



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO  
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

“Efecto del proceso de secado industrial de la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* L11 sobre su capacidad de aglutinar aislados de campo de *Escherichia coli* y *Salmonella* spp.”

# TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

PRESENTA:

PEDRO DE JESÚS ALANÍS

ASESORES:

PhD. JUAN CARLOS VÁZQUEZ CHAGOYÁN  
Dr. en C. ABDELFATTAH ZEIDAN MOHAMED SALEM  
M. en S.A. ROBERTO MENDOZA VILCHIS



TOLUCA, ESTADO DE MÉXICO, MAYO DE 2017.

## **Dedicatoria**

A mis papas, Pedro y María del Carmen, por todo su esfuerzo, sacrificio, perseverancia, por nunca rendirse, y darme todo en esta vida. Por dar lo mejor de ellos como padres y brindarme la oportunidad de estar en el lugar correcto.

A mi hermana Ilse por su apoyo incondicional, por creer en mí, por todo su esfuerzo y sacrificio, y a mi hermano Diego.

A todos aquellos que creyeron en mí, y me brindaron su cariño incondicional, sin importar la situación.

## **Agradecimientos**

A dios.

A la Universidad Autónoma del Estado de México

A mi Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

A mis asesores de Tesis PhD. Juan Carlos Vázquez Chagoyán, Dr. en C.

Abdelfattah zeidan Mohamed Salem, M. en S.A. Roberto Mendoza Vilchis

## ÍNDICE

Dedicatoria.....	4
Agradecimientos .....	5
Índice de Tablas .....	8
Indice de Figuras .....	9
Resumen .....	10
I. Introducción .....	1
II. Revisión de literatura .....	3
2.1. El uso de aditivos en la alimentación animal .....	3
<b>2.1.1. Antibióticos.....</b>	<b>3</b>
<b>2.1.2. Lactobacillus .....</b>	<b>6</b>
<b>2.1.3. Enzimas.....</b>	<b>7</b>
<b>2.2. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>.....</b>	<b>9</b>
<b>2.2.1. Uso de <i>S. cerevisiae</i> en la alimentación animal y humana.....</b>	<b>11</b>
<b>2.2.2. Características de la pared celular de <i>S. cerevisiae</i> y su efecto frente a bacterias Gram negativas.....</b>	<b>12</b>
2.2. <i>Escherichia coli</i> .....	15
2.3 <i>Salmonella</i> spp. ....	17
2.4 Capacidad de <i>S. cerevisiae</i> para adherir a sus paredes celulares bacterias Gram negativas .....	18
2.5 Producción industrial de la levadura.....	20
III. Justificación .....	22
IV. Hipótesis.....	24
V. Objetivos .....	25
VI. Material.....	26
VII. Métodos.....	28
<b>7.1. Prueba de la aglutinación de la levadura .....</b>	<b>28</b>
<b>7.2. Preparación del <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....</b>	<b>29</b>
VIII. Límite de espacio .....	31
IX. Límite de tiempo.....	32
X. Resultados .....	33

XI. Discusión.....	36
XII. Conclusiones.....	40
XIII.Sugerencias .....	41
XIV.Bibliografía .....	42

## Índice de Tablas

<b>Tabla 1.</b> Cepas con sus principales serotipos que afectan a los animales	Pág. 16
<b>Tabla 2.</b> Comparación de la capacidad de aglutinación frente a bacterias coliformes (85 serotipos de <i>Salmonella</i> y 10 aislados de <i>E. coli</i> ), por <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (cepa L11) sometido a dos tratamientos de secado (Tambor o <i>Spray</i> ).	33
<b>Tabla 3.</b> Diferencias observadas en la capacidad de aglutinación de diferentes serotipos de <i>Salmonella</i> procedentes de tres especies de animales domésticos, por la cepa L11 de <i>S. cerevisiae</i> , procesada por secado en Tambor o por <i>Spray</i>	34
<b>Tabla 4.</b> Aglutinación de 85 cepas de <i>Salmonella</i> y 10 de <i>E. coli</i> con dos tipos de secado frente a <i>Saccharomyces cerevisiae</i> L11	35

## Indice de Figuras

	Pág.
<b>Figura 1.</b> (A) <i>S. cerevisiae</i> 47 aglutinando a <i>S. typhimurium</i> ATCC 14028. Micrografia Electronica. (B) Aglutinación de <i>S. cerevisiae</i> 47 frente a <i>E. coli</i> . (aislado patógeno de campo) Tinción de Gram	20
<b>Figura 2.</b> Procedimiento de la producción industrial de levaduras y paredes celulares de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	21
<b>Figura 3.</b> Preparados de levadura	29
<b>Figura 4.</b> Intensidad de aglutinación de <i>S. cerevisiae</i> L11 frente a cepas de campo de <i>Salmonella</i>	30

## Resumen

### **Efecto del proceso de secado industrial de la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* L11 sobre su capacidad de aglutinar aislados de campo de *Escherichia coli* y *Salmonella* spp.**

Pedro De Jesús Alanís

Asesores: PhD. Juan Carlos Vázquez Chagoyán, Dr. en C. Abdelfattah Zeidan Mohamed Salem, M. en S.A. Roberto Mendoza Vilchis

Tesis de licenciatura, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma del Estado de México.

*Saccharomyces cerevisiae* es una levadura usada comúnmente en la industria panadera, sin embargo, se le han observado amplios beneficios en la producción animal, como promotor del crecimiento e inmunoestimulante, por sus propiedades adherentes frente a enterobacterias. Con el objetivo de determinar el efecto del proceso industrial sobre su capacidad para aglutinar a cepas de campo de *Escherichia coli* (*E. coli*) y *Salmonella* spp. por diferentes métodos de secado: Aerosol (spray) y en Tambor, se realizó la evaluación *in vitro* de los diferentes preparados de *S. cerevisiae* L11 frente a 85 cepas de *Salmonella* spp. con 15 diferentes serotipos ( *typhimurium*, *typhi*, *gallinarum*, *bmonofásica*, *C1 monofásica*, *agona*, *london*, *anatum*, *bredeney*, *tennesse*, *enteritidis*, *infantis*, *senftenberg*, *reading* y *typhimurium* ATCC 14028 ) y siete aislados de campo no tipificados, provenientes de ganado bovino, porcino y pollo de engorda así como diez aislados no caracterizados de *E. coli* provenientes de utensilios de matanza. El ensayo se llevó a cabo *in vitro*, mezclando cada aislado de *Salmonella* (n=85) y *E. coli* (n=10) con dos muestra de *S. cerevisiae* deshidratadas de manera independiente con cuatro repeticiones. Los preparados de *S. cerevisiae* se homogenizaron con PBS (pH 7.2; 1mg/ml) y se mezclaron con bacterias ( $1 \times 10^8$ /ml, cultivadas en medio ICC/16 horas/37°C), por agitación en placa (50µl de cultivo bacteriano y 50µl de

levadura) y se midió la intensidad de aglutinación, por formación de grumos, en escala arbitraria de 0 (nula) a 3 (máxima), por apreciación visual, en un negatoscopio. Como Control se utilizaron los preparados de levadura con PBS y sin mezclarse con las bacterias. Los resultados obtenidos demostraron que los dos tipos de secado son capaces de aglutinar a *Salmonella* spp. y a *E. coli* en diferente intensidad, donde el secado en *spray* demostró mayor eficiencia de aglutinación en comparación con el secado en tambor y con el control. Estos resultados sugieren que la levadura deshidratada por el método de *spray* es más bioactiva y que podría dar mejores resultados como probiótico en la alimentación animal.

**Palabras clave:** *Salmonella*, *Escherichia coli*, Serotipos, Secado, Tambor, *Spray* *Saccharomyces cerevisiae* L11.

## I. Introducción

El incremento en la presión de los sistemas de producción animal para aumentar su competitividad frente a las demandas del mercado ha favorecido la aparición de enfermedades infectocontagiosas, principalmente en los sistemas intensivos, por lo que muchas veces se opta por medidas profilácticas a base de antibióticos a manera de aditivos en el alimento. Esto se convirtió en uso común en el sector pecuario por muchos años (Vásquez-Piñeros *et al.*, 2012), sin embargo se ha demostrado que el uso indiscriminado de antibióticos ha generado bacterias resistentes, propiciando la eliminación de bacterias benéficas que compiten con microorganismos patógenos, comprometiendo así la respuesta inmune en niveles terapéuticos (Lunden y Bylund, 2012; Serezlí *et al.*, 2005). De ahí que los productores de alimentos de origen animal para consumo humano, se ven cada vez más sometidos a presiones legislativas, para reducir el uso de antibióticos como promotores del crecimiento (Arce *et al.*, 2005). En los últimos años se han publicado trabajos sobre *Saccharomyces cerevisiae* (*S. Cerevisiae*) que demuestran los beneficios en la producción animal, aunque su mecanismo específico de acción no ha sido determinado totalmente, se reconoce el efecto positivo sobre la integridad intestinal al contribuir a la exclusión de patógenos e inmunoestimulación contra infecciones por *Escherichia coli* *E. coli* y *Salmonella* spp. (Gómez *et al.*, 2009). Se le han observado amplios beneficios en animales de abasto, a los que se les ha suplementado con levadura viva de *S. cerevisiae* en la dieta. Cabe mencionar que en cerdas en estado de gestación y en lechones se le ha empleado para reducir la duración y severidad de la diarrea por destete causada por *E. coli* enterotoxiénica (Trckova *et al.*, 2014), además de ser empleada como agente preventivo y terapéuticos para el tratamiento de una variedad de enfermedades intestinales en humanos y animales (Zanello *et al.*, 2009), ya que *S. cerevisiae* cuenta con varios componentes inmunoestimuladores como los beta glucanos, ácidos nucleicos, mánanos oligosacáridos y quitina, que se cree, contribuyen a estimular la respuesta inmune innata que a su vez contribuye a mejorar la respuesta inmune humoral de los animales contra otros agentes

patógenos (Andrzej *et al.*, 1994). *S. cerevisiae* es un probiótico que se proporciona por vía oral a los animales o el hombre, favoreciendo su salud en general. Existen muchas cepas las cuales han sido estudiadas previamente y en las cuales se ha encontrado que son capaces de aglutinar cepas de *Salmonella* spp. y *E. coli* aisladas de infecciones naturales. El proceso de aglutinación se explica por los mánanos de la pared celular, que pueden ser afectados por el procesos de fermentación y secado industrial, por lo que en este trabajo de investigación se evalúa los efectos del secado de la cepa L11, sobre su capacidad de aglutinación en aislados de campo de *E. coli* y *Salmonella* spp.

## II. Revisión de literatura

### 2.1. El uso de aditivos en la alimentación animal

Los aditivos se han clasificado como todos aquellos ingredientes o compuestos que se adicionan a los alimentos, cuyo uso mejora en alguna forma la apariencia, la vida en bodega, la aceptación, la ingestión, la digestión, la absorción o el metabolismo de los alimentos en la producción y en la salud animal (Shimada, 2009). Los constantes esfuerzos para producir alimentos de origen animal para el hombre, cada vez en forma más eficiente y a costos más bajos, han estimulado la búsqueda de las mejores combinaciones entre los nutrientes, destinados a la alimentación animal, en consecuencia a la implementación de nuevos aditivos que puedan incrementar la eficiencia, grado de crecimiento, nivel de producción y mejorar la respuesta inmune ante determinados agentes patógenos. Estos esfuerzos han conducido principalmente al uso de enzimas, lactobacillus, levaduras, antibióticos y otras sustancias químicas para la producción animal. Por tanto, aunque estos últimos no son nutrientes y en consecuencia no se les puede considerar alimentos esenciales, es importante conocer sus efectos sobre los animales en la producción de carne, leche, huevo, así como sus repercusiones en la salud del hombre (Maynard *et al.*, 1981).

#### 2.1.1. Antibióticos

El uso inadecuado de los antibióticos representa un riesgo para la salud y un desperdicio de recursos económicos en los servicios de salud, que contribuye en gran medida al aumento de la resistencia bacteriana en la población animal y humana incrementando los costos y la mortalidad por enfermedades infecciosas por lo que se le considera un grave problema de salud. En México, diversos aspectos sobre el uso inapropiado de estos productos han sido documentados, y en respuesta se han desarrollado principalmente intervenciones educativas y

gerenciales dirigidas a médicos en servicios públicos de salud, así como programas de vigilancia epidemiológica. La investigación y las intervenciones enfocadas a consumidores, farmacias y el sector privado han sido escasas. (Dreser *et al.*, 2008).

Los antibióticos son sustancias químicas que inhiben el crecimiento (bacteriostáticos) o matan bacterias (bactericidas) que son producidos por una variedad de hongos (Vester y Douthwaite, 2001). El uso de estos productos ya sean de origen natural, semisintéticos o sintéticos, proporcionan una actividad antimicrobiana, administrados por vía oral, parenteral o tópica, que son usados en medicina humana y veterinaria para el tratamiento y la prevención de enfermedades, así como otros propósitos, entre ellos, como promotores del crecimiento en animales de abasto (Phillips, 2004). Los antibióticos promotores del crecimiento (APC) son definidos como cualquier medicamento que inhiben el crecimiento bacteriano, aumenta la ganancia de peso y se administran en dosis bajas subterapéuticas (Hughes y Heritage, 2004). fueron descubiertos en la década de 1940 en pollos alimentados con subproductos fermentados de las tetraciclinas mostrando un crecimiento más acelerado en comparación con los que no fueron alimentados con estos productos (Stokstad *et al.*, 1949). A partir de entonces los mecanismos de resistencia generados por determinados microorganismos han sido variados, desde bombas de flujo que disminuyen la concentración del antibiótico en el interior de la bacteria, hasta modificaciones y cambios en la molécula blanco, sitio al cual se une el antibiótico, además de presentar mecanismos variados de resistencia en la membrana plasmática, que no permiten el paso del antibiótico y la creación de enzimas que lo hidrolizan volviéndolo inactivo. Estos mecanismos de resistencia han dado origen a infecciones por bacterias resistentes para los cuales no hay antibióticos totalmente efectivos (Muñoz *et al.*, 2004), debido al uso indiscriminado en el sector pecuario de estas sustancias, que han contribuido a la resistencia bacteriana, generando un problema global prevalente en países en desarrollo donde las enfermedades infecciosas siguen siendo un problema común,

y la sustitución de estas sustancias por los de nueva generación implican altos costos para la producción animal (Hao Van *et al.*, 2011). Los antibióticos promotores del crecimiento (APC), también denominados "modificadores digestivos", han tenido una reducción drástica en su autorización, debido a la resistencia microbiana generada por estas sustancias empleadas principalmente en poblaciones pecuarias y acuícola, además de su acumulación derivada en productos de origen animal para consumo humano (Brizuela *et al.*, 2009). Sin embargo, a pesar de las restricciones implementadas para minimizar el uso de estas sustancias, no ha sido totalmente efectivo ya que el uso de antibióticos en la alimentación animal se ha convertido en una tendencia mundial dada la necesidad de producir alimentos para la población (Tasho y Cho, 2016), y en donde se pueden mencionar más de 150 antibióticos que son usados actualmente, de los cuales más del 90 % son productos naturales de bacterias, hongos y modificaciones sintéticas de componentes naturales (Nussbaum, 2006). En estudios realizados se estima que 65,151 toneladas de antimicrobianos fueron consumidos por animales de abasto en 2010 en todo el mundo, para el 2030 un alarmante aumento del 67%, alrededor de 63,151 ± 1,560 toneladas más, esperándose un total de 105,596 ± 3,605 toneladas (Van Boeckel *et al.*, 2015). Se considera que el uso de los antibióticos en la crianza animal para terapias, prevención y promover el crecimiento animal ha sido el responsable para la emergencia de novó, selección y diseminación de la resistencia bacteriana ya que los agentes antimicrobianos utilizados han actuado no solo contra las bacterias patógenas, sino también contra las bacterias comensales que son parte de la microbiota intestinal en animales y humanos (Knezevis y Petrovic, 2008): *E. coli* y *Salmonella* spp. son responsables de una gran cantidad de infecciones entéricas alrededor del mundo, afectando en gran medida a humanos y animales (Gross 1994), debido al uso de agentes terapéuticos, como promotores del crecimiento, que son una de las causas de multiresistencia microbiana a los antibióticos: en las familias del cotrimoxazol y las fluoroquinolonas se ha detectado este efecto frente a cepas patógenas de *E. coli* y *Salmonella* spp. (Blanco *et al.*, 1997). Es por ello que

el empleo de aditivos alimentarios como una opción a los antibióticos juega un papel esencial, desde el punto de vista económico y sanitario en la producción animal moderna, lo que se traduce tanto al beneficio de los productores como al consumidor, además de una reducción en el uso de antimicrobianos, por lo cual el uso de lactobacilos, enzimas y levaduras como *S. cerevisiae* son una opción frente al uso de antibióticos (Brizuela *et al.*, 2009).

### **2.1.2. Lactobacillus**

Las bacterias del género *Lactobacillus* pertenecen al grupo de las bacterias ácido lácticas, ampliamente definido y caracterizado por la formación de ácido láctico como el producto final y principal del metabolismo de los carbohidratos. Se le puede encontrar en plantas o materia de origen vegetal, ensilados, alimentos fermentados (yogurt, quesos), encurtidos, embutidos, así como en cavidad oral, gastrointestinal y en la vagina de animales y humanos (Hammes y Vogel, 1995). Constituyendo una parte importante de la microflora autóctona del hombre y en un gran número de animales. Su distribución está afectada por condiciones ambientales, como el pH, disponibilidad de oxígeno, nivel de sustrato específico, interacción bacteriana, raramente se le ha asociado con casos de infección gastrointestinal y extra intestinal, las cepas utilizadas tecnológicamente son considerados como microorganismos no patógenos y seguros además de considerárseles como promotor de la salud especialmente en el tracto gastrointestinal y genital (Salminen *et al.*, 1996). El uso de estos microorganismos como estimulantes de la salud intestinal genera amplios beneficios en contra de agentes infecciosos, además de ser bacterias polifuncionales con implicaciones importantes en la industria (García *et al.*, 2007). No obstante, la expresión de estos efectos es un fenómeno complejo que se encuentra bajo la influencia de diferentes factores, entre los que se pueden citar: manejo animal, composición de la microbiota intestinal del hospedero, régimen de dosis, edad, tipo de animal, preparación y tecnología de producción del probiótico, ya que la acción de *lactobacillus* puede diferir de acuerdo las condiciones

y el manejo del animal (Brizuela *et al.*, 2002). El uso de *Lactobacillus* muestra porcentajes de resistencia a algunos antibióticos principalmente a estreptomicina, eritromicina y ácido nalidíxico. El aislamiento y la identificación de *Lactobacillus* resistentes a los antibióticos proporcionan información útil dentro de la problemática mundial de la resistencia frente a los antimicrobianos, ya que se evidencia la presencia de estas en las cepas susceptibles. Evidenciando el tema de resistencia a antibióticos el cual se torna muy controvertido, ya que lo ideal es que las bacterias utilizadas como probiótico no deberían ser resistentes a antibióticos para que no se conviertan en un vehículo de transferencia de genes de resistencia, sin embargo, este tema no ha sido definido totalmente con relación a los requisitos mínimos que debe tener un probiótico según la OMS (Vanegas *et al.*, 2012).

### 2.1.3. Enzimas

Las enzimas son productos de origen biológico que catalizan las reacciones bioquímicas relacionadas con la vida celular y forman combinaciones químicas con uno o varios sustratos. Son proteínas de alto peso molecular (entre 10 000 y 500 000 Daltons), sensibles al ambiente físico-químico que puede modificar su actividad (Ferket, 1993), además de servir como catalizadores para un gran número de procesos metabólicos, actuar en procesos catalíticos, presentar una especificidad para sustratos y su esteroespecificidad que le permiten desempeñar funciones claves en otros procesos relacionados con la salud y el bienestar de los seres vivos. La esteroespecificidad absoluta de enzimas es en particular valiosa para su uso como catalizadores solubles o inmovilizados para reacciones específicas en la síntesis de un fármaco o antibiótico además de su importancia en la producción de alimentos o el aumento del valor nutricional de los mismos tanto para seres humanos como para animales (Kennelly *et al.*, 2010). En la alimentación animal se emplean con el objeto de complementar la acción de las enzimas que se producen en el aparato digestivo, así digiriéndose nutrimentos específicos que los animales no desdoblan eficientemente. A nivel comercial existen diferentes enzimas

alimenticias (amilolíticas, proteolíticas) para uso animal, de las cuales se han promovido las celulíticas para tratar alimentos fibrosos y destinarlos a los animales incapaces de digerir fibra, como los cerdos y las aves, con la intención de incrementar la biodisponibilidad de los nutrientes. Esto se logra principalmente por la digestión de los alimentos en el tracto digestivo, sin embargo, la acción de las enzimas también puede ocurrir antes de su ingestión por el animal, durante el procesamiento del alimento, así como en el transporte y almacenamiento en tolvas de alimentación previo a su consumo. Las enzimas procesadas en alimentos son comúnmente adicionadas con la intención de modificar los componentes del alimento antes de su preparación final, en el cual las enzimas son desnaturalizadas o destruidas para actuar como coadyuvantes en la alimentación animal (Pariza y Cook, 2009). Las enzimas de tipo exógenas como las carbohidrataza, presentan su efecto sobre la productividad de algunas especies pecuarias, el cual podría estar condicionado al tipo de sustrato presente en los alimentos, observándose grandes respuestas en dietas elaboradas con cereales de poca calidad y viscosos (centeno, cebada, trigo) y limitada en dietas elaboradas con cereales de alta calidad o poca viscosidad como lo es el sorgo y el maíz que son cereales utilizados en la elaboración de dietas (Elwinger y Teglof, 1991). La necesidad actual de utilizar granos como el maíz en la producción de combustibles y bio-combustibles, puede resultar en una mayor utilización de cereales viscosos, subproductos, granos procedentes de la industria de la destilería o ingredientes menos convencionales en alimentación animal, situación que motiva la investigación hacia la producción de enzimas para los distintos tipos de sustratos presentes en la producción animal (Choct, 2006). Sin embargo, la posibilidad ante posibles reacciones alérgicas por el consumo de enzimas puede estar presente aunque sea mínimo, en la alimentación animal y humana. Las reacciones alérgicas a las enzimas ocurren si las enzimas o fragmentos de la misma son lo suficientemente grandes como para producir una reacción alérgica, depositándose en el tracto GI, normalmente las proteínas enzimáticas exógenas pasan por completo en el tracto GI y se absorben como

aminoácidos libres o fragmentos de péptidos pequeños en la alimentación pecuaria (Webb *et al.*, 1992). Sin embargo, la necesidad actual demanda probiótico más integrales, seguros, con mayor alcance y más efectivos, para obtener resultados más potentes, que permitan obtener las mejores características productivas, profilácticas y terapéuticas de la salud animal, siendo *S. cerevisiae* un aditivo ideal que no produce ningún tipo de efecto adverso (Pérez, 2007).

## **2.2. *Saccharomyces cerevisiae***

Las levaduras vivas presentan propiedades fisicoquímicas muy diferentes entre cepas, las cuales les confiere propiedades metabólicas distintas a la salud animal. Las características de cada cepa son fundamentales en su selección ya que esto determina su efectividad en el proceso digestivo, productivo e inmunológico. Se ha observado que las levaduras vivas de *S. cerevisiae* inhiben el crecimiento de *E. coli* y *Salmonella* spp. debido a la pared celular de la levadura, ejerciendo un efecto secuestrante frente a estas bacterias patógenas, para posteriormente eliminarlas por las heces. Tiene un alto grado de adhesión a los diferentes tipos de bacterias intestinales, por lo que las levaduras pueden utilizarse como alternativas para la prevención y/o tratamiento de enfermedades relacionadas con estos agentes infecciosos. Además de constituir una importante fuente para la obtención de productos con actividad probiótica a partir de las cepas vivas o derivados de sus paredes celulares. Estos preparados manifiestan su actividad inmunoestimulante en animales de granja, así como mejoras en los procesos de la fisiología digestiva, contribuyendo a mejorar los resultados productivos al disminuir las poblaciones de bacterias patógenas del tracto digestivo animal, y minimizando las posibilidades de contaminación de los productos para consumo humano (Ventura, 2011).

*S. cerevisiae*, tiene la capacidad de sobrevivir en medios adversos (amplio rango de pH, medios salinos, con o sin presencia de oxígeno). Es uno de los aditivos más usados a nivel mundial, considerado dentro de los organismos unicelulares de tipo levadura que pertenece al reino Fungí y al Filo Ascomycota, con células ovoides u

elípticas, sin motilidad, que son capaces de llevar a cabo procesos de fermentación propiedad que se ha explotado principalmente para la alimentación (Newbold *et al.*, 1996). Tiene una amplia gama de acciones en la salud animal y humana como probiótico, ejerciendo su actividad contra determinados microorganismos patógenos del sistema digestivo estimulante del crecimiento para diferentes especies del sector pecuario, es por ello que ha sido utilizada durante décadas como un agente preventivo y terapéutico para la diarrea y otros desordenes gastrointestinales que afectan al hombre y los diferentes animales (rumiantes y monogástricos). Al ser un microorganismo eucariótico, y poseer propiedades completamente diferentes a las bacterias, es resistente a los antibióticos, sulfamidas y otros agentes antibacterianos. Esta resistencia es natural y genéticamente no es susceptible a ser modificada o transmitida a otros microorganismos además de que *S. cerevisiae* es industrialmente importante debido a su habilidad para convertir azúcares (glucosa, maltosa) en etanol y dióxido de carbono (pasteles, cerveza destilería, las industrias de combustibles líquidos) además de poseer el estatus GRAS (Generalmente Reconocidos como Seguros) de la administración de Alimentos y Fármacos de Estados Unidos (Auclair, 2001). En algunos trabajos de investigación se ha demostrado que pueden actuar como un inmunoestimulador e inmunoregulador incrementando la resistencia inespecífica en contra de un gran número de bacterias Gram negativas que afectan el tracto respiratorio y digestivo en animales de abasto. En condiciones normales la levadura no puede colonizar el tracto digestivo, pero una parte significativa de las levaduras ingeridas pueden ser encontradas vivas en las heces de los animales, esta es la más importante diferencia con otros probióticos como las bacterias ácido lácticas en las que su efecto biológico está estrechamente relacionado con su adhesión a la mucosa intestinal, en cambio *S. cerevisiae* adhiere las bacterias a su pared celular para posteriormente ser eliminarlas en las heces (Ouwehand *et al.*, 1999).

De ahí que las mejoras observadas en la productividad y en salud de los animales que consumen levaduras se asocia a los efectos de tipo directo e indirecto,

relacionado al tipo nutricional, y en concreto al efecto de los nutrientes presentes en las células de levadura como proteínas, minerales, vitaminas, aminoácidos y péptidos, que pueden llegar a ser utilizados. Además de la capacidad que presenta la levadura para producir numerosas enzimas (proteasas, peptidasas, invertasas, hidrolasas, maltasas, fosfatasas, galactosidasas) algunas de las cuales se liberan en el intestino reforzando la acción de las enzimas endógenas, facilitando la digestión de la materia seca del alimento en rumiantes y monogástricos (Cuaron, 2000).

### **2.2.1. Uso de *S. cerevisiae* en la alimentación animal y humana**

*S. cerevisiae* es la levadura más importante en la humanidad ya que desde hace miles de años se ha utilizado para la elaboración de pan y bebidas alcohólicas por fermentación, además de ser uno de los organismos eucariotas más estudiados como modelos a nivel de su biología molecular y celular, constituyendo una importante fuente para la obtención de productos con actividad probiótica. Presentan diferentes polisacáridos de elevado peso molecular que se encuentran en forma natural en la pared celular de diversos organismos vivos como bacterias, levaduras, hongos y plantas (cereales como avena y cebada), actualmente son utilizados por las empresas de alimentos como agentes texturizantes entre otros usos. Además, antecedentes científicos sugieren que, dependiendo de su estructura fisicoquímica y de su origen, su consumo se asociaría a efectos beneficiosos para la salud humana a través de la disminución de la concentración plasmática de colesterol total y la reducción del índice glicémico en el consumo de los alimentos que incluye a la levadura. (Pizarro *et al.*, 2014). Ha tenido un amplio uso para el hombre en la producción de alimentos, químicos, combustibles, además ha sido pieza clave en el área de la biología eucariota debido a que conserva ciertas propiedades de las células de organismos más complejos como las del humano (Österlund *et al.*, 2012).

En la producción animal manifiesta una marcada actividad inmunoestimulante, al ser utilizado mejorando los procesos de la fisiología digestiva y contribuyendo a la obtención de mejores resultados productivos, presentando una serie de efectos específicos como los de efecto antísecretor y trófico que no se encuentran en los agentes bacterianos y han tenido básicamente aplicaciones terapéuticas (Schrezenmeir y Vrese, 2001). En nutrición animal, la levadura viva y las estructuras presentes en la pared celular contribuyen a la absorción de micotoxinas, a la estimulación de la ganancia de peso, a la adhesión de bacterias entéricas a sus paredes celulares (Yiannikouris *et al.*, 2004), propiciando una comprobada actividad, como inmunoestimulante así como amplios benéfico para la salud animal y observándose una resistencia ante infecciones entéricas, y efectos anticancerígenos (Chen y Seviour, 2007).

### **2.2.2. Características de la pared celular de *S. cerevisiae* y su efecto frente a bacterias Gram negativas.**

La pared celular de *S. cerevisiae* cumple actividades importantes para su adecuado funcionamiento, entre ellas la estabilización de las condiciones osmóticas internas, la protección contra el estrés físico, mantenimiento de la forma celular, factores que le permiten controlar la osmolaridad del citoplasma, que es más alto que en la parte externa de las células, manteniendo la homeostasis y el desarrollo de una capa protectora a la pared para conferirle a la levadura una combinación de resistencia a presiones mecánicas y una alta elasticidad (Koch, 2003; Morris *et al.*, 1986). Las células de la levadura pueden crecer como células ovas, o de forma más elongada durante situaciones de estrés o ante alguna limitación, comúnmente de nitrógeno, afectando a los polisacáridos presentes que le confieren resistencia a la pared celular de la levadura, y que le permiten un soporte para la capa externa de las glicoproteínas (Osumi, 1998; Tokunaga *et al.*, 1986; Zlotnik *et al.*, 1984), contrariamente la capa interna está constituida de varios espacios, formados por la quitina unida a  $\beta$ -glucanos, el cual juega un papel importante en la morfología y

formación de células durante el ciclo celular, teniendo la función de formar la cicatriz durante la separación de la célula madre e hija (gemación), encontrándose la mayor concentración en la formación de la gema (Fleet, 1991; Lipke y Ovalle, 1998). La quitina y los  $\beta$ -glucanos se han descrito como estimulantes del sistema inmune en mamíferos y peces, propiciando la respuesta inmune celular y humoral (Whittington *et al.*, 2005). Son polímeros de la pared celular estructural de una gran variedad de hongos, y con una actividad inmunomoduladora. El beneficio terapéutico asociado con estos compuestos, es como agentes anti-infecciosos y en menor medida como antitumoral, siendo objeto de gran cantidad de investigaciones publicadas en las últimas cinco décadas, estando poco claro cómo estos hidratos de carbono median sus efectos inmunológicos (Brown y Gordon, 2003).

La estructura externa cuenta con una compleja interacción de polisacáridos, dentro de los cuales los  $\beta$ -glucanos(1,3) están unidos en cadenas lineales alrededor de 1500 unidades de glucosa unidas en  $\beta$ -(1,3),  $\beta$ -(1-6) componentes de glucanos de 140-350 residuos de glucosa unidos por  $\beta$ -(1,6) de vinculación, mananos que comprenden unidades de manosas con enlaces en  $\alpha$ -(1,2);  $\alpha$ -(1,3);  $\alpha$ -(1,6) y quitina, un polímero de 100-90 unidades de N-acetylglucosamina unidas por  $\beta$ -(1,4) de vinculación (Schiaivone *et al.*,2014), convirtiendo a *S. cerevisiae* en una de las fuentes más importantes de glucanos (Sirimanapong *et al.*, 2015), y contribuyen en gran medida a un efecto inmunomodulador en caso de riesgo de infecciones secundarias o sepsis. Investigaciones indican que proporcionan un refuerzo controlado y no patógeno de la reacción de defensa propia del cuerpo. Un concepto que nos indica acerca de los mecanismos de acción presupone una unión de los (1-3),(1-6)- $\beta$ -D-glucanos a los receptores que existen en la superficie celular, para reconocer estructuras microbianas en presencia de las mananoproteínas que se encuentran ubicadas en la capa externa o ancladas a la capa interna de los  $\beta$ -glucanos o bien la atraviesan completamente y son las responsables de la porosidad de la pared, desempeñando un papel importante como filtro selectivo y de

protección contra los ataques químicos y enzimáticos de tipo glucanasa, que degradan a los B-glucanos (Cid *et al.*, 1995; Nguyen *et al.*, 1998; Zlotnik *et al.*, 1984). Es por ello que a partir de la pared celular de esta levadura se han obtenido estos glucanos, mananoproteica y quitinas que actúan como inmunoestimulantes naturales y promotores del crecimiento animal (Esteban *et al.*, 2004). Además de intervenir en la arquitectura molecular de la pared celular la cual se remodela constantemente de acuerdo a las condiciones de crecimiento o en respuesta a estado de estrés, estos procesos de remodelación se dan por las vías de señalización que transmiten los sensores de la superficie celular a un MAP cascada quinasa (Levin, 2011).

Los  $\beta$  1-3 glucano y manano proteínas, de la pared celular de la levadura realizan un papel muy activo en el incremento de la inmunidad no específica de los animales, ya que inhiben la colonización por patógenos entéricos como *E. coli* y *Salmonella* spp. además de tener un efecto absorbente frente a micotoxinas (Savage *et al.*, 1996; Stanley *et al.*, 1996; Acevedo y Pedroso, 1999). Éstos, son responsables de importantes efectos en la salud cuando se administran por vía oral tanto a humanos como animales desencadenando un potente efecto inmunomodulador y efectos radioprotectores, mielo proliferativos, antiinflamatorios, antitumorales y promover una mayor estimulación del sistema inmunitario innato contra las infecciones entéricas. Atribuyéndosele a el peso molecular, al grado y naturaleza de las ramificaciones como los principales motivos de sus efectos bioactivos y funcionales en la salud de animales y humanos (Pérez-Guisado, 2007). Estos polímeros presentan una exclusión competitiva, evitando la adhesión de los patógenos a las células epiteliales del intestino al bloquear las fimbrias de tipo 1 que poseen la mayoría de las bacterias Gram negativas, impidiéndole adherirse en la superficie epitelial y fijando a las bacterias por adsorción por medio de las fimbrias I, desencadenando un efecto aglutinante (Amabile De Campos *et al.*, 2005), en presencia de glicoproteínas bacterianas, bloqueando de este modo su implantación

sobre las membranas de la célula y estimulando su unión a la pared de *S. cerevisiae*, además de mantener una microbiota intestinal benéfica dominada por las bacterias que promueven la salud, como por ejemplo, las bifidobacterias (Castro y Rodríguez, 2005), estimulando el sistema inmune de los animales de forma indirecta y contribuyendo al incremento de inmunoglobulinas en el intestino, plasma sanguíneo e inhibir la absorción de micotoxinas (Brown y Gordon, 2001; Tzianabos y Cisneros, 1996), además de ser importante en la reducción de la profundidad de las criptas intestinales y generar un incremento en la relación al largo de las vellosidades con la profundidad de las mismas, en animales. Según los autores, es probable que dichos cambios, se deban a la capacidad de mejorar la micróflora intestinal y no a un efecto directo de *S. cerevisiae* sobre el tejido intestinal y en el cual se ve reflejada la capacidad de exclusión, de enterobacterias Gram negativas del tracto intestinal como lo es *E. coli* y *Salmonella* spp. (Savaget *et al.*, 1996).

## 2.2. Escherichia coli

Son bacilos rectos Gram negativos de tamaño medio (0.4-0.6 x 2-3  $\mu$ m), no formadores de esporas, móviles mediante flagelos peritricos o inmóviles. Es la especie predominante de la microflora normal aerobia y anaerobia facultativa del tubo digestivo, en la mayor parte de los mamíferos, y se eliminan por las heces, pudiéndoseles encontrar en el medio ambiente por su capacidad de sobrevivir durante cierto tiempo en el agua y los alimentos, de manera que su aislamiento es un indicador de contaminación fecal. Es considerado el patógeno oportunista más frecuente asociado a infecciones urinarias y septicémicas en humanos, mientras que en los animales domésticos las colibacilosis son muy frecuentes, afectando esencialmente a animales de pocos días de edad, ocasionando importantes pérdidas económicas en explotaciones intensivas (Blanco *et al.*, 2003). Su diferenciación se basa en tres antígenos de superficie, que permiten el serotipado de los antígenos O (somáticos), H (Flagelos), y K (cápsula). Hasta ahora se han identificado 174 antígenos O, 56 antígenos H, y 80 antígenos K, a pesar de que la

mayoría son comensales inofensivos, presentan diferentes serovariedades patógenas relacionadas con enfermedades diarreicas, las cuales se clasifican en grupos específicos según sus propiedades de virulencia, mecanismos de patogenicidad, síndromes clínicos, y serogrupos O:H, en las que se incluyen las cepas; Enteropatógenas (EPEC), enterotoxigénicas (ETEC), enteroinvasoras (EIEC), de adherencia difusa (DAEC), enteroagregantes (EAEC) y enterohemorrágicas (EHEC) (Doyle *et al.*, 2005). En la tabla 1 se muestran los serotipos que afectan a los animales de abasto y de compañía.

<b>Serotipos de <i>E. coli</i> diarreagénicas para los animales</b>			
<b>Porcinos</b>	<b>Rumiantes</b>	<b>Perros</b>	<b>Conejos</b>
<b>EHEC (y ECVT)</b>	<b>ETEC (Bovinos y ovinos)</b>	<b>ETEC</b>	<b>EPEC</b>
O8:K85:H2	O8:K25,K85,K208	O4	O2:H6
O8:K87	O9:K30,K35,K37	O5	O15:H-
O8:K201:H6,H9,H14	O20K?	O6	O20:H7
O8:K-H11	O64:K-	O8	O26:H11,H-
O8:K48:H31	O101:K27,K28,K30,K32	O17	O49:H2
O9:K103-H-	K103,K-	O20	O92:H2
O9:K?:H-		O23	O103:H2
O20:K101:H	<b>EHEC (bovinos)</b>	O25	O109:H2,H7
O45	O5:H-	O42:H37	O110:H6
O64:K-H-	O8:H8,H9	O70:H-	O119:H2
O101:K30:H9	O20:H19	O105	O126:H2,H-
O101:K-H9	O26:H11		O128:H2,H-
O101:K103	O103:H2	<b>EPEC</b>	O132:H2
O138:K81:H14,H-	O111:H8,H11,H-	O45	O153:H7
O139:K82:H1	O118:H16	O49:H10	
O141:K85:H4,H-	O145	O115	
O141:K87		O118:H-	
O147:K87		O119	

**Tabla 1:** Cepas con sus principales serotipos que afectan a los animales (Blanco *et al.*, 2003).

La bacteria se puede aislar e identificar tradicionalmente con base en sus características bioquímicas y serológicas, además de sus mecanismos de patogenicidad mediante ensayos en cultivos celulares o modelos animales y más recientemente, empleando técnicas de biología molecular que evidencian la presencia de genes involucrados (Rodríguez-Angeles, 2002).

### 2.3 *Salmonella* spp.

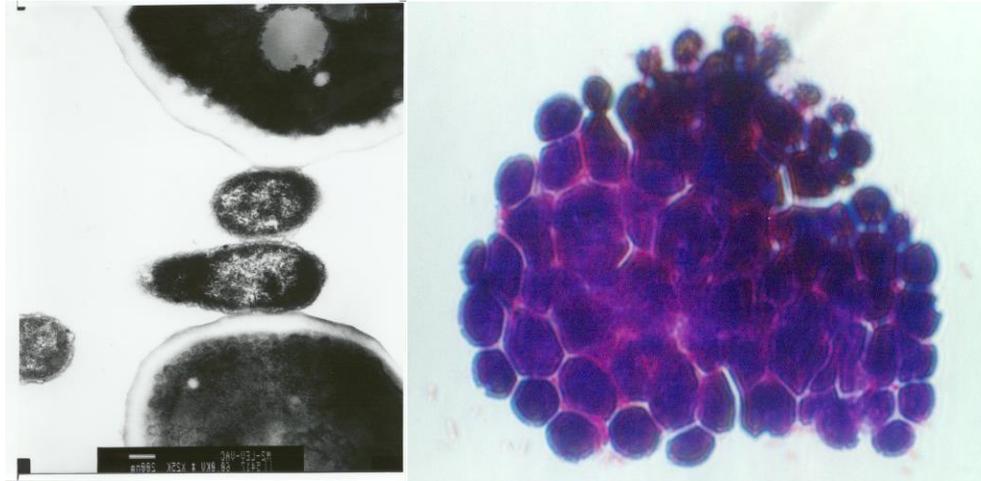
Es una bacteria ubicua, cuyo reservorio principal es el intestino de los animales homeotermos y poiquilotermos. Presenta una elevada capacidad de supervivencia en el medio externo (en condiciones adecuadas resiste semanas en el agua y años en el suelo), e infecta gran cantidad de animales que pueden permanecer como portadores durante largo tiempo, de ahí que la *Salmonella* spp. sea causante de procesos infecciosos en una amplia variedad de vertebrados, en los que su transmisión es la fecal/oral, aunque también puede transmitirse por la mucosa conjuntival de las vías respiratorias superiores y heridas (Goyache y Briones, 2003). Normalmente invade la mucosa intestinal y se multiplica en los órganos asociados al intestino, a partir del área infectada los patógenos pasan a los nódulos linfáticos regionales, donde los macrófagos presentes en el tejido linfático actúan como una primera barrera para evitar la diseminación. Si este mecanismo de defensa limita la diseminación bacteriana, esta permanece localizada en el intestino por la asociación entre las fimbrias de *Salmonella* spp y su capacidad para aglutinar eritrocitos en presencia de hidratos de carbono y manosa en la interacción basada con lectina. (Duguid y Gillis, 1958). Posee los antígenos O (somáticos), H (Flagelos), y K (capsula) y el antígeno Vi el cual se encuentra en pocas serovariedades, incluye varios síndromes (gastroenteritis, fiebres entéricas, septicemia, infección focal y un estado de transmisor asintomático). Los serotipos muestran una predisposición a síndromes específicos (*S. typhi*, *S. paratyphi-A*, y *S. schottmuelleri* los cuales producen fiebre enterica, *S. choleraesuis* produce septicemia o infecciones focales, *S. typhimurium* y *S. enteritidis* produce gastroenteritis): Sin embargo, en ocasiones cualquier serotipo puede desencadenar los síndromes mencionados (Gianella, 1996).

## 2.4 Capacidad de *S. cerevisiae* para adherir a sus paredes celulares bacterias Gram negativas

El proceso de colonización del tracto digestivo por *E. coli* y *Salmonella* spp. se lleva a cabo por la presencia de un grupo de proteínas y glicoproteínas bacterianas de superficie denominadas “lectinas”. Las lectinas son glicoproteínas que se caracterizan por tener la capacidad de enlazarse de forma específica y reversible a carbohidratos de forma libre o que constituyen estructuras más complejas (Hernández *et al.*, 1999). Comúnmente las enterobacterias se unen a las manosas ubicadas en el exterior de las células intestinales del huésped, a través de los mecanismos de unión de las Fimbria Tipo 1 manosa-sensitiva presentes en numerosas cepas de *E. coli* y *Salmonella* spp. (Dvorak *et al.*, 1997 y Finucane *et al.*, 1999). Los mánanos presentes en la pared de *S. cerevisiae* actúan previniendo la adherencia de las lectinas bacterianas a los carbohidratos presentes en la superficie de las células intestinales, reduciendo la colonización del tracto digestivo de estos patógenos causantes de diarreas (Dilley *et al.*, 1997), esto debido a la capacidad de la levadura de *S. cerevisiae* elaborada industrialmente para aglutinar a bacterias potencialmente patógenas de *E. coli* y *Salmonella* spp. a sus paredes. Mecanismo por el cual los animales que consumen esta levadura presentan una mayor resistencia a estas infecciones que es documentado en investigaciones previas, en las que se evaluó la adherencia de 45 aislamientos de *Salmonella* spp. a la cepa de *S. cerevisiae* 47 mediante pruebas de aglutinación, sedimentación, y de microscopía óptica y electrónica. Los resultados obtenidos mostraron que el 57.7% (26/45) de los aislamientos de *Salmonella* spp. y el 66.6% (6/9) de sus serovares mostraron adherencia a la levadura en cuestión (Pérez-Sotelo *et al.*, 2005). Los polímeros presentes en la pared celular de *S. cerevisiae* son los responsables de la adhesión de patógenos a través de manosa específica, al bloquear la colonización de patógenos intestinales que contienen fimbrias tipo 1 con lectinas de unión a manosa (Kelly *et al.*, 1994). Las fimbrias de tipo I se expresan en más de 90% de cepas de *E. coli* y *Salmonella* spp. entre otras bacterias entéricas, y controlan la adhesión a

oligosacáridos *N-linked* con residuos de manosilo terminales expuestos. Las propiedades de adhesión de las fimbrias tipo I están determinadas por fimbrias asociadas a las lectinas con afinidad por las manosas (30 kDa) (Sokurenko, 1995). Estas impiden la unión a determinados carbohidratos de superficie localizados en las células epiteliales de la mucosa digestiva, para fijarse y colonizarla (Sharon y Lis 1993), inhibiendo el proceso de adhesión de las bacterias al epitelio en la etapa temprana de la infección sobre las membranas ya que contrariamente las moléculas de adhesión presentes en la superficie interactuaran de forma estero específica con las membranas de la célula huésped de una manera análoga antígeno-anticuerpo, en el que la adhesina fimbrial se unirá a los residuos de manosa en las membranas celulares epiteliales (Ofek *et al.*, 1977). Iniciándose la patogénesis bacteriana como resultado de un proceso multifactorial que dependerá del estado inmune del hospedero, la naturaleza de la especie bacteriana, los factores de virulencia y el número de organismos en la exposición inicial, ya que un número limitado de bacterias son comúnmente responsable de la mayoría de enfermedades infecciosas en animales ante situaciones de estrés. La adherencia implica interacciones entre los componentes externos de la célula bacteriana (adhesinas) y la célula del hospedero (receptores). *E. coli* posee varios tipos diferentes de adhesinas, las fimbrias tipo-1, que se unen a los receptores de las células intestinales (Stordeur, 2002), *Salmonella* spp. antes de invadir cualquier tipo de célula, debe encontrar y adherirse a uno o más tipos de células del tejido intestinal. Algunos mecanismos de adhesión pueden involucrar varios tipos de fimbrias o pili, cuatro de los cuales están definidos genéticamente: fimbria tipo 1, fimbria codificada por plásmidos (pef), fimbria polar larga (lpf) y fimbria agregativa delgada (agf/csg). Ayudando a la bacteria a conseguir contacto cerrado con las células hospederas y además a permitir la interacción de factores que estimulan la migración transepitelial de neutrófilos. La presencia de por lo menos estos cuatro sistemas fimbriales sugiere que la adhesión a superficies celulares y no celulares puede ser un paso crítico en

la supervivencia de *E. coli* y *Salmonella* spp. en el medio ambiente, ya que ésta responde a factores del medio como pH y osmolaridad (Darwin y Miller, 1999).

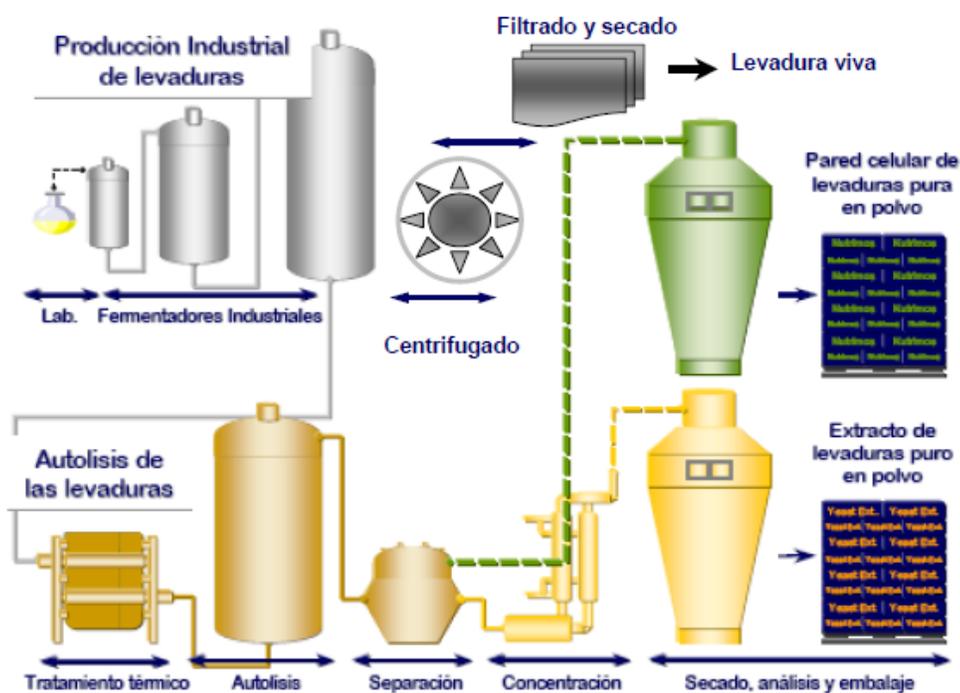


**Figura 1.** (A) *S. cerevisiae* 47 aglutinando a *S. typhimurium* ATCC 14028. Micrografía Electronica. (B) Aglutinación de *S. cerevisiae* 47 frente a *E. coli*. (aislado patógeno de campo) Tinción de Gram. Tomado de Pérez-Sotelo 2012.

## 2.5 Producción industrial de la levadura

De forma industrial, cultivos puros de la levadura son producidos específicamente para su uso en la industria cervecera, vitivinícola, destilería, panadería, doméstico y pecuario. En la industria alimenticia, las formas activas de levadura más predominante son: en primer lugar, levadura deshidratada con un 95% de materia seca (MS), en segundo lugar, torta de levadura húmeda con un 30% MS; y en tercer lugar, levadura en forma de crema con 18 a 20% de MS. Dentro de los principales procesos de fabricación de levaduras, se incluyen las siguientes pasos: 1) selección, aislamiento y multiplicación celular de los inóculos de levadura a nivel de laboratorio; 2) propagación de la cepa de levadura en el laboratorio, realizada con la finalidad de aumentar la cantidad del producto o inóculo industrial; 3) propagación industrial, se emplean bioreactores o fermentadores aeróbicos de 15 a 200 m<sup>3</sup> en donde el objetivo es proveerlos de nutrientes (oxígeno, nitrógeno, carbohidratos, condiciones

adecuadas de temperatura y pH para la multiplicación de la levadura) ; 4) secado y deshidratado, cuando la concentración de levaduras es adecuada en los fermentadores el caldo de cultivo es centrifugado para formar una crema de levadura, posteriormente la crema se filtra para formar la torta de levadura que es secada a una temperatura adecuada para no destruir su capacidad fermentativa (Oriol, 2004; Dan-Lfa, 2005; Stone, 2006; citado por Morales, 2007).



**Figura 2:** Procedimiento de la producción industrial de levaduras y paredes celulares de *Saccharomyces cerevisiae*. Tomado de Dan-Lfa, 2005; citado por Morales 2007).

### III. Justificación

La demanda exponencial de alimentos de origen animal, conlleva a sistemas de explotación intensiva en la producción pecuaria y acuícola. Los cuales afrontan una mayor incidencia a determinadas infecciones, propiciando el uso de antibióticos como medidas profilácticas y como promotores del crecimiento, lo cual ha contribuido a generar una resistencia bacteriana a muchos antibióticos que producen infecciones entéricas de difícil tratamiento. La capacidad de *S. cerevisiae* para aglutinar enterobacterias, así como para potenciar la respuesta del sistema inmune contra infecciones producidas por esas bacterias y estimular el crecimiento animal, la colocan como una alternativa segura y eficiente como probiótico en sustitución de antibióticos y aditivos (enzimas, lactobacillus) comúnmente empleados en alimentación animal. El uso de *S. cerevisiae* genera un beneficio en la producción y sanidad animal reduciendo la incidencia y mortalidad por infecciones entéricas y contribuyendo a una reducir la resistencia bacteriana a los antibióticos activa y pasiva en animales y humanos.

*S. cerevisiae* se ha utilizado como probiótico para contribuir a mejorar la salud intestinal, esto se debe en parte a su capacidad de adherir a sus paredes celulares bacterias patógenas como *E. coli* y *Salmonella* spp. Una forma indirecta de medir la capacidad de una determinada cepa o una preparación de *S. cerevisiae* en sus efectos sobre la flora intestinal es su capacidad de aglutinar *in-vitro* diversas cepas de *E. coli* y *Salmonella* spp. Se ha observado que diferentes cepas de *S. cerevisiae* tienen diferentes capacidades de aglutinación bacteriana y se cree que esta capacidad depende principalmente del genotipo de la levadura. Sin embargo, el proceso de secado industrial de levaduras genera estrés sobre las mismas y posiblemente sobre la composición de sus paredes, ya que éstas son sometidas a cambios de temperatura y humedad. El secado o deshidratado permiten mantener a la levadura en estado de latencia y que al ponerla en condiciones adecuadas de cultivo se activa. Existen varios métodos de secado como el secado en *spray*, el secado en tambor secado en frío, estos procesos de secado exponen a la levadura

a diferentes condiciones ambientales, y estas podrían afectar las paredes de las mismas ya sea por exceso de calor o una deshidratación subóptima. Dado que el proceso podría estar afectando la calidad e integridad de la pared celular, es relevante conocer si diferentes tipos de deshidratación pueden afectar la capacidad de la levadura de aglutinar a bacterias *in-vitro* como indicador de la calidad de la levadura como probiótico. Por lo que en este trabajo se pretende evaluar la influencia de dos tipos de deshidratación: en *Spray* y en Tambor sobre *S. cerevisiae* (cepa L11) y su efecto en la capacidad de aglutinar *in vitro* aislados de campo de *E. coli* y *Salmonella* spp.

#### **IV. Hipótesis**

El efecto del proceso de secado industrial en *spray* de *Saccharomyces cerevisiae* L11 favorece su capacidad de aglutinación frente a cepas de campo de *Escherichia coli* y *Salmonella* spp. en comparación con el proceso de secado industrial en tambor.

## V. Objetivos

### Objetivo general

Determinar el efecto del proceso industrial de deshidratación (Tambor o *Spray*) de una cepa *Saccharomyces cerevisiae* (L11) sobre su capacidad de aglutinar cepas de campo de *Escherichia coli* y *Salmonella* spp.

### Objetivos específicos

- Determinar la capacidad de aglutinación sobre aislamientos de campo de *Salmonella* spp. a partir de un preparado industrial de *S. cerevisiae* L11 obtenido por deshidratación en tambor.
- Determinar la capacidad de aglutinación sobre aislamientos de campo de *E. coli* a partir de un preparado industrial de *S. cerevisiae* L11 obtenido por deshidratación en tambor.
- Determinar la capacidad de aglutinación sobre aislamientos de campo de *Salmonella* spp. a partir de un preparado industrial de *S. cerevisiae* L11 obtenido por deshidratación en *spray*.
- Determinar la capacidad de aglutinación sobre aislamientos de campo de *E. coli* a partir de un preparado industrial de *S. cerevisiae* L11 obtenido por deshidratación en *spray*.

## VI. Material

### Material Biológico

Dos preparados de levadura viva de *Saccharomyces cerevisiae* cepa L11 (Phileo, Lesafre, Toluca, México).

Diez Cepas de *E. coli* (Aislados Campo, CIESA. Donados por el Dr Jorge Varela Guerrero)

Ochenta y cinco cepas de *Salmonella* spp. (Aislados Campo, CIESA. Donados por el Dr Jorge Varela Guerrero)

### Material de Laboratorio

Medio de infusión cerebro corazón (BIOXON)

Solución PBS

Tubos de 50 ml

Tubos eppendorf

Tubos de 15 ml

Puntas

Pipetas

Placa para aglutinación de vidrio

Ambietrol

Cloro

Guantes de nitrilo

Toallitas desechables

Gradillas

Atomizador

Mortero

Bascula digital

Bata

Mechero de gas

Equipo de laboratorio

Autoclave

Estufa de incubación bacteriológica

Material de Escritorio

Computadora

Libreta

Lapicero

## VII. Métodos

De las cepas donadas por el Dr. Jorge Varela Guerrero y Dr. Martín Talavera Rojas se realizó el resembrado bacteriano: para *Salmonella* spp. se utilizó el medio verde brillante y en el caso de *E. coli*, Mc conkey.

Se pesaron 37 gr de agar infusión cerebro corazón (BHI) en una balanza analítica y se colocó en un matrás Erlenmeyer de un litro, con agua destilada hasta homogenizar totalmente, y colocarse en el autoclave a 121°C, a 15 libras de presión por 20 minutos para esterilizar y seguidamente colocar 20 ml en 95 tubos de 50 ml de forma aséptica, se colocaron en una gradilla y se llevaron a la estufa de incubación bacteriológica por 16 hrs a 37°C para prueba de esterilidad. Comprobado este procedimiento se inicio con el sembrado de *E. coli* y *Salmonella* spp. utilizando una asa bacteriológica para las muestra de cada cepa, y se sembraron de manera individual en los tubos de 50 mL de manera aséptica (frente a un mechero), las bacterias se inocularon en la estufa de cultivo a 37° C por 16 horas.

### 7.1. Prueba de la aglutinación de la levadura

Se realizó el experimento doble ciego: al momento del ensayo, no se conocía el tipo de secado que tenía cada muestra de levadura y tampoco se conocía que levadura se estaba utilizando para aglutinar a cada aislado bacteriano. Se utilizarón 8 preparados de *S. cerevisiae* cepa L11 identificados cada uno con una clave distinta, donde cuatro preparados correspondieron a un tipo de secado, y cuatro mas correspondieron a otro tipo de secado de la levadura.

Se realizó la prueba de aglutinación de la levadura frente a 85 cepas de *Salmonella* spp. de los siguientes 15 serotipos (*typhimurium*, *Typhi*, *Gallinarum*, *Bmonofásica*, *C1 monofásica*, *agona*, *london*, *anatum*, *bredeney*, *tennesse*, *enteritidis*, *infantis*, *senftenberg*, *Reading* y *Typhimurium ATCC 14028*) y siete aislados de campo no tipificados provenientes de canales de ganado bovino, porcino y pollo de engorda, y 10 cepas no caracterizadas de *E. coli* provenientes de utensilios usados en rastros para la matanza animal y procesamiento de cárnicos. La capacidad del *S. cerevisiae*

L11 de aglutinar a las bacterias se evaluó en una escala de; 0 a 3; donde 3, aglutinación muy buena; 2, aglutinación media; 1, aglutinación baja; 0, aglutinación no perceptible.

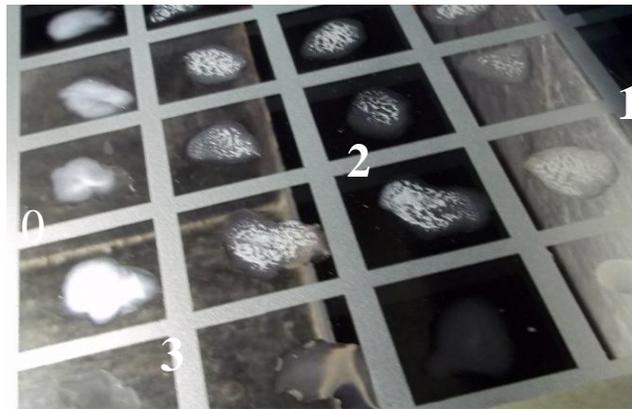


**Figura 3.** Preparados de levadura

## **7.2. Preparación del *Saccharomyces cerevisiae***

Se pesaron 10 mg de cada muestra de *S. cerevisiae* en una balanza analítica y con ayuda de un mortero se molio la levadura, incorporándose posteriormente a tubos de 15 mL con 10 mL de PBS y agitando por 5 minutos. Se repitió este procedimiento con las 8 muestras de la levadura.

Se agregaron 50 microlitros de bacterias, más 50 microlitros de la levadura en los cuadros de la placa de aglutinación, se mantuvo por 3 minutos, y se observó el grado de aglutinación, se midió su intensidad y la formación de grumos, por medio de apreciación visual en un negatoscopio. Como control se utilizaron los preparos de levadura con PBS sin mezclarse con las bacterias. Los resultados se recopilaron y documentaron en una página de excel. Los cuales se analizaron con la prueba no paramétrica Kruskal– Wallis (McDonald, 2009).



**Figura 4:** Intensidad de aglutinación de *S. cerevisiae* L11 frente a cepas de campo de *Salmonella*.

### **VIII. Límite de espacio**

La investigación se llevó a cabo en el Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma del Estado de México.

## **IX. Límite de tiempo**

La investigación comprendió los meses de Julio de 2016 a Mayo de 2017 en el Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal (CIESA).

## X. Resultados

Se compararon dos tipos de secado industrial (en Tambor y en *Spray*) de *S. cerevisiae* L11. Los dos preparados presentaron capacidad de aglutinación, pero no de la misma intensidad, en la tabla 2 se muestra el grado de aglutinación y la cantidad de los mismos, por *Saccharmyces cerevisiae* (cepa L11) sometido a dos tratamientos de secado (Tambor o *Spray*) con cuatro repeticiones para cada aislado pudiéndose observar diferencias.

Serotipos	Origen del aislado	Secado en tambor.						Secado en <i>spray</i>				
		No. de aislados por serovar	Número de aglutinaciones por escala de aglutinación (0-3)				Promedios	Número de aglutinaciones por escala de aglutinación (0-3)				Promedios
			0	1	2	3		0	1	2	3	
<i>S. typhimurium</i> *		1	0	2	2	0	1.50	0	0	1	3	2.75
<i>S. typhimurium</i>	Bovinos	7	13	4	3	8	1.21	7	3	5	13	1.85
	Ave	7	11	3	9	5	1.28	8	11	1	8	1.32
	Porcino	17	12	19	12	25	1.77	5	7	11	45	2.41
<i>S. typhi</i>	Bovinos	3	4	1	3	4	1.58	1	5	5	1	1.50
<i>S. gallinarum</i>	Ave	1	4	0	0	0	0	2	1	0	1	1
<i>S. bmonofasica</i>	Porcino	2	2	2	1	3	1.62	3	0	3	2	1.5
<i>S. agona</i>	Porcino	4	3	5	3	5	1.62	2	3	3	8	2.06
<i>S. anatum</i>	Porcino	4	3	1	1	11	2.25	0	3	0	13	2.62
<i>S. bredeney</i>	Porcino	5	4	1	5	10	2.05	3	1	2	14	2.35
<i>S. london</i>	Porcino	13	0	1	12	39	2.73	0	1	4	47	2.88
<i>S. infantis</i>	Porcino	3	4	2	2	4	1.50	3	3	2	4	1.58
<i>S. senftenberg</i>	Porcino	4	0	1	5	10	2.56	1	1	1	13	2.62
<i>S. enteritidis</i>	Porcino	1	3	1	0	0	0.25	2	0	1	1	1.25
<i>S. temesse</i>	Porcino	1	4	0	0	0	0	3	1	0	0	0.25
<i>S. CI monofasica</i>	Porcino	1	0	0	3	1	2.25	0	0	0	4	3
<i>S. reading</i>	Porcino	1	0	0	2	2	2.5	0	0	2	2	2.5
<i>no tipificada</i>	Bovinos	2	3	1	3	1	1.25	1	0	4	3	2.12
	porcino	1	1	1	1	1	1	0	0	0	4	3
<i>Salmonella</i> no caracterizada		7	0	2	17	9	2.32	0	0	4	24	2.85
<b>TOTAL</b>		<b>85</b>	71	47	84	138	<b>1.85</b>	41	40	49	210	<b>2.25</b>
<i>E. coli</i>												
No caracterizadas	Utencilios de trabajo en rastro	10	0	0	4	36	2.9	0	0	0	40	3

**Tabla 2. Comparación de la capacidad de aglutinación de bacterias coliformes (85 serotipos de *Salmonella* y 10 aislados de *E. coli*), por *Saccharmyces cerevisiae* (cepa L11) sometido a dos tratamientos de secado (Tambor o *Spray*) y cuatro repeticiones para cada aislado.** Los resultados obtenidos para cada tratamiento de *S. cerevisiae* (Sc) se condensaron de modo que para cada serovar de *Salmonella* o aislado de *E. coli* existen cuatro ensayos de aglutinación. En la tabla se puede observar el número de pruebas que se realizó y el total obtenido para cada tratamiento de Sc con respecto al número de serovares de *Salmonella* spp o aislados de *E. coli*. La intensidad de la aglutinación se califico en una escala de 0 a 3 donde; 0, aglutinación no perceptible; 1, aglutinación baja; 2, aglutinación media; 3, aglutinación alta.

\* *S. typhimurium* ATCC 14028

En la Tabla 3 se muestran a los serotipos de *Salmonella* spp. frente a tres diferentes especies domesticas (Porcinos, Bovinos, Aves), en el cual se observa la cantidad de aglutinaciones con respecto al total de repeticiones, así como su porcentaje de aglutinación. Cabe mencionar que el secado en tambor presentó una menor capacidad de aglutinación en las diferentes especies animales, mientras que para el secado en *spray* los serotipos provenientes de porcinos presentaron una mayor afinidad a la aglutinación seguidas de bovinos y aves.

Secado en tambor.				Secado en <i>spray</i>			
Serotipo	Origen del aislado	Aglutinaciones		Serotipo	Origen del aislado	Aglutinaciones	
		+	%			+	%
<i>S. london</i>	Porcino	52/52.	100	<i>S. london</i>	Porcino	52/52.	100
<i>S. C1 monofasica</i>	Porcino	4/4.	100	<i>S. C1 monofasica</i>	Porcino	4/4.	100
<i>S. reading</i>	Porcino	4/4.	100	<i>S. reading</i>	Porcino	4/4.	100
<i>S. senftenberg</i>	Porcino	16/16	100	No tipificada	porcino	4/4.	100
<i>S. typhimurium</i>	Porcino	56/68.	82.35	<i>S. anatum</i>	Porcino	16/16.	100
<i>S. agona</i>	Porcino	13/16.	81.25	<i>S. senftenberg</i>	Porcino	15/16.	93.75
<i>S. anatum</i>	Porcino	13/16.	81.25	<i>S. typhimurium</i>	Porcino	63/68.	92.64
<i>S. bredeney</i>	Porcino	16/20.	80	<i>S. infantis</i>	Porcino	11/12.	91.66
<i>S. bmonofasica</i>	Porcino	6/8.	75	<i>S. agona</i>	Porcino	14/16.	87.5
<i>no tipificable</i>	Porcino	3/4.	75	<i>S. bredeney</i>	Porcino	17/20.	85
<i>S. infantis</i>	Porcino	8/12.	66.66	<i>S. bmonofasica</i>	Porcino	9/8.	75
<i>S enteritidis</i>	Porcino	1/4.	25	<i>S enteritidis</i>	Porcino	2/4.	50
<i>S. tennesse</i>	Porcino	0/4.	0	<i>S. tennesse</i>	Porcino	1/4.	25
<b>Total</b>		192/228	87.28			212/228	92.98
<i>S. typhi</i>	Bovinos	8/12.	66.66	<i>no tipificable</i>	Bovinos	7/8.	87.5
<i>no tipificable</i>	Bovinos	5/8.	62.5	<i>S. typhimurium</i>	Bovinos	21/28.	75
<i>S. typhimurium</i>	Bovinos	15/28.	53.57	<i>S. typhi</i>	Bovinos	5/8.	62.5
<b>Total</b>		28/48	58.33			33/44	75
<i>S. typhimurium</i>	Ave	17/28.	60.71	<i>S. typhimurium</i>	Ave	20/28.	71.42
<i>S. gallinarum</i>	Ave	0/4.	0	<i>S. gallinarum</i>	Ave	2/4.	50
<b>Total</b>		17/32	53.12			22/32	68.75
<b>Total global</b>		237/308	76.94			267/304	87.82

**Tabla 3. Capacidad de aglutinación de diferentes serotipos de *Salmonella* spp. procedentes de tres especies animales (Porcinos, bovinos y aves) , por la cepa L11 de *S. cerevisiae*, procesada por secado en**

**Tambor o por *Spray*.** Los valores de aglutinación representan 4 repeticiones de la misma, realizadas para cada serotipo con el *S. cerevisiae* cepa L11, desecadas de forma independiente, ya sea por Tambor o por *Spray*.

En la Tabla 4 se muestran los resultados analizados mediante la prueba de Kruskal-Wallis indicando que existen diferencias en la capacidad de aglutinación de las distintas cepas de *Salmonella* spp. y de las cepas no tipificadas de *E. coli* en los diferentes preparados de la levadura. El secado en *Spray* mostró una mayor capacidad de aglutinación ( $P < 0.0001$ ) con relación al secado en tambor y al control.

**Tabla 4. Aglutinación de 85 cepas de *Salmonella* y 10 de *E. coli* con dos tipos de secado frente a *Saccharomyces cerevisiae* L11**

Intensidad de aglutinación	Número de aglutinaciones por tipo de secado		
	Tambor	<i>Spray</i>	Control
0	71	41	95
1	45	40	0
2	86	48	0
3	173	247	0
Total de cepas	380	380	95
Promedio de rangos	428.80 <sup>a</sup>	508.33 <sup>a</sup>	103.50 <sup>b</sup>

Prueba de Kruskal –Wallis  $P < 0.0001$ . La diferencia de las literales indica la diferencia entre los secados

## XI. Discusión

Se ha sugerido que el uso de microorganismos susceptibles a emplearse como aditivos en la alimentación animal fueran especies o cepas vivas, capaces de adherirse a las células epiteliales y multiplicarse. Las levaduras han mostrado plena eficacia, gracias a su capacidad de atracción y no de colonización (Perez, 2008). *S. cerevisiae* L11 es un probiótico que ha sido usado en la alimentación animal porque se ha observado que favorece la ganancia de peso (Yuan *et al.*, 2015), funciona como un estimulante inespecífico al sistema inmunológico (Zanello *et al.*, 2011), y porque a nivel gastrointestinal se ha observado que puede aportar nutrientes, reducir los niveles de oxígeno para producir un ambiente anaerobio que favorece a la flora microbiana intestinal normal, y porque atrapa a determinados patógenos dada la afinidad de los mananos de la pared celular de la levadura con la fimbria de bacterias entéricas como *Salmonella* spp y *E. coli*. (Borowsky *et al.*, 2009).

En el presente experimento se trabajó con la cepa L11 de *S. cerevisiae*. Esta es una cepa comercial de la que ya se tenía conocimiento sobre de sus efectos benéficos para los animales cuando se usa como probiótico. La empresa (LeSafre<sup>MR</sup>) productora de esta levadura comercial se encuentra en permanente crecimiento y modernización. Pero antes de comprar un equipo nuevo debe validar que dicho equipo no afecta la calidad del producto final, en este caso la levadura deshidratada destinada como probiótico en la alimentación animal. De ahí que surge la pregunta acerca de si el cambio de equipo modificará la calidad del probiótico y si alguno de los métodos de secado, representa alguna ventaja para el proceso industrial.

Estudios realizados previamente por Tristan, (1998) menciona que la calidad de la levadura se ve afectada por las fluctuaciones en la humedad inicial y al tiempo de exposición en el secado de tambor, mientras que para el secado en *spray* Luna-Solano *et al.*, (2005) reportan una mejor calidad de los cultivos microbianos en comparación al secado en tambor, debido a la optimización de los parámetros del procesos de deshidratación, reportandolo como un método viable para mantener a

levadura, ya que este sistema minimiza los daños térmicos causados a la pared celular (Ameri and Maa 2006), esto es corroborado por Labuza y Barrera-Santos (1970) (citado por Labuza *et al.*, 1972) quienes mencionan que el secado en *spray* es mejor que el secado en tambor ya que conserva de mejor manera las características morfológicas y físicas de la levadura, mejorando su viabilidad, y demostrando que puede mantenerse por meses en almacenamiento sin presentar cambios que afecten su estructura. También se ha demostrado que el secado en *spray* favorece la integridad de los mananos, que contribuyen a la adhesión de *Salmonella* y *E. coli* a su pared celular, por medio de las fimbrias tipo 1 (Martins *et al.*, 2010), las cuales están compuestas principalmente de subunidades de proteínas FimH una lectina situada en la parte superior del eje fimbrial, que es atraída por las propiedades adhesivas o manosa-sensitivas, de la pared celular de *S. cerevisiae* (Luna *et al.*, 1998 y 2000; Duguid *et al.*, 1976; Firon *et al.*, 1984).

Las fimbrias tipo 1 de las enterobacterias desempeñan un papel crítico en la colonización, y fijación a la levadura como se menciona anteriormente, sin embargo, en estudios realizados con diferentes cepas de *Salmonella* se ha demostrado que la adhesión a los mananos-oligosacáridos (MOS) *in vitro*, de *S. cerevisiae* puede variar entre diferentes serovares y entre cepas de un mismo serovar. A pesar de esto, se ha observado que la capacidad de aglutinación *in vitro* se correlacionó bien con la eficacia de los mananos para disminuir el recuento de *E. coli* y *Salmonella* presente en la mucosa intestinal, es por ello que los piensos complementados con *S. cerevisiae* pueden constituir una medida de intervención en los programas de control sanitario frente a enterobacterias, al mejorar la salud intestinal de los animales que la consumen como probiótico (Spring *et al.*, 2000; Letelliere *et al.*, 2001).

En el presente experimento se pudo observar que al exponer los cultivos bacterianos frente a la cepa L11 de *S. cerevisiae* deshidratada por el método en *spray*, presentó mayor eficiencia al inducir la aglutinación de casi todos los serovares de *Salmonella* y a todos los aislados de *E. coli*, contra los que fue

expuesta. Por otro lado, la levadura deshidratada por el método de tambor, aunque aglutino a la mayoría de los serovares, no pudo aglutinar ni a *S. gallinarum*, ni a *S. tennesseei* (Tabla 2). Adicionalmente se observó que la levadura deshidratada por el método de *spray* tuvo un promedio general en intensidad significativamente mayor ( $p < 0.0001$ ) de aglutinación para *Salmonella* de 2.25 y para *E. coli* fue de 3 que la levadura secada por el método de tambor, que tuvo un promedio de 1.85 para *Salmonella* y 2.9 para *E. coli*. Estos datos fortalecen la hipótesis del método de secado en *spray*, ya que al dañar menos las paredes de la levadura, favorece su capacidad de aglutinación, en comparación al método de secado en tambor. Esto probablemente permite una mejor conservación de las moléculas de mananos de la pared celular, lo que a su vez le permite adherir bacterias a sus paredes de manera más eficiente. Este resultado podría tener implicaciones positivas en la salud intestinal de los animales que consumen esta levadura como probiótico, ya que, si capta un mayor número de bacterias presumiblemente patógenas y las arrastra consigo en las heces del animal (Jiang *et al.*, 2015), reducen la carga bacteriana y contribuyen a minimizar la necesidad de uso de antibióticos, para combatir las infecciones por *Salmonella* o *E. coli* (Kiaerie, 2015). Otra implicación de esta investigación es que la cepa L11 de *S. cerevisiae* deshidratada por el método de *spray* es capaz de aglutinar, aunque en diferente medida a todos los serovares a los que fue expuesta, lo cual supera a lo reportado anteriormente por Perez-Sotelo *et al.*, (2005) y Monroy-Salazar *et al.*, (2012) quienes reportaron una capacidad de aglutinación frente a bacterias coliformes de un 57% y 66.6% respectivamente. En este trabajo se confirma que los serotipos de *Salmonella* spp. y de *E. coli* pueden ser adheridos a las paredes de *S. cerevisiae* y la implicación de su uso como probiótico es que la levadura comercial secada por el método de *spray* podría ser más eficiente para reducir la presencia de enterobacterias y favorecer la presencia de bacterias benéficas, que las levaduras liofilizadas por método de tambor, debido a que el método de secado contribuye a preservar una mayor cantidad de mananos en la levadura y éstos ayudan a mejorar la resistencia inespecífica a diferentes

enterobacterias, virus y protozoarios, y favorecer la ganancia de peso como mencionan Siwicki *et al.*, (1994).

El uso de levaduras en la alimentación animal se puede traducir en una mayor higiene ambiental y de los alimentos con un impacto favorable a la salud del hombre, ya que se reducen las probabilidades de contagio por alimentos de origen animal, que son responsables de la mayor parte de brotes de salmonelosis que afectan a centenares de personas y, que pueden ser causada por cualquiera de los casi 2 500 serotipos que se han descrito hasta hoy. En México el serovar de *Salmonella* que se ha aislado con mayor frecuencia es *S. typhimurium*, identificándose en canales de cerdo, bovino y aves (Gutiérrez-Cogco *et al.*, 1994; González-Bonilla *et al.*, 1985), sin embargo se ha observado que existen variaciones en la frecuencia de serotipos de un país a otro, con importancia en áreas que no han alcanzado las condiciones de saneamiento e higiene y no cuentan con medidas de salud pública óptimas (Chalker y Blaser 1998; Blaser y Newman 1992). En este trabajo de investigación es interesante observar que los aislados tipificados como *S. typhimurium*, obtenidos de porcinos fueron aglutinados de manera más eficiente en relación a los aislados provenientes de aves y bovinos. Sería razonable pensar que la especie afectada podrían estar influyendo en la expresión fimbrial. Dado que las infecciones por *Salmonella* o *E. coli* tienen relación a un mal manejo en granja y pueden ser detonadas en mataderos por el estrés generado, el uso de *S. cerevisiae* L11 *in vivo* como medida para disminuir la presencia de enterobacterias y reducir el potencial zoonótico, puede contribuir a disminuir los casos de enfermedad en animales y humanos como una alternativa natural (Gutiérrez-Cogco *et al.*, 2000).

## XII. Conclusiones

La capacidad de aglutinación de *S. cerevisiae* L11 es afectado por el proceso industrial de deshidratación. Observándose una mayor eficiencia de aglutinación de *Salmonella* spp. y *E. coli* frente a *S. cerevisiae* cepa L11 deshidratada por el método de *spray* en comparación al método en Tambor. Debido a que el secado en *spray* es un tratamiento más eficaz para preservar los mananos de la levadura y potenciar sus factores de aglutinación en contra de *Salmonella* spp y *E. coli* en comparación al secado en tambor.

### **XIII.Sugerencias**

Se sugiere seguir estudiando los diferentes métodos de secado en distintas cepas bacterianas de importancia clínica, así como estudios con animales domésticos que demuestren que el *S. cerevisiae* (cepa L11) deshidratado en *spray*, les confiere ventajas productivas y de salud en comparación al secado en tambor.

#### XIV. Bibliografía

Amabile De campos T, Guedes E, Ferreira A, Pestana de Castro F, Brocchi M, Dias da Silveira W. (2005): adhesión properties, fimbrial expression and PCR detection of adhesin-related genes of avian *Escherichia coli* strains. *Veterinary Microbiology*, 24(6):763-768.

Ameri M, Maa Y. (2006): *Spray drying of biopharmaceuticals: Stability and process considerations*. *Drying Technology*, 24(6):763-768.

Andrzej S, Douglas A, Gary R. (1994): Dietary intake of immunostimulants by rainbow trout affects non-specific immunity and protection against furunculosis. *Veterinary Immunology and Immunopathology.*, 41:125-139.

Arce E, Avila E, Lopez C, Garcia A, Garcia F. (2005): Efecto de Paredes Celulares (*Saccharomyces Cerevisiae*) En Alimento de Pollo Sobre Los Parametros Productivos. *Tecnica Pecuaria En Mexico*, 43(2):155-162.

Auclair E. (2001): Yeas t as an example of the mode of action of probiotics in monogastic and ruminant species, en: *Feed manufacturing in the Mediterranean region. Improving safety: From feed to food*. 1 ed., Cahiers Options Méditerranéennes, Reus Spain.

Blanco J, Blanco M, Blanco J, Mora A, Alonso P, Gonzales E, Bernardez I. (2003) Enterobacterias: Características generales. Genero *Escherichia*, en: *Manual de Microbiología Veterinaria*. 1 ed. Editado por Vadillo S, Píriz S, Mateos E., 323-338, McGraw- Hill interamerica, España.

Blanco J, Blanco M, Mora A, Blanco J. (1997): Prevalence of Bacterial resistance to quinolones and other Antimicrobial among Avian *Escherichia coli* strains Isolated from septicemic and Healthy Chickens in Spain. *Journal of clinical Microbiology*, 35(8): 2184-2185.

Borowsky L, Corcao G, Cardoso M. (2009): Mannanoligosaccharide agglutination by salmonella enterica strains isolated from carrier pigs. *Brazilian Journal of Microbiology.*, 40: 458-464.

Brizuela M, Serrano P, Almazán O, Rodríguez J, Camps D, Bueno G, Delgado G, Iglesias I, Tortoló K, Ibañez M. (2009): Probióticos y enzimas. Una alternativa natural al empleo de antibióticos. ICIDCA , 43(2):30-36.

Brizuela M, Serrano P, Almazán O, Rodríguez J, Campos D, Bueno G, Delgado G. (2009): Probióticos y enzimas. Una alternativa natural al empleo de antibióticos. ICIDCA, 43(2):30-36.

Brown D, Gordon S. (2001): Immune recognition. A new receptor for beta-glucans. Nature., 413:36-37.

Brown G, Gordon S. (2003): Fungal B-Glucans and Mammalian Immunity. Immunity., 19:311-315.

Castro M, Rodríguez F. (2005). Levaduras: Probióticos y Prebióticos que Mejoran la Producción Animal. Revista Corpoica., 6(1):1-27.

Chen J, Seviour R. (2007): Medicinal importance of fungal beta (1-3), (1-6)-glucans. Mycological Research., 11:635–652.

Choct M. (2006): Enzymes for the feed industry: past, present and future. World's Poultry Science Association., 62:5-16.

Cid J, Duran A, Del Rey F, Snyder P, Nombela C, Sanchez, M. (1995). Molecular basis of cell integrity and morphogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. Microbiology Reviews., 59:345-386.

Cuarón, J. A. I. La influencia de la levadura en la dieta, respuesta microbiológica, antagonista. In: Simpósio Sobre Aditivos Alternativos Na Nutrição Animal, 2000, Anais... Campinas: CBNA. 2000, p.71-79.

Darwin K, Miller V. (1999): Molecular Basis of the interaction of *Salmonella*. Clinical Microbiology reviews, 12(3);405-428.

Di Iuzio R. (1983): Immunopharmacology of glucan: a broad spectrum enhancer of host defense mechanisms. Trends in Pharmacological Sciences., 4:344–347.

Dildey, D., Sellars, K., Burrill, M., Tree, J., Newman, K. y Jacques, K. (1997). Effect of mannan oligosaccharide supplementation on performance and health of Holstein calves. Journal of Dairy Science 80 (Suppl.): 188.

Dirección General de Epidemiología, Secretaría de Salud. Sistema único de información para la vigilancia epidemiológica. (1994): México, D.F.: SSA,92,187, 281.

Doyle M, Zhao T, Meng J; Zaho S. (1997): *Escherichia coli* O 157:H7, en : Microbiología de los alimentos ed cribia, s.a Doyle m. beuchat l. montville t 177-198

Dreser A, Wirtz V, Corbett K, Echaníz G. (200): Uso de antibioticos en México: Revisión de problemas y políticas. Salud publica de Mexico, 50(4):480-487.

Dvorac R, Newman K, Jacques K, Waterman D. (1997): Effects of Bio-Mos added to calf starter and an all-milk milk replacer on performance and health. Journal of Dairy Science 80: 281.

Elwinger k, Teglof B. (1991): Performance of broiler chickens as influenced by a dietary enzyme complex and without antibiotic supplementation. Arch Geflugelk., 55: 69-73.

Esteban M, Rodriguez A, Meseguer J. (2004): Glucan receptor but not mannose receptor is involved in the phagocytosis of *Saccharomyces cerevisiae* by seabream (*Spaurus aurata* L.) blood leucocytes. Fish and shellfish immunology, 16(3):447-451.

Ferket R. (1993): Practical use of feed enzymes for turkeys and broilers. Journal of Applied Poultry Research., 2:75-81.

Finucane, M., Spring, P. y Mewman, K. (1999). Incidence of mannose sensitive adhesions in enteric bacteria. Poultry Science., 78:130-139.

Fleet H. (1991): Cell Wall. in " The Yeast "(2ed). Yeast Organelles. Rose A.H. and Harrison J.S. (eds). Academic Press, London: 199-277.

Gianella R (1996): *Salmonella*, en: Medical Microbiology. 4 ed. Editado por Baron S. capitulo 21, University of Texas Medical Branch at Galveston; Texas USA.

Gomez G, Cortés A, López C, Arce J, Vásquez C, Avila E.(2009): Comportamiento Productivo y Respuesta Inmune de Pollos Alimentados con Dietas Sorgo-Soya con y Sin Aflatoxina y Paredes Celulares de Levadura (*Saccharomyces Cerevisiae*). Tecnica Pecuaria En Mexico, 47(3):285-297.

González-Bonilla C, Becerril P, Mendoza P, Bessudo D. (1995): Serotipos de salmonelas identificadas en México entre 1974 y 1981. Bol Oficina Sanit Panam., 99:34-39.

Goyache J, Briones V. (2003): Generos *Salmonella* y *Shigella*, en: Manual de Microbiología Veterinaria. 1 ed. Editado por Vadillo S, Píriz S, Mateos E., 323-338, McGraw- Hill interamerica, España.

Gross G. (1994): Diseases due to *Escherichia coli* in poultry, p. 237–259. In C. L. Gyles (ed.), *Escherichia coli* in domestic animals and humans. CAB International, Wallingford, United Kingdom.

Gutiérrez-Cogco L, González-Bonilla C, Giono-Cerezo S, Beltrán L. (1994): Principales serotipos de *Salmonella* identificados en 10 703 cepas en México entre 1982 y 1993. Rev Latinoam Microbiol., 36:221-226.

Gutiérrez-Cogco L, Montiel-Vázquez E, Aguilera-Pérez P, González-Andrade M. guilera-Pérez P, González-Andrade M. (2000): Serotipos de *Salmonella* identificados en los servicios de salud de México. Salud Publica Mex., 42:490-495

Hammes W, Vogel F. (1995): The genus *Lactobacillus* in: The genera of lactic acid bacteria. In B. J.-B. Wood and W. H. Holzapfel. 1 ed. Editado por Wood J, Holzapfel H., 19-54, Blackie Academic and Professional, London, United Kingdom.

Hao Van T, Kha Nguyen H, Smoker P, Coloe P. (2011): The antibiotic resistance characteristic of non-typhoidal *Salmonella* enterica isolated from Food-producing animals, retail meat and humans in South East Asia. International Journal of Food Microbiology., 154:98–106.

Hernández P, Martin O, Rodríguez Y, Ganem F. (1999): Aplicaciones de las lectinas. Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter, 15(2):91-95.

Hughes P, Heritage J. (2004). Antibiotic growth-promoters in food animals. In assessing quality and safety of animal feeds. FAO, Rome, Italy. (pp. 129-151).

immunity and uterine inflammatory signals in transition dairy cows. J. Dairy Sci., 98:1–11.

- Jiang Z, Wei S, Wang Z, Zhu C, Hu S, Zheng C, Chen Z, Hu Y, Ma X, Yang X. (2015): Effects of different forms of yeast *Saccharomyces cerevisiae* on growth performance, intestinal development, and systemic immunity in early-weaned piglets. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 6(47):1-8.
- Kelly, D., R. Begbie, and T. P. King. (1994): Nutritional influences on interactions between bacteria and the small intestinal mucosa. *Nutr. Res. Rev.*, 7:233–257.
- Kennelly P, Rodwell V. (2009): Enzimas: mecanismo de acción en: Harper. *Bioquímica Ilustrada 1*, 28 ed. Editado por Murray R, Bender D, Kathleen B, Kennelly P, Rodwell V, Weil P., Delegacion Alvaro Obregón, México DF.
- Kiaerie E, Scott M, Krause O. (2015): Interactions of *Saccharomyces cerevisiae* fermentation product and in-feed antibiotic on gastrointestinal and immunological responses in piglets challenged with *Escherichia coli* K88+<sup>1</sup>. *American Society of Animal Science.*, 90:1-3
- Knezevic P, Petrovic O. (2008): Antibiotic resistance of commensal *Escherichia coli* of food-producing animals from three Vojvodinian farm, Serbia. *International Journal of Antimicrobial agents.*, 31:360-363.
- Koch L. (2003): Development of the sacculus marked emergence of the bacteria. *ASM News.*, 69:229–233.
- Kogan G, Alfodi J, Masler L. (1988): C 13-nmr-spectroscopic investigation of two cell wall P-D-glucans. *Biopolymers.*, 27:1055-63.
- Labuza, T, Barrera-Santos D. (1970): Concentration and drying of yeast for human food: Effect of evaporation and drying on cd viability. *Trans. Am. Sot. Ag. Eng.* (in press).
- Levin E. (2011): Regulation of cell wall biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*: the cell wall integrity signaling pathway. *Genetics.*, 189:1145–1175
- Lipke, P, Ovalle R. (1998). Cell Wall architecture in yeast: New structure and new challenges. *J. Bacteriol.*, 180: 3735-3740.

Luna G, Salgado A, Garcia A, Rodriguez C. (2000). Improved viability of *spray* dried brewer's yeast by using starch (grits) and maltodextrin as processing aids. *Journal of Food Process Engineering*, 23, 453–462.

Luna G, Salgado A, Garcia A, Rodriguez C. (1998): Yeast viability (*Saccharomyces cerevisiae*) dried by fluidized bed and *spray* drying. *Drying* 98 IDS, C, 1821.

Luna-Solano G, Salgado-Cervantes A, Rodríguez-Jimenes C, García-Alvarado A. (2005): Optimization of brewer's yeast *spray* drying process. *J Food Eng.*, 68:9–18.

Lunden T, Bylund G. (2002): Effect of sulphadiazine and trimethoprim on the immune response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Veterinary Immunology and Immunopathology.*, 85:99-108.

Martins S, Dalmaso G, Arantes E, Doye A, Lemichez E, Lagadec P, Imbert V, Peyron F, Rampal P. (2010): Interaction of *Saccharomyces boulardii* with *Salmonella enterica* serovar Typhimurium protects mice and modifies T84 cell response to the infection. *PLoS ONE* 5, e8925.

Maynard L, Loosli J, Hintz H, Warner R. (1981): Antibióticos, hormonas y otras sustancias estimulantes del crecimiento en: *Nutricion animal* 4 ed., editado por Maynard L, Loosli J, Hintz H, Warner R., 381-394, Mc Graw-Hill, México.

McDonald J H. (2009): *Handbook of Biological Statistics.2a*. Ed. Sparky House Publishing, Maryland, U.S.A. 317 pp.

Monroy-Salazar H, Pérez-Sotelo L, González-Hernández Y, Vaughan G, Lagunas-Bernabé S, Cuaron-Ibargüengoytia J, Montaña-Hirose J, Alonso-Fresán M, Pradal-Roa P, Vázquez-Chagoyán J. (2012): Effects of a live yeast dietary supplement on fecal coliform counts and on peripheral blood CD4+ and CD8+ lymphocyte subpopulations in nursery pigs. *The Journal of the American Association of Swine Veterinarians*, 20(6):276–282.

Morris GJ, Winters L, Coulson E, Clarke J. (1986): Effect of osmotic stress on the ultrastructure and viability of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Gen Microbiol* (132):2023–2034.

- Müller A, Rice J, Ensley E, Coogan S, Kalbfleisch H, Kelley L. (1996): Receptor binding and internalization of a water soluble (1→3)-β-D-glucan biologic response modifier in two monocyte/macrophage cell lines. *J Immunol.*, 156:3418-25.
- Muñoz K, Arango G, Jaramillo M: (2004): Los antibioticos y su situacion actual. *Viate*, 11(1):21-33.
- Newbold C, Wallace R, Mc Intosh F. (1996): Mode de action of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as a feed additive for ruminants. *British journal of nutrition.*, 76:249-261.
- Nguyen, T, Fleet G, Rogers P. (1998): Composition of the cell walls of several yeast species. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 50:206-212.
- Ofek, I, Mirelman D, Sharon N. (1977): Adherence of *Escherichia coli* to human mucosal cells mediated by mannose receptors. *Nature*, 265: 623-625.
- Oriol E. (2004): Saf-Mannan: origen, produccion y analisis. CD in VI seminario internacional (Microbiologia aplicada a nutricion animal). Lesaffres feed additives/saf agr. Nov. 4, veracruz, Mexico.
- Österlund T, Nookaew I, Nielsen J.(2012): Fifteen years of large scale metabolic medeling of yeast: Developments and impacts. *Biotechnology Advance.*, 30:979-988.
- Osumi M. (1998): The ultrastructure of yeast: cell wall structure and formation. *Micron* 29: 207–233.
- Ouwehand C, Niemi P, Salminen J. (1999): The normal microflora does not affect the adhesion of probiotics bacteria *in vitro*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 177: 35-38.
- Pariza M, Cook M. (2009): Determining the safety of enzymes used in animal feed. *Regulatory toxicology and pharmacology.*, 56:332-342.
- Pérez H. (2008): Criterios de selección y mecanismos de acción de cepas de levadura para uso como aditivo probiótico en animales. *ICIDCA*, 3(42):38-45.
- Pérez L, Monroy H, Ochoa L, Cuarón J, Serafín J, Hernández E, Vázquez-Chagoyán J. (2012): Evaluación de la aglutinación de *Salmonella* spp y de *Escherichia coli*, por

*Saccharomyces cerevisiae* y probióticos. V Congreso del Colegio Latinoamericano de Nutrición Animal - I Expo Latinoamericana Puerto Vallarta Jalisco, México.

Pérez-Sotelo L, Talavera-Rojas M, Monroy-Salazar H, Lagunas-Bernabé S, Cuarón-Ibargüengoytia J, Montes de Oca R, Vázquez-Chagoyán J. (2005): Invitro evaluation of the biding capacity of *Saccharomyces cerevisiae* Sc47 to adhere to the wall of *Salmonella* spp. Rev Latinoam Microbiol, 47 (3-4):70-75.

Phillips I. (2004): "Does the Use of Antibiotics in Food Animals Pose a Risk to Human Health A Critical Review of Published Data." Journal of Antimicrobial Chemotherapy 53(1): 28–52.

Pizarro S, Ronco A, Gotteland M. (2014): B-glucanos: ¿que tipos existen y cuales son sus beneficios en la salud?. Rev Chil Nutr, 41(3):439-446.

Poutsiaka D, Mengozzi M, Vannier E, Sinha B, Dinarello A.(1993) Cross-linking of the  $\beta$ -glucan receptor on human monocytes results in interleukin-1 receptor antagonist but not interleukin-1 production. Blood.,82:3695-700.

Rinsum J., Frans M. y Herman V. 1991. Cell Wall Glucomannoproteins of *S. cerevisiae* mnn9. Yeast. 7:717-726.

Rodriguez-Angeles G. (2002): Principales características y diagnostico de los grupos patogenos de *Escherichia coli*. Salud publica de Mexico, 44(5):464-475.

Romero R, Gomez-Basauri. (2003): Yeast and Yeast products, past present and future: from flavour to nutrition and health. In beyond the tornado natural technologies: the calm after the storm. Nutritional biotechnology in the feed and food industries. T. P. Lyons and K. A. 365-371, 1 eds. Nottingham university press, nottingham, uk.

Salminen S, Isolauri E, Salminen E. (1996): Clinical Uses of Probiotics for Stabilizing the Gut Mucosal Barrier: Successful Strains and Future Challenges. Antonie van Leeuwenhoek., 70:347-358

Savage T, Cotter P, Zakrzewska E. (1996): The effect of feeding mannan oligosaccharide on immunoglobulins, plasma IgG and bile IgA of Wrolstad MW male turkeys, Poultry Science 75 (1):143.

Schiavone M, Vax A, Formosa C, Martin-Yken H, Dague E, Francois J. (2014): A combined chemical and enzymatic method to determine quantitatively the polysaccharide components in the cell wall of yeasts. *Federation of European Microbiological Societies.*, 14:933-947.

Schrezenmeir J, Vrese M. (2001): Probiotics, prebiotics and symbiotics approaching a definition. *Am. J. Clin. Nutr.*, 73:361-364.

Serezli R, Cagircan H, Okumus I, Akhan S, Balta F. (2005): The effect of Oxytetracycline on Non-specific Immune Response in sea Bream (*Sparus aureata* L.1758). *Turk J Vet Anim Sci.*, 29:31-35.

Sharon N, Lis H. (1993): Carbohydrates in cell recognition. *Scientific American.* 268:82-89.

Shimada M. (2009): Aditivos, en: *Nutrición animal*. 2 ed. Editado por Shimada M., 221-230, Trillas, México.

Sirimanapong W, Adams A, Ooi E, Green D. (2015): the effect on feeding immunostimulant B-glucans on the immune response of Pangasianodon Hypopthalmus. *Fish and Shellfish immunology.*, 45:357-366.

Siwicki A, Anderson Douglas, Rumsey G. (1994): Dietary intake of immunostimulants by rainbow trout affects non-specific immunity and protection against furunculosis. *Veterinary Immunology and Immunopathology.*, 41:125-139.

Sokurenko, Evgeni V et al. 1995. "Quantitative Differences in Adhesiveness of Type 1 Fimbriated *Escherichia Coli* Due to Structural Differences in fimH Genes." 177(13): 3680-86.

Stokstad E, Junkes T, Pierce J, Page A, Franklin A. (1949): The multiple nature of the animal protein factor. *Journal of Biological Chemistry.*, 180: 647-54

Stordeur P, Marlier D, Blanco J, Oswald E, Biet F, Dho-Moulin M, Mainil J. (2002): Examination of *Escherichia coli* from poultry for selected adhesin genes important in disease caused by mammalian pathogenic *E. coli*. *Veterinary Microbiology.*, 84: 231-241.

- Tasho Reep P, Cho J. (2016): "Veterinary Antibiotics in Animal Waste, Its Distribution in Soil and Uptake by Plants: A Review." *Science of The Total Environment* 563-564(3): 366–76.
- Tokunaga M, Kusamichi M, Koike H. (1986): Ultrastructure of outermost layer of cell wall in *Candida albicans* observed by rapid-freezing technique. *J Electron Microsc* (Tokyo)., 35:237–246.
- Trckova M, Faldina M, Alexa P, Sramkova Z, Gopfert E, Kumprechtova D, Auclair E, Inca D. (2014): The Effects Of Live Yeast *Saccharomyces Cerevisiae* On Postweaning Diarrhea, Immune Response, And Growth Performance In Weaned Piglets. *American Society of Animal Science.*, 92:767-774.
- Trystram, G. (1988): Contribution a l'automatisation d'un pro&de industrial de sechage sur cylindre. In *Automatic Control and Optimisation of Food Processes*, eds. M. Renard & J. J. Bimbenet. Elsevier Applied Science., 265-83.
- Tzianabos O, Cisneros L. (1996): Prophylaxis with the immunomodulator PGG glucan enhances antibiotic efficacy in rats infected with antibiotic-resistant bacteria. *Ann NY Acad Sci.*, 797: 285-287.
- Van Boeckel P, Brower C, Gilbert M, Grenfel T, Levin A, Robinson P, Laxminaraya R. (2015): Global Trends in antimicrobial use in food animals. *Proc. Natl. Sci.*, 112(18):5649-5654.
- Vanegas M, Gonzáles L, Arevalo S, Villanueva C. (2012): Evaluación del potencial probiotico de cepas *Lactobacillus* colombianas aisladas de leche materna. *Alimentos hoy*, 21(26):7-17.
- Vásquez-Piñeros M, Rondon-Barragan L, Eslava-Mocha P.(2012): Inmunoestimulantes en teleosteos: probioticos, B-glucanos y LPS. *Orinoquia*, 16(1):46-62.
- Ventura M. (2011): Inovacion y tecnologia en la Ganaderia de doble proposito; Beneficios del Uso de levaduras vivas en la alimentacion de bovinos capitulo XXXV.
- Vester B, Douthwaite S. (2001): Minireview. Macrolide resistance Confered by Base substitutions in 23SrRNA. *Antimicrob Agents Chemother*, 45(1):1-12.

Von Nussbaum, Franz et al. (2006): “Antibacterial Natural Products in Medicinal Chemistry - Exodus or Revival?” *Angewandte Chemie - International Edition* 45(31): 5072–5129.

Webb K, Matthews J, Dirienzo D. (1992): Peptide absorption: a review of current concepts and future perspectives. *J. Anim. Sci.* 70:3248–3257.

Whittington R, Lim C, Klesius P. (2005): Effect of dietary B-glucan levels on the growth response and efficacy of *Streptococcus iniae* vaccine in Nile tilapia, *O. niloticus*. *Aquaculture.*, 248:217-225

Yu Y, Heang S, Lee H. (2002): *Salmonella* London endogenous endophthalmitis in a healthy infant. *Pediatr Infect Dis J.*, 521:578.

Yuan K, Mendonça D, Hulbert E, Mamedova K, Muckey B, Shen Y, Elrod C. (2015): Yeast product supplementation modulated humoral and mucosal

Zanello G, Meurens F, Berri M, Salmon H. (2009): *Saccharomyces boulardii* Effects On Gastrointestinal Diseases. *Molecular Biology.*, 11:47-58.

Zanello G, Meurens Francois, Berri M, Chevaleyre C, Melo S, Auclair E, Salmon H. (2011): *Saccharomyces cerevisiae* decreases inflammatory responses induced by F4+ enterotoxigenic *Escherichia coli* in porcine intestinal epithelial cells. *Veterinary Immunology and Immunopathology.*, 141:133–138.

Zlotnik H, Fernandez MP, Bowers B, Cabib E. (1984): *Saccharomyces cerevisiae* mannoproteins form an external cell wall layer that determines wall porosity. *J Bacteriol* 159:1018–1026.