 CFU/mL hasta 72 h de incubación. *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* tuvo crecimiento exponencial

a las 24 h, *Kazachstania yasuniensis* (CLQCA 20-374) a las 48 h y *Saturnispora quitensis* (CLQCA 10-114) a las 72 h. A diferencia de *Kazachstania yasuniensis* (CLQCA 20-280) que no evidenció crecimiento. Los resultados se presentan en la Tabla 2.

Tabla 2.

Crecimiento 24 h (log CFU/mL) y porcentaje de supervivencia a condiciones de estrés de pH ácido y concentraciones de sales biliares.

Tratamiento	Especie	log (CFU.mL ⁻¹) ^a	% Supervivencia
T1 sales biliares 0.3% (w/v) pH 2,5	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> var. <i>boulardii</i>	7,734 ± 0,01	47,16
	<i>Kazachstania yasuniensis</i> (CLQCA 20-374)	7,649 ± 0,05	22,56
	<i>Saturnispora quitensis</i> (CLQCA 10-114)	7,794 ± 0,04	85,39
T2 sales biliares 0.6% (w/v) pH 2,5	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> var. <i>boulardii</i>	7,665 ± 0,02	40,29
	<i>Kazachstania yasuniensis</i> (CLQCA 20-374)	7,619 ± 0,03	21,04
	<i>Saturnispora quitensis</i> (CLQCA 10-114)	7,690 ± 0,03	67,12
T3 sales biliares 0.3% (w/v) pH 4,5	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> var. <i>boulardii</i>	7,895 ± 0,03	68,41
	<i>Kazachstania yasuniensis</i> (CLQCA 20-374)	7,808 ± 0,06	32,49
	<i>Saturnispora quitensis</i> (CLQCA 10-114)	7,821 ± 0,06	90,87
T4 sales biliares 0.6% (w/v) pH 4,5	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> var. <i>boulardii</i>	7,729 ± 0,11	46,67
	<i>Kazachstania yasuniensis</i> (CLQCA 20-374)	7,751 ± 0,06	28,45
	<i>Saturnispora quitensis</i> (CLQCA 10-114)	7,740 ± 0,03	75,34

^a(X ± SD promedio entre repeticiones: n=3)

Tabla 3.

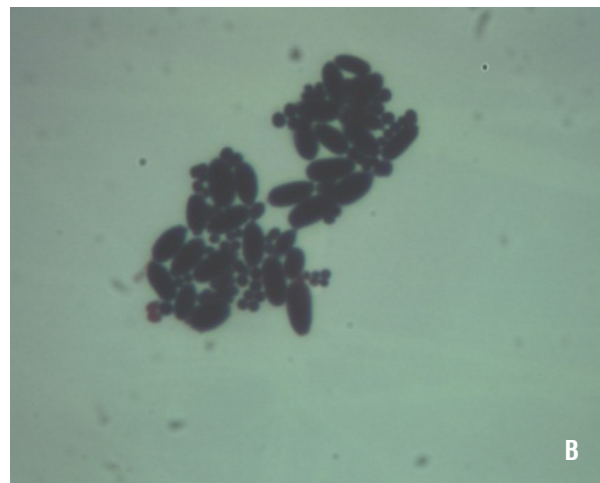
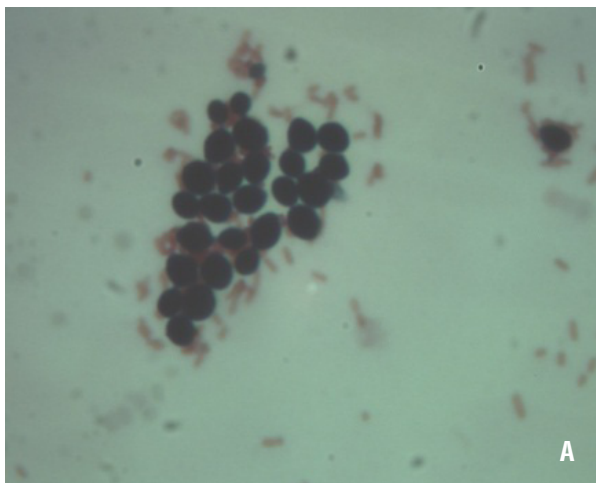
Aglutinación y adherencia de bacterias patógenas a la pared celular de aislados de levaduras.

Bacterias	Aislados de levaduras							
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> var. <i>boulardii</i>		<i>Kodamaea transpacifica</i> CLQCA 24i-158		<i>Kazachstania yasuniensis</i> CLQCA 20-374		<i>Saturnispora quitensis</i> CLQCA 10-114	
	Ag	Ad	Ag	Ad	Ag	Ad	Ag	Ad
<i>S. typhimurium</i>	+	+	-	-	+	+	+	+
<i>L. monocytogenes</i>	-	-	+	+	-	-	+	+
<i>S. aureus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. epidermidis</i>	+	+	-	-	+	+	+	+
<i>P. aeruginosa</i>	-	-	-	-	+	+	-	-
<i>E. coli</i>	+	+	+	+	+	+	+	+

Ag: Aglutinación, Ad: Adherencia, +: Positivo, -: Negativo

Figura 3.

Pruebas de adhesión positiva observadas en tinción de Gram. a) *Saturnispora quitensis* (CLQCA 10-114) a *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, b) *Kazachstania yasuniensis* (CLQCA 20-374) a *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228.



La hidrofobicidad de la superficie celular en *Kazachstania yasuniensis* (CLQCA 20-374) y *Saturnispora quitensis* (CQLCA 10-114) resultó relativamente igual a *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* 80%. *Kodamaea transpacifica* (CLQCA 24i-158) (aislado no floculante) obtuvo un bajo porcentaje de hidrofobicidad del 12,08%. Los mismos aislados se usaron para aglutinar y adherir bacterias a su pared celular y los resultados se muestran en la (Tabla 3) y (Figura 3).

DISCUSIÓN

La floculación es un parámetro dependiente de cepa y no de especie, debido a la expresión de genes FLO que determina la capacidad de floculación de la levadura, sin embargo, factores externos también pueden afectar el proceso como: temperatura, medio de cultivo, pH (13).

Kazachstania yasuniensis (CLQCA 20-374) y *Saturnispora quitensis* (CLQCA 10-114) toleraron la temperatura de 37 °C, porque ambas levaduras fueron capaces de regular la composición lipídica de su membrana celular como un mecanismo de adaptación a diferentes hábitats. La tolerancia a temperatura de 37 °C es un parámetro prioritario para que un microorganismo sea considerado como probiótico (14).

Saturnispora quitensis (CLQCA 10-114) y *Kazachstania yasuniensis* (CLQCA 20-374) mostraron los mejores resultados en todos los tratamientos in vitro de tolerancia a pH ácido y sales biliares. Es interesante el hecho de la tolerancia en estos aislados a pH 2,5 durante 24 h, porque hay informes de que *Lactobacillus acidophilus* M92 sólo sobrevivió durante 3 h (15).

La hidrofobicidad celular superficial parece ser un requisito necesario para que los microorganismos se adhieran las células intestinales y realicen la acción probiótica en el huésped; sin embargo, se reportó que *Bacillus cereus* es un probiótico efectivo pero que no tiene una gran capacidad de adhesión a las microvellosidades (16). De tal manera que la HSC no se considera un parámetro indispensable para determinar si un microorganismo puede ser un buen candidato a probiótico.

Saturnispora quitensis (CLQCA 10-114) y *Kazachstania yasuniensis* (CLQCA 20-374) mostraron capacidad de adherencia y aglutinación de un gran número de bacterias patógenas, efectividad in vitro comprobada para sobrevivir a condiciones de estrés y alta floculación por lo tanto, ambas levaduras pueden llegar a ser potenciales probióticos, no obstante es indispensable realizar ensayos GRAS en el futuro para incluirlos como probióticos inocuos. Sin embargo, *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* sigue siendo la especie más ampliamente utilizada como probiótico por su eficacia in vitro y también por ser caracterizada como GRAS (17).

AGRADECIMIENTOS

Un especial agradecimiento a Javier Carvajal Barriga y Patricia Portero de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador y Alma Koch de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE y a todos los investigadores del Centro Neotropical para la Investigación de la Biomasa, Quito, Ecuador.

.....
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Jacques, N., & Casaregola, S. (2008). Safety assessment of dairy microorganisms: the hemiascomycetous yeasts. *International journal of food microbiology*, 126(3), 321-326. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.08.020>.
2. Czerucka, D., Piche, T., & Rampal, P. (2007). Review article: yeast as probiotics—*Saccharomyces boulardii*. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 26(6), 767-778. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2007.03442.x>.
3. Collado, M. (2004). Caracterización de cepas del género *Bifidobacterium* con carácter probiótico (Tesis Doctoral). Valencia: Universidad Politécnica de Valencia). <https://doi.org/10.4995/Thesis/10251/1907>.
4. Teng, C. H., Cai, M., Shin, S., Xie, Y., Kim, K. J., Khan, N. A. & Kim, K. S. (2005). *Escherichia coli* K1 RS218 interacts with human brain microvascular endothelial cells via type 1 fimbria bacteria in the fimbriated state. *Infection and immunity*, 73(5), 2923-2931. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.5.2923-2931.2005>.
5. Baurhoo, B., Phillip, L., & Ruiz-Feria, C. A. (2007). Effects of purified lignin and mannan oligosaccharides on intestinal integrity and microbial populations in the ceca and litter of broiler chickens. *Poultry science*, 86(6), 1070-1078. <https://doi.org/10.1093/ps/86.6.1070>.
6. Chen, W., Liu, J., & Gluud, C. (2002). Bile acids for viral hepatitis. *Cochrane Database Syst*, 558. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD003181>.
7. Jin, Y. L., & Speers, R. A. (1998). Flocculation of *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Research International*, 31(6-7), 421-440. [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(99\)00021-6](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(99)00021-6).
8. Querol, A., Barrio, E., & Ramón, D. (1992). A comparative study of different methods of yeast strain characterization. *Systematic and Applied Microbiology*, 15(3), 439-446. [https://doi.org/10.1016/S0723-2020\(11\)80219-5](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(11)80219-5).
9. García-Hernández, Y., Rodríguez, Z., Brandão, L. R., Rosa, C. A., Nicoli, J. R., Iglesias, A. E. & Halaihel, N. (2012). Identification and in vitro screening of avian yeasts for use as probiotic. *Research in veterinary science*, 93(2), 798-802. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2011.09.005>.
10. Vinderola, C. G., & Reinheimer, J. A. (2003). Lactic acid starter and probiotic bacteria: a comparative “in vitro” study of probiotic characteristics and biological barrier resistance. *Food Research International*, 36(9), 895-904. [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(03\)00098-X](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(03)00098-X).
11. Marteau, P. R., de Vrese, M., Cellier, C. J., & Schrezenmeir, J. (2001). Protection from gastrointestinal diseases with the use of probiotics. *The American journal of clinical nutrition*, 73(2), 430s-436s. <https://doi.org/10.1093/ajcn/73.2.430s>.
12. Gedek, B. R. (1999). Adherence of *Escherichia coli* serogroup O 157 and the *Salmonella* Typhimurium mutant DT 104 to the surface of *Saccharomyces boulardii*. *Mycoses*, 42, 261-264. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0507.1999.00449.x>.
13. Alvarez, F., da Mata Correa, L. F., Araújo, T. M., Mota, B. E. F., da Conceição, L. E. F. R., de Miranda Castro, I., & Brandão, R. L. (2014). Variable flocculation profiles of yeast strains isolated from cachaça distilleries. *International journal of food microbiology*, 190, 97-104. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.08.024>.
14. Swan, T. M., & Watson, K. (1997). Membrane fatty acid composition and membrane fluidity as parameters of stress tolerance in yeast. *Canadian journal of microbiology*, 43(1), 70-77. <https://doi.org/10.1139/m97-010>.
15. Kos, B. V. Z. E., Šušković, J., Vuković, S., Šimpraga, M., Frece, J., & Matošić, S. (2003). Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. *Journal of applied microbiology*, 94(6), 981-987. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.01915.x>.
16. Hoa, N. T., Baccigalupi, L., Huxham, A., Smertenko, A., Van, P. H., Ammendola, S. & Cutting, S. M. (2000). Characterization of *Bacillus* species used for oral bacteriotherapy and bacterioprophyllaxis of gastrointestinal disorders. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(12), 5241-5247. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.12.5241-5247.2000>.
17. Fleet, G. H. (2007). Yeasts in foods and beverages: impact on product quality and safety. *Current opinion in biotechnology*, 18(2), 170-175. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2007.01.010>.