

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**



**ESTUDIO DE LA COMPETENCIA MICROBIANA ENTRE *Lactiplantibacillus plantarum* 299 V (DSM 9843), *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ATCC 11842, *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 Y *Candida albicans***

**Por**

**MARÍA ANDREA VEGA VÁSCONEZ**

**Como requisito parcial para obtener el Grado de MAESTRO EN CIENCIAS con  
Orientación en Microbiología Aplicada**

**Octubre, 2024**

**ESTUDIO DE LA COMPETENCIA MICROBIANA ENTRE *Lactiplantibacillus plantarum* 299 V (DSM 9843), *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ATCC 11842, *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 Y *Candida albicans***

**Revisión de la Tesis:**

---

**Dra. Arlette Santacruz López**

**Co-asesora**

---

**Dr. Xristo Zárate Kalfópulos**

**Comité Tutorial**

---

**Dr. Julio Silva Mendoza**

**Comité Tutorial**

---

**Dr. Augusto Vázquez Rodríguez**

**Comité Tutorial**

---

**Dra. María Elena Cantú Cárdenas**

**Sub-Directora de Posgrado**

**ESTUDIO DE LA COMPETENCIA MICROBIANA ENTRE *Lactiplantibacillus plantarum* 299 V (DSM 9843), *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ATCC 11842, *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 Y *Candida albicans***

**Aprobación de la Tesis:**

---

**Dr. José Rubén Morones Ramírez**  
**Presidente**

---

**Dr. Xristo Zárate Kalfópulos**  
**Secretario**

---

**Dr. Julio Silva Mendoza**  
**Vocal**

---

**Dra. María Elena Cantú Cárdenas**  
**Sub-Directora de Posgrado**

## **DEDICATORIA**

Dedico este trabajo a mis padres, Ángela María Vásconez Ramírez y Luis Alberto Vega Delgado, quienes han sido un ejemplo de perseverancia y motivación, impulsándome cada día a seguir adelante y alcanzar mis objetivos.

A mis hermanos, Dayana y Josué, quienes, con su cariño y paciencia, han estado presentes en cada etapa de mi vida.

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero agradecer a todas las personas que formaron parte de mi crecimiento personal y profesional durante estos dos años de estudio.

Al Dr. Rubén Morones, por su apoyo, paciencia y por realizar correcciones en el momento adecuado.

A la Dra. Arlette Santacruz López, por sus enseñanzas y por la confianza que me brindó.

A mi comité tutorial, conformado por el Dr. Xristo Zárate Kalfópulos, el Dr. Augusto Vázquez Rodríguez y el Dr. Julio Silva Mendoza, por tomarse el tiempo para ofrecer observaciones que enriquecieron este trabajo.

A mis compañeros de generación y orientación, Samantha, Israel, Fer y Jhoan, por su apoyo en las clases.

A mis compañeros de laboratorio, Diana, Javi, Silvia, Nami y Jully por su valiosa ayuda y oportunos consejos.

Y, por último, a toda mi familia, por sus palabras de aliento cuando me encontraba desanimada y por inculcarme los valores que me han definido como la persona que soy.

Finalmente, al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) por la beca otorgada.

## LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
<b>CAPÍTULO 1</b> .....	<b>1</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
1.1. Infecciones Fúngicas.....	1
1.2. <i>Candida albicans</i> .....	2
1.2.1. Candidiasis Oral.....	3
1.2.2. Factores de Virulencia de <i>C. albicans</i> .....	6
1.2.2.1. Polimorfismo. ....	6
1.2.2.2. Biopelícula.....	7
1.3. Probióticos .....	9
1.3.1. <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> .....	10
1.3.2. <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> .....	11
1.3.3. <i>Lactobacillus acidophilus</i> .....	12
1.4. Postbióticos .....	13
1.4.1. CFS .....	14
1.4.2. Microorganismos Inanimados o Postbióticos .....	15
1.5. Cocultivos .....	17
<b>CAPÍTULO 2</b> .....	<b>19</b>
<b>ANTECEDENTES</b> .....	<b>19</b>
<b>CAPÍTULO 3</b> .....	<b>24</b>
<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b> .....	<b>24</b>
3.1. Hipótesis .....	24
3.2. Objetivo General.....	24
3.3. Objetivos Específicos.....	25
<b>CAPÍTULO 4</b> .....	<b>26</b>

<b>METODOLOGÍA .....</b>	<b>26</b>
4.1.Estrategia General del proyecto .....	26
4.2.Localización.....	27
4.3.Material, reactivos y equipo utilizado.....	28
4.4.Acondicionamiento y Producción de Stocks Bacterianos y Fúngico.....	29
4.5.Establecimiento del Medio de Cultivo.....	30
4.6.Cocultivo de <i>C. albicans</i> y BAL.....	31
4.7.Producción de Sustancias Antifúngicas postbióticos, CFS y BAL.....	33
4.7.1.Postbióticos.....	33
4.7.1.1.Sonicación.....	33
4.7.1.2.Autoclavado.....	34
4.7.2. Producción del CFS pH normal y CFS a pH 7.....	35
4.7.3. Producción de las BAL.....	35
4.8.Evaluación de la actividad antimicrobiana mediante el Método Difusión en Pocillos de Agar.....	35
4.9.Evaluación de la Actividad Antimicrobiana del CFS, CFS pH 7 y Postbiótico de cada una de las BAL Mediante el Método de Concentración Mínima Inhibitoria (CMI).....	36
4.10.Evaluación Microscópica.....	37
4.11.Análisis estadístico.....	37
4.12.Manejo y disposición de residuos.....	38
<b>CAPÍTULO 5 .....</b>	<b>39</b>
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>39</b>
5.1. Establecimiento del Medio de Cultivo.....	39
5.2 Cocultivo de <i>C. albicans</i> y BAL.....	43
5.3. Producción de Sustancias Antifúngicas Microorganismos Inactivados, CFS y BAL.....	49
5.3.1. Postbióticos.....	49
5.3.1.1.Sonicación.....	49
5.3.1.2.Autoclavado.....	49
5.4.Evaluación de la Actividad Antimicrobiana Mediante el Método de los Pocillos del CFS, CFS pH 7, postbiótico y las BAL.....	51
5.5.Evaluación de la Actividad Antimicrobiana Mediante el Método CMI del CFS, CFS pH 7 y Postbiótico de cada una de las BAL.....	52
5.5.1. CMI del CFS.....	52
5.5.2. CMI del CFS pH7.....	54
5.5.3. CMI del postbiótico.....	57
5.5.4. CMI del probiótico.....	61
5.6. Evaluación Microscópica.....	62

<b>CAPÍTULO 6 .....</b>	<b>70</b>
<b>DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....</b>	<b>70</b>
6.1.Establecimiento del medio de cultivo s.....	70
6.2.Cocultivo de <i>C. albicans</i> y BAL.....	71
6.3.Evaluación de la Actividad Antimicrobiana Mediante el Método de los Pocillos.....	75
6.3.1. CFS Y CFS pH 7.....	75
6.3.2. Postbióticos .....	76
6.3.3. BAL.....	76
6.4.Evaluación de la Actividad Antifúngica Mediante el Método CMI del CFS, CFS pH 7 y postbiótico de cada una de las BAL.....	77
6.4.1.CMI del CFS.....	77
6.4.2.CMI del CFS 7.....	80
6.4.3.CMI de los postbióticos .....	81
6.4.4.CMI del probiótico .....	82
6.5.Evaluación Microscópica.....	83
<b>CAPÍTULO 7 .....</b>	<b>86</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>86</b>
7.1.Perspectivas.....	89
<b>CAPÍTULO 8 .....</b>	<b>90</b>
<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>90</b>
<b>RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO.....</b>	<b>103</b>

## LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
<b>Figura 1.</b> Tinción de <i>C. albicans</i> con azul metileno aumento 100x .....	3
<b>Figura 2.</b> Transición morfológica de <i>C. albicans</i> durante el proceso de infección.....	6
<b>Figura 3.</b> Fases de la formación de la biopelícula de <i>C. albicans</i> .....	9
<b>Figura 4.</b> Estrategia general de trabajo.....	26
<b>Figura 5.</b> Comparación de la morfología de las colonias de <i>C. albicans</i> en los medios .....	41
<b>Figura 6.</b> Comparación de la morfología de las colonias de <i>L. acidophilus</i> en los medios.....	42
<b>Figura 7.</b> Confirmación de la inhibición del crecimiento de los microorganismos mediante el uso antibióticos .....	43
<b>Figura 8.</b> Curva de crecimiento de <i>L. plantarum</i> vs. <i>C. albicans</i> en cocultivo y de forma individual.....	45
<b>Figura 9.</b> Curva de crecimiento de <i>L. delbrueckii</i> vs. <i>C. albicans</i> en cocultivo y de forma individual.....	46
<b>Figura 10.</b> Curva de crecimiento de <i>L. acidophilus</i> vs. <i>C. albicans</i> en cocultivo y de forma individual .....	46
<b>Figura 11.</b> Acidez (% ácido láctico) y pH de <i>C. albicans</i> vs. <i>L. plantarum</i> .....	47
<b>Figura 12.</b> Acidez (% ácido láctico) y pH de <i>C. albicans</i> vs. <i>L. delbrueckii</i> .....	48
<b>Figura 13.</b> Acidez (% ácido láctico) y pH de <i>C. albicans</i> vs. <i>L. acidophilus</i> .....	48
<b>Figura 14.</b> Actividad Antimicrobiana Mediante el Método de los Pocillos vs. <i>C. albicans</i> .. ....	51
<b>Figura 15.</b> Actividad antifúngica del CFS de <i>L. plantarum</i> vs. <i>C. albicans</i> .....	52
<b>Figura 16.</b> Actividad antifúngica del CFS de <i>L. delbrueckii</i> vs. <i>C. albicans</i> .....	53
<b>Figura 17.</b> Actividad antifúngica del CFS de <i>L. acidophilus</i> vs. <i>C. albicans</i> .....	54
<b>Figura 18.</b> Actividad antifúngica del CFS pH 7 de <i>L. plantarum</i> vs. <i>C. albicans</i> .....	55

<b>Figura 19.</b> Actividad antifúngica del CFS pH 7 de <i>L. delbrueckii</i> vs. <i>C. albicans</i> .....	56
<b>Figura 20.</b> Actividad antifúngica del CFS pH 7 de <i>L. acidophilus</i> vs. <i>C. albicans</i> .....	57
<b>Figura 21.</b> Actividad antifúngica del postbiótico derivado de <i>L. plantarum</i> vs. <i>C. albicans</i> ....	58
<b>Figura 22.</b> Actividad antifúngica del postbiótico derivado de <i>L. delbrueckii</i> vs. <i>C. albicans</i>	59
<b>Figura 23.</b> Actividad antifúngica del postbiótico derivado de <i>L. acidophilus</i> vs. <i>C. albicans</i>	60
<b>Figura 24.</b> Actividad antifúngica de los postbióticos vs. <i>C. albicans</i> . LD: <i>L. delbrueckii</i> LP: <i>L. plantarum</i> , LA: <i>L. acidophilus</i> conteo en placa. ....	61
<b>Figura 25.</b> Actividad antifúngica de los probióticos vs. <i>C. albicans</i> . LD: <i>L. delbrueckii</i> LP: <i>L. plantarum</i> , LA: <i>L. acidophilus</i> .....	62
<b>Figura 26.</b> Postbióticos de <i>L. delbrueckii</i> .....	63
<b>Figura 27.</b> Postbióticos de <i>L. acidophilus</i> .....	64
<b>Figura 28.</b> Postbióticos de <i>L. plantarum</i> .....	65
<b>Figura 29.</b> Coagregación de postbióticos de <i>L. delbrueckii</i> con <i>C. albicans</i> .....	66
<b>Figura 30.</b> Coagregación de postbióticos de <i>L. acidophilus</i> con <i>C. albicans</i> .....	67
<b>Figura 31.</b> Coagregación de postbióticos de <i>L. plantarum</i> con <i>C. albicans</i> .....	68
<b>Figura 32.</b> <i>C. albicans</i> .....	69

## NOMENCLATURA

°C	Grados Celsius
μL	Micro litro
μm	Micrómetro
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
AMPc	Adenosín Monofosfato Cíclico
BAL	Bacteria Ácido Láctica
BLIS	Sustancias Inhibidoras Similares a las Bacteriocinas
CDC	Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades
CFS	Sobrenadante Libre de Células
EPS	Exopolisacáridos
et al	Y otros
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos de los EE. UU.
GRAS	Generalmente Reconocidas como Seguras
ISAPP	Asociación Científica Internacional de Probióticos y Prebióticos
MRS	De Man, Rogosa y Sharpe
mg	Miligramo
mL	Mililitro
mm	Milímetro
N	Normal
NaOH	Hidróxido de Sodio
OD	Densidad Óptica
OMS	Organización Mundial de la Salud
PBS	Tampón Salino Fosfato
psi	Libras por pulgada cuadrada
PKA	Proteína Quinasa A
p/v	Peso por Volumen
ROS	Especies Reactivas de Oxígeno
S-layer	Capa superficial
SCFA	Ácidos Grasos de Cadena Corta
SLAPs	Proteínas asociadas a la capa S
TSB	Tripteína Soya
TSBYE	Tripteína Soya con Extracto de Levadura
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
VIH	Virus de Inmunodeficiencia Humana
v/v	Volumen por Volumen
YDP	Extracto de Levadura, Peptona y Dextrosa
YM	Extracto de levadura y MALTA

## RESUMEN

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Ciencias Químicas

Nombre: María Andrea Vega Vásquez

Fecha de graduación: Diciembre 2024

Número de páginas: 103

Área de estudio: Microbiología Aplicada

### **Candidato para el grado de Maestría en Ciencias con Orientación en Microbiología Aplicada**

**Título de estudio:** Estudio de competencia microbiana entre *Lactiplantibacillus plantarum* 299 V (DSM 9843), *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ATCC 11842, *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 y *Candida albicans*

**Propósito y Método de Estudio:** El uso de terapias alternativas a los antimicóticos surge debido al creciente problema de la resistencia antimicrobiana y los efectos adversos asociados con el uso de azoles y equinocandinas, como la hepatotoxicidad. Este problema es especialmente preocupante en el caso de infecciones causadas por patógenos fúngicos como *Candida albicans*. Entre las terapias alternativas, los probióticos han despertado un creciente interés. En el presente proyecto se estudiaron las interacciones antagonistas entre *Lactiplantibacillus plantarum* 299V (DSM 9843), *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (ATCC 11842), y *Lactobacillus acidophilus* (ATCC 4356) contra un aislado clínico oral de *C. albicans*.

**Contribuciones y conclusiones:** Se realizaron cocultivos para evaluar el efecto inhibitorio de distintas Bacteria Ácido Lácticas (BAL) sobre *C. albicans*, identificando el punto de máxima inhibición y la estabilidad de este efecto. Entre las cepas evaluadas, *L. plantarum* mostró la mayor inhibición, con una reducción de 2.39 ciclos logarítmicos. La evaluación del Sobrenadante Libre de Células (CFS, por sus siglas en inglés) reveló que el de *L. acidophilus* alcanzó un 79.01 % de inhibición a pH 3.85. Sin embargo, al ajustar el pH a 7 de los CFS de las tres BAL, el de *L. plantarum* mostró una inhibición del 28.35 %. Además, el uso de postbióticos de esta cepa resultó en una inhibición del 95.04 %. Por otro lado, en ensayos con una concentración terapéutica de  $1 \times 10^9$  UFC/mL, todas las cepas

inhibieron completamente el crecimiento de *C. albicans*. Asimismo, mediante microscopía óptica, se observó que los postbióticos de las BAL se coagregaron con *C. albicans*, un hallazgo no reportado previamente según nuestra revisión bibliográfica, lo que sugiere una posible interacción adicional en su efecto antimicótico. Se logró estudiar las interacciones antagónicas desarrolladas por *L. plantarum*, *L. delbrueckii* y *L. acidophilus*, el postbiótico y el CFS al cocultivarse con el patógeno *C. albicans*. Los resultados demostraron que el grado de inhibición de *C. albicans* varía entre cepas y depende del tipo de antimicótico utilizado (probiótico, postbiótico o CFS).

**FIRMA DEL ASESOR:** \_\_\_\_\_

Dr. José Rubén Morones Ramírez

# CAPÍTULO 1

## INTRODUCCIÓN

### 1.1. Infecciones Fúngicas

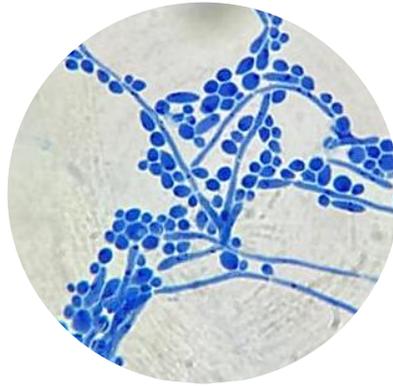
Las infecciones fúngicas representan una causa significativa de morbilidad y mortalidad a nivel mundial, con aproximadamente 1.7 millones de muertes anuales [1]. Estas enfermedades afectan principalmente a poblaciones vulnerables, como pacientes inmunocomprometidos debido a VIH, cáncer o tratamientos inmunosupresores [2]. A pesar de su impacto, suelen estar subestimadas en comparación con otras enfermedades infecciosas como la tuberculosis o la malaria, lo que ha limitado los esfuerzos para desarrollar soluciones efectivas [3]

El manejo de estas infecciones es complejo debido a la creciente resistencia a los antifúngicos disponibles [4]. Actualmente, solo existen cuatro clases principales de antifúngicos: polienos, azoles, equinocandinas y antimetabolitos[5]. Esta limitada variedad terapéutica complica el manejo clínico, especialmente ante el aumento de patógenos resistentes. Además, factores como el cambio climático y el uso agrícola de antifúngicos han contribuido a la proliferación de especies resistentes [6].

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha clasificado a *Candida auris*, *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus* y *Cryptococcus neoformans* como patógenos críticos debido a su alta letalidad y creciente resistencia a los tratamientos antimicóticos. En respuesta a este desafío, la OMS enfatiza la necesidad de desarrollar nuevos antifúngicos, mejorar el acceso a herramientas diagnósticas eficaces y fortalecer los sistemas de vigilancia, especialmente en regiones con recursos limitados. Estas acciones son fundamentales para mitigar el impacto de estas infecciones en la salud pública a nivel mundial. [7].

## **1.2. *Candida albicans***

Las especies de *Candida* son las principales causantes de infecciones humanas por hongos patógenos, siendo *Candida albicans* el agente más común en infecciones oportunistas. A nivel mundial, esta levadura provoca más de 150 millones de infecciones de las mucosas al año y alrededor de 200,000 muertes anuales por enfermedades invasivas y diseminadas, afectando principalmente a poblaciones vulnerables e inmunocomprometidas. Estos datos resaltan su considerable impacto en la salud global, especialmente en personas con sistemas inmunológicos debilitados [8].



**Figura 1. Tinción de *C. albicans* con azul metileno aumento 100x**

*C. albicans* es una levadura polimórfica (Figura 1) que forma parte de la microbiota normal en aproximadamente el 50 % de la población. Coloniza la cavidad orofaríngea, el tracto gastrointestinal, el tracto vaginal y la piel de individuos sanos. Aunque normalmente actúa como comensal, ciertos factores pueden desencadenar su transición a patógeno, provocando candidiasis que afectan principalmente mucosas orales, vaginales y gastrointestinales, o, en casos graves, candidemia, una infección sistémica en la que *C. albicans* ingresa al torrente sanguíneo [9, 10].

### **1.2.1. Candidiasis Oral**

En México, *C. albicans* es la principal causa de candidiasis tanto superficial como invasiva, y es responsable de aproximadamente el 71 % de los casos de candidiasis oral. Aunque existen más de 200 especies de *Candida*, *C. albicans* es la más prevalente, especialmente en poblaciones vulnerables. Entre las poblaciones más afectadas se encuentran niños y adolescentes, pacientes oncológicos, personas con diabetes, niños desnutridos y comunidades indígenas, como la tarahumara [11].

### **1.2.1.1. Factores de Riesgo para Candidiasis Oral.**

*C. albicans* puede pasar de ser un comensal a un patógeno cuando ciertos factores de predisposición se ven comprometidos. Entre los factores locales más destacados se encuentran la hipofunción salival, el uso prolongado de prótesis dentales mal ajustadas, la terapia prolongada con corticosteroides tópicos y el tabaquismo, los cuales crean condiciones propicias para la proliferación del hongo en la cavidad oral [12].

Por otro lado, los factores sistémicos como el envejecimiento y enfermedades que comprometen el sistema inmunológico, tales como el VIH, el cáncer y la diabetes, también desempeñan un papel clave en el desarrollo de la candidiasis oral. La inmunosenescencia en personas mayores y los sistemas inmunitarios inmaduros en los bebés incrementan su susceptibilidad a las infecciones. El uso de antibióticos de amplio espectro altera la microbiota, permitiendo el crecimiento excesivo del microorganismo. Además, las deficiencias nutricionales en minerales y vitaminas esenciales contribuyen al debilitamiento del sistema inmunológico, lo que facilita la persistencia de la infección [13].

### **1.2.1.2. Tratamiento y Prevención.**

El tratamiento de la candidiasis oral requiere un enfoque integral que combine antifúngicos, medidas estrictas de higiene oral y la restauración de la eubiosis microbiana. Los antifúngicos, como la nistatina (tópico) y el fluconazol (sistémico), son esenciales para controlar la infección. Sin embargo, presentan desafíos significativos, como la resistencia en biopelículas. Estas biopelículas mixtas, formadas por *C. albicans* y

bacterias orales como *Streptococcus mutans*, crean matrices extracelulares que secuestran antifúngicos y promueven la resistencia [14]. Por ello, la combinación de terapias convencionales con agentes disruptores de biopelículas es esencial para abordar estas limitaciones y mejorar la efectividad del tratamiento.

Además, investigaciones sobre los mecanismos de resistencia a los antifúngicos han identificado estrategias avanzadas de los microorganismos, como la producción de enzimas específicas y el uso de bombas de expulsión, lo que subraya la complejidad de este problema y la necesidad de innovaciones terapéuticas [15]. En este contexto, tecnologías emergentes como la edición genética mediante CRISPR-Cas se perfilan como herramientas innovadoras para combatir esta resistencia [16].

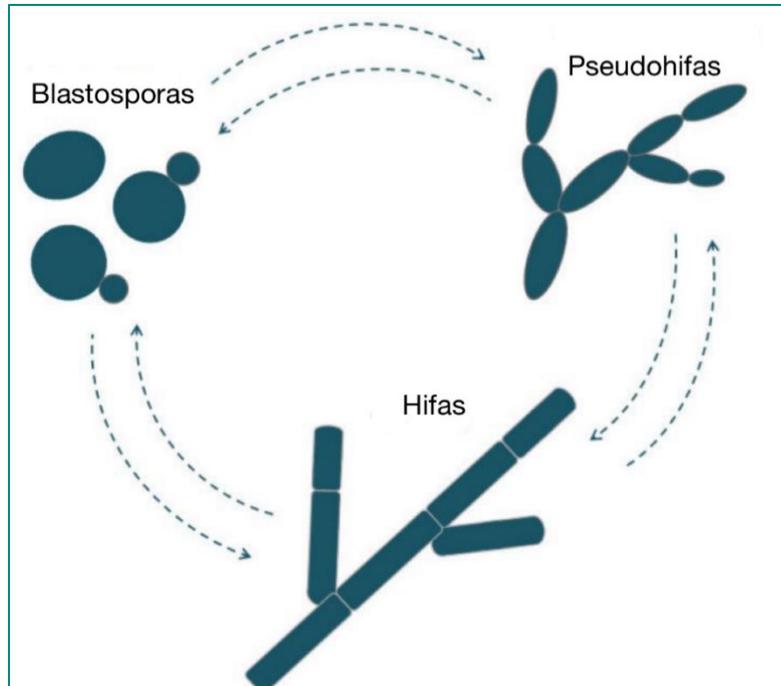
En este sentido, la integración de probióticos en el tratamiento se presenta como un enfoque complementario prometedor. Especies como *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactiplantibacillus plantarum* y *Lactobacillus reuteri* han demostrado eficacia al inhibir el desarrollo de biopelículas de *C. albicans* y reducir la expresión de genes relacionados con su virulencia, como *hwp1* y *als3* [17]. Además, los probióticos compiten por sitios de adhesión y producen metabolitos secundarios que no solo inhiben el crecimiento del patógeno, sino que también modulan positivamente el sistema inmunológico, facilitando la eliminación de *C. albicans* sin efectos secundarios.

Por otro lado, medidas adicionales, como la desinfección y cuidado de prótesis dentales, la cesación del tabaquismo y el uso adecuado de enjuagues bucales tras inhaladores con esteroides, son fundamentales para reducir factores de riesgo [18]. El control de enfermedades subyacentes también resulta crucial para prevenir recurrencias.

## 1.2.2. Factores de Virulencia de *C. albicans*

### 1.2.2.1. Polimorfismo.

*C. albicans* es un hongo patógeno que puede cambiar entre distintas formas morfológicas, como blastosporas, pseudohifas e hifas (Figura 2), lo que le confiere una gran capacidad para adaptarse y causar infecciones en el huésped. Este polimorfismo le permite evadir el sistema inmunológico y facilitar su invasión en los tejidos del huésped. La conversión de la forma de levadura (blastosporas) a las formas filamentosas (hifas y pseudohifas) es clave en la virulencia de *C. albicans*, ya que la forma de hifa es especialmente invasiva y está asociada con infecciones más graves. Esta capacidad de transición está regulada por vías de señalización que responden a factores ambientales como la temperatura, el pH y la disponibilidad de nutrientes [10, 19].



**Figura 2.** Transición morfológica de *C. albicans* durante el proceso de infección [10].

Entre los genes que participan en la regulación de este proceso, se destacan *efg1* y

*cph1*, ambos responsables de promover la formación de hifas en respuesta a estímulos ambientales, aunque funcionan de manera independiente. *Efg1* está involucrado en la vía de señalización dependiente de Adenosin Monofosfato Cíclico (AMPC), mientras que *cph1* actúa como un regulador paralelo. Además, el gen *hgc1* es esencial para el alargamiento de las hifas, ya que su mutación impide la formación adecuada de las mismas. El gen *ras1*, por su parte, actúa a través de la vía de la proteína quinasa A (PKA, por sus siglas en inglés), controlando la transición entre las diferentes formas morfológicas. Otros genes como *tec1*, que regula la formación de pseudohifas, y *nrg1*, un represor que inhibe la formación de hifas en condiciones normales lo que ayuda a mantener la plasticidad morfológica de *C. albicans* [20].

#### **1.2.2.2. Biopelícula**

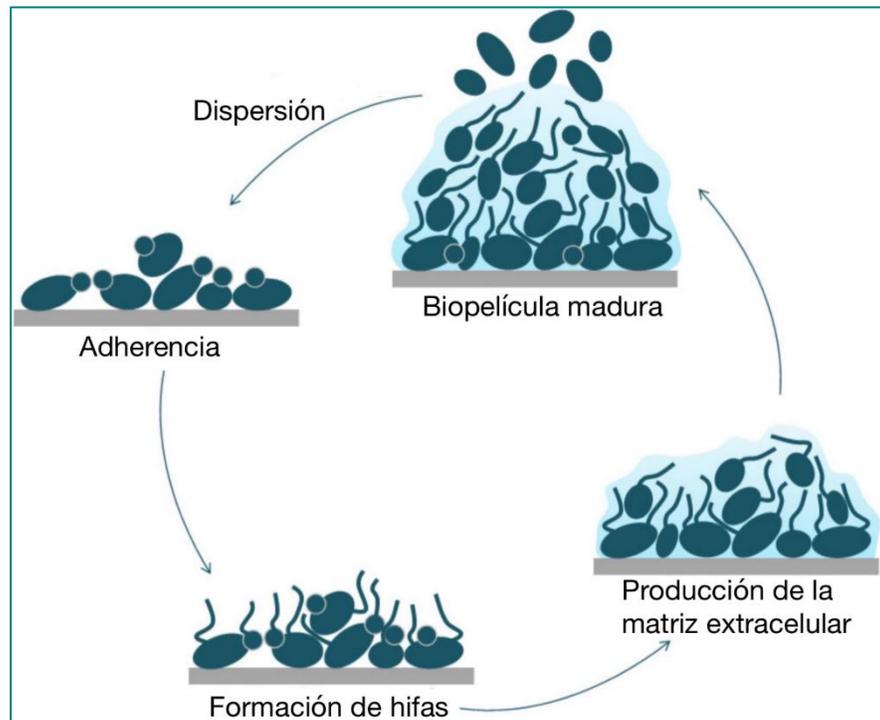
Las infecciones orales por *C. albicans* asociadas a biopelícula son un desafío clínico considerable debido a su alta resistencia a los antifúngicos convencionales y a su compleja estructura. Estas biopelículas, que se desarrollan tanto en tejidos del huésped como en dispositivos médicos, comienzan con la adhesión inicial de las células de levadura, mediada por adhesinas como *als3* y *hwp1* [21]. Este paso es esencial para establecer la base de la biopelícula.

El desarrollo de la biopelícula sigue un ciclo bien definido (Figura 3): adhesión, proliferación, maduración y dispersión. Durante la proliferación, las células fúngicas generan una estructura tridimensional, mientras que en la maduración producen una matriz extracelular compuesta por glucanos, proteínas y ADN [22]. Esta matriz protege a la biopelícula de la acción de los antifúngicos y del sistema inmune, incrementando hasta 1000 veces la resistencia de las células en comparación con las planctónicas [23].

Finalmente, en la dispersión, las células liberadas colonizan nuevas superficies, perpetuando la infección.

En la cavidad oral, las infecciones oportunistas por *Candida*, principalmente *C. albicans*, se manifiestan como placas blanquecinas sobre las mucosas. Otras especies como *Candida dubliniensis*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis* y *Candida glabrata* pueden contribuir en menor grado[24]. Estos hongos forman biopelículas tanto en tejidos como en dispositivos médicos, donde su estrecho contacto con la mucosa palatina puede inducir inflamación [25]. Aunque las levaduras son resistentes, las biopelículas suelen ser dominadas por bacterias, lo que implica un abordaje terapéutico amplio[14].

Para enfrentar estos desafíos, se han desarrollado estrategias innovadoras, entre ellas nuevos antifúngicos como rezafungina e ibrexafungerp, efectivos contra biopelículas maduras [26]. Las terapias combinadas, como artemisininas con miconazol, potencian los efectos antifúngicos, mientras que los enfoques antivirulencia buscan impedir la formación de biopelículas sin inducir resistencia [27]. Además, enzimas como desoxirribonucleasa y glucanasa pueden degradar la matriz extracelular, optimizando así la acción de los tratamientos antifúngicos convencionales [28]. El uso de probióticos destaca como una terapia alternativa notable por su ausencia de efectos secundarios. Su aplicación, ya sea en monoterapia o en combinación con antifúngicos tradicionales, está emergiendo como una opción terapéutica prometedora. Especies como *L. rhamnosus* y *L. plantarum* han mostrado su capacidad para inhibir el crecimiento de *C. albicans* y disminuir la formación de biopelículas orales, actuando mediante la producción de compuestos antimicrobianos y la modulación del entorno microbiano [29–31]. Estas estrategias prometen mejorar el manejo de infecciones por biopelículas.



**Figura 3. Fases de la formación de la biopelícula de *C. albicans* [10]**

### 1.3. Probióticos

“El término probiótico hace referencia a aquellos microorganismos vivos que, administrados en cantidades adecuadas, resultan beneficiosos para la salud del huésped” [32]. Los probióticos han demostrado su efectividad en la regulación de la microbiota intestinal. Las familias más estudiadas incluyen *Lactobacillaceae* y *Bifidobacteriaceae*, las cuales desempeñan un papel fundamental en el mantenimiento del equilibrio microbiano del intestino. Investigaciones recientes han destacado la capacidad de los probióticos para mejorar la barrera intestinal, reducir la inflamación y promover una respuesta inmunitaria más equilibrada [33–36]. Además, varios estudios han mostrado que las especies de *Lactobacillus*, como *L. acidophilus*, *L. rhamnosus* y *L. reuteri*, poseen efectos antifúngicos, inhibiendo el crecimiento de *C. albicans* mediante la producción de

metabolitos como ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno y bacteriocinas[37]. Estas sustancias interfieren en la formación de biopelículas, adhesión celular y morfogénesis de la levadura.

En el ámbito oral, donde *C. albicans* puede colonizar la mucosa y formar biopelículas, los probióticos han sido utilizados como tratamiento complementario en la candidiasis orofaríngea. Es importante destacar el impacto de cepas como *Lactobacillus johnsonii* MT4, que posee actividad quitinasa capaz de comprometer la integridad de la pared celular de *C. albicans*. Este mecanismo no solo disminuye la virulencia del hongo, sino que también facilita la recuperación de la microbiota oral, como se ha demostrado en modelos murinos [38]. Asimismo, probióticos como *Lactobacillus salivarius* han mostrado alta eficacia al competir con *C. albicans* por nutrientes y sitios de adhesión, además de estimular el sistema inmunológico mediante la activación de células dendríticas y linfocitos T, reforzando así la defensa del huésped frente a infecciones oportunistas [39]. Estos hallazgos posicionan a los probióticos como una alternativa terapéutica con potencial clínico.

### **1.3.1. *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus***

*L. delbrueckii* es una Bacteria Ácido Láctica (BAL) perteneciente al género *Lactobacillus*, con amplias aplicaciones en la industria alimentaria, especialmente en la fermentación de productos lácteos y ciertos quesos. Esta bacteria es clave en la producción de yogur, un alimento que su consumo ha sido vinculado a una reducción en la mortalidad por diversas causas, incluidas las enfermedades cardiovasculares. Su principal

característica es la capacidad de fermentar carbohidratos, en especial la lactosa, generando ácido láctico como producto final. Este proceso no solo mejora la textura y el sabor de los productos fermentados, sino que también crea un ambiente ácido que inhibe el crecimiento de microorganismos no deseados, lo que contribuye a la conservación del producto[40, 41].

Más allá de su rol alimentario, esta bacteria ha despertado interés por sus propiedades probióticas. Produce metabolitos antimicrobianos como ácido láctico, con capacidad para inhibir patógenos como *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* y *Staphylococcus aureus*[42, 43]. En el ámbito oral, se ha reportado que *L. delbrueckii* puede competir por sitios de adhesión en las mucosas, impidiendo la colonización de patógenos como *Fusobacterium nucleatum*, *Streptococcus oralis* y *Streptococcus gordonii*. Estas características destacan a *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* como un microorganismo clave tanto en la salud intestinal como oral [44].

### **1.3.2. *Lactiplantibacillus plantarum***

*Lactiplantibacillus plantarum* es una bacteria láctica ampliamente conocida por su presencia en alimentos fermentados como vegetales, chucrut, masa madre y quesos, donde desempeña un papel clave en los procesos de fermentación. [45]. Además, se ha destacado por sus propiedades probióticas, como la capacidad de modular la microbiota intestinal y fortalecer la barrera intestinal[46, 47]. Estas propiedades se deben en parte a la producción de compuestos antimicrobianos como plantaricina y ácidos orgánicos, los cuales también inhiben el crecimiento de patógenos alimentarios como *Listeria monocytogenes* y

*Pseudomonas aeruginosa* [48, 49].

En el ámbito de la salud oral, *L. plantarum* ha mostrado una acción eficaz contra microorganismos patógenos como *S. mutans*, *C. albicans*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* y *Actinomyces naeslundii*. Su capacidad para producir sustancias antimicrobianas, como ácido láctico y bacteriocinas, le permite inhibir el crecimiento de estos patógenos y dificultar la formación de biopelículas en superficies dentales [50]. Asimismo, esta especie puede modular genes asociados con la virulencia de los patógenos orales, lo que refuerza su papel en la prevención de caries e infecciones orales.

De igual manera, *L. plantarum* se adhiere a células epiteliales y superficies recubiertas de saliva, donde forma biopelículas beneficiosas que compiten eficazmente con patógenos [51]. Su resistencia a la lisozima y al peróxido de hidrógeno, junto con su capacidad para reducir biopelículas perjudiciales para patógenos y proteger el esmalte dental, contribuye a disminuir el riesgo de caries [52]. Además, su actividad antiinflamatoria refuerza su potencial como probiótico en la prevención de infecciones orales.

### **1.3.3. *Lactobacillus acidophilus***

*L. acidophilus* es ampliamente reconocida por sus propiedades probióticas y su capacidad para mantener el equilibrio de la microbiota intestinal [53]. Produce ácido láctico y bacteriocinas, como la acidocina, que inhiben el crecimiento de bacterias patógenas y favorecen la salud digestiva, previniendo infecciones [53–55]. Además, su consumo mediante suplementos o alimentos ha demostrado ser efectivo en la prevención de infecciones vaginales y en el fortalecimiento del sistema inmunológico, aumentando la

producción de células inmunitarias [56, 57]. También se ha destacado su capacidad para combatir patógenos como *Clostridium difficile* y *Helicobacter pylori*, reforzando su potencial antimicrobiano en el tracto gastrointestinal [58].

En la cavidad oral, *L. acidophilus* desempeña un papel clave en el mantenimiento de una microbiota saludable. Inhibe el crecimiento de bacterias patógenas como *S. mutans* y *Porphyromonas gingivalis* mediante la producción de ácido láctico y bacteriocinas, previniendo caries y enfermedades periodontales [59, 60]. Además, tiene la capacidad de inhibir la producción de glucano por parte de *S. mutans*, lo que impide que este sea utilizado como sustrato para la formación de biopelículas. Estas propiedades lo posicionan como un candidato prometedor en terapias probióticas para la salud oral [60].

#### **1.4. Postbióticos**

“El termino postbiótico hace referencia a la preparación de microorganismos inanimados y/o sus componentes que confieren un beneficio para la salud del huésped” [61]. A diferencia de los probióticos, que dependen de la presencia de microorganismos vivos, los postbióticos actúan independientemente de la viabilidad celular, lo que les confiere mayor estabilidad y durabilidad en su aplicación [62]. Este enfoque ha generado un creciente interés en el desarrollo de productos terapéuticos y suplementos funcionales que aprovechan los beneficios de los metabolitos microbianos sin la necesidad de mantener las bacterias vivas, lo que a menudo plantea desafíos en términos de costos y eficiencia productiva.

Entre los componentes más comunes de los postbióticos se incluyen fragmentos

de membrana celular, Sobrenadante Libre de Células (CFS, por sus siglas en inglés), bacterias lisadas, Ácidos Grasos de Cadena Corta (SCFA, por sus siglas en inglés), enzimas, microorganismos inanimados y Exopolisacáridos (EPS, por sus siglas en inglés). Estos compuestos tienen efectos inmunomoduladores, antiinflamatorios y antimicrobianos, contribuyendo a la mejora de la salud intestinal y la prevención de diversas enfermedades. Los SCFA, por ejemplo, han demostrado regular el pH del colon, lo que inhibe el crecimiento de patógenos. [63], mientras que los EPS pueden actuar como prebióticos, favoreciendo el crecimiento de bacterias beneficiosas en el tracto digestivo[64]. La versatilidad de los postbióticos y sus beneficios a la salud los convierte agentes bioactivos prometedores.

#### **1.4.1. CFS**

El CFS es la fracción líquida que se obtiene después de cultivar los microorganismos. Este líquido contiene una variedad de metabolitos bioactivos, que pueden incluir ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno, diacetileno y Sustancias Inhibidoras Similares a las Bacteriocinas (BLIS, por sus siglas en inglés) [65]. La composición del CFS depende en gran medida de los nutrientes presentes en el medio de crecimiento del microorganismo, lo que influye en la producción y la actividad de los metabolitos generados durante la fermentación [62].

Varios estudios han evidenciado que el CFS de las BAL es efectivo para combatir bacterias patógenas [66], inhibiendo tanto su crecimiento como la formación de biopelículas. Por ejemplo, se ha demostrado que el CFS de *L. acidophilus* ATCC 4356 es

eficaz contra *P.aeruginosa* [67]. En otro estudio, el CFS de *L. plantarum* mostró la capacidad de inhibir el crecimiento de patógenos como *E. coli*, *S. aureus*, *Salmonella typhimurium* y *L. monocytogenes* cuando se utilizó para marinar carne de res, manteniendo además su aceptabilidad sensorial [68]. Asimismo, se ha determinado que el sobrenadante del cultivo de *L. rhamnosus* presenta propiedades anticancerígenas y puede sensibilizar a las células cancerosas a los tratamientos quimioterapéuticos [69].

Mientras que en la cavidad oral los CFS de *Lactobacillus* inhiben *S. mutans*, reduciendo su crecimiento y biopelículas sin depender del pH [70]. Cepas como *Lactobacillus fermentum* 20.4 y *Lacticaseibacillus paracasei* 11.6, 20.3, 25.4 demostraron alta eficacia en superficies de hidroxiapatita gracias a compuestos bioactivos como bacteriocinas y ácidos orgánicos [70]. Estos CFS son una alternativa segura y prometedora para combatir patógenos orales y mantener la microbiota bucal en equilibrio [71].

#### **1.4.2. Microorganismos Inanimados o Postbióticos**

El término "microorganismos inanimados" fue introducido en 2021 por la Asociación Científica Internacional de Probióticos y Prebióticos (ISAPP, por sus siglas en inglés). Aunque no ha sido completamente aceptado por la comunidad científica debido a la posible confusión con organismos abióticos, sin embargo, ha sido útil para estandarizar conceptos en las investigaciones sobre probióticos y postbióticos. [72].

##### **1.4.2.1. Métodos de Producción de Postbióticos.**

La inactivación de probióticos puede realizarse mediante métodos mecánicos y no

mecánicos. Los métodos mecánicos suelen aplicar fuerzas físicas a las suspensiones celulares, mientras que los no mecánicos incluyen métodos físicos (cavitación, sonicación y compresión por gas), químicos (uso de solventes, detergentes y cambios de pH), y biológicos (inhibidores de membrana y enzimas) [73]. Algunos métodos físicos provocan la muerte del microorganismo, pero mantiene algunos de sus beneficios para la salud. El método elegido debe preservar las propiedades funcionales de los probióticos y una combinación de técnicas puede optimizar la inactivación de los microorganismos [74].

Los postbióticos, como los microorganismos inanimados, tienen aplicaciones en diversas áreas. Investigaciones recientes destacan el uso de esta tecnología en el ámbito alimentario, donde se emplean para producir productos funcionales y seguros sin comprometer su vida útil [75]. En el campo de la medicina, se ha observado que *L. plantarum* inactivado mejora la coagregación con patógenos como *S. aureus* 25923 y *L. monocytogenes* 15313 [76]. Además, en estudios con ratones diabéticos, apósitos infundidos con *Lactococcus chungangensis* CAU 1447 inactivado por calor promovieron la cicatrización al aumentar la expresión temprana de factores y citocinas (IL-4, IL-6, IL-10 y TNF- $\alpha$ ) [77].

En la cavidad oral, los lisados bacterianos inducen una disminución significativa en los marcadores inflamatorios, como IL-6 y TNF- $\alpha$ , lo que contribuye a la regeneración de los tejidos periodontales afectados. Asimismo, inhiben el crecimiento de microorganismos patógenos, como *A. actinomycetemcomitans* y *F. nucleatum* [78]. Entre ellos, el lisado bacteriano Respibron® se presenta como una alternativa efectiva para el tratamiento de la periodontitis, ya que no solo normaliza el estrés oxidativo, sino que también promueve la reparación del tejido gingival [79]. Si bien se ha visto el beneficio

de los microorganismos inactivados por diferentes técnicas aún se desconoce con exactitud el mecanismo de acción de los mismos [80]. Este campo sigue siendo objeto de investigación para aplicaciones clínicas y alimentarias.

### 1.5. Cocultivos

Los cocultivos microbianos son una herramienta biotecnológica valiosa para replicar las condiciones en las que diversas especies microbianas interactúan, como ocurre en la naturaleza o en procesos industriales [81]. A diferencia de los cultivos puros, los cocultivos permiten aprovechar sinergias entre microorganismos, mejorando la producción de metabolitos bioactivos y la eficiencia de procesos biológicos. Esta técnica es esencial para la obtención de productos complejos, como antibióticos, enzimas o ácidos orgánicos, que serían difíciles de producir con una sola especie [82]. Además, los cocultivos facilitan el estudio de interacciones microbianas como competencia, mutualismo o antagonismo, lo que resulta clave para comprender y controlar comunidades microbianas en diversos contextos [83].

En la industria alimentaria, los cocultivos han demostrado su eficacia en la mejora de la seguridad y la calidad de los productos. Por ejemplo, en embutidos fermentados, el cocultivo de *Lactobacillus* y *Staphylococcus* reduce bacterias indeseables como *Leuconostoc* y *Weissella* durante la maduración, favoreciendo la presencia de microorganismos beneficiosos como *Lactobacillus* y *Pediococcus*. Este proceso también potencia la formación de compuestos volátiles, como el 2-nonenal, que mejoran el perfil sensorial de los productos finales [84]. En el caso de patógenos del camarón, el cocultivo de *Lactobacillus* con *Vibrio cholerae* y *Vibrio parahaemolyticus* ha mostrado ser

altamente efectivo para reducir la producción de cadaverina, una amina biógena perjudicial. Cepas como *L. plantarum* y *Leuconostoc mesenteroides* lograron disminuir en un 77-80 % los niveles de cadaverina en extracto de camarón y caldo de lisina. Estos resultados destacan el potencial de los cocultivos para mejorar la seguridad alimentaria, regular comunidades microbianas y optimizar procesos industriales, consolidándose como una estrategia clave en biotecnología aplicada [85].

## CAPÍTULO 2

### ANTECEDENTES

*C. albicans* es un hongo que puede afectar diversas mucosas del cuerpo, incluyendo la oral, intestinal, vaginal y la piel [10]. En 2022, la OMS incluyó a *C. albicans* en su lista de patógenos fúngicos prioritarios debido a su creciente resistencia a los tratamientos disponibles[86]. Este microorganismo es difícil de combatir, ya que su diagnóstico temprano es complicado por la sintomatología inespecífica y su capacidad para evadir el sistema inmunológico [87]. Los principales antimicóticos utilizados para tratar infecciones por *C. albicans* incluyen azoles, polienos, equinocandinas, pirimidinas como la 5-fluorocitosina y alilaminas [88]. Sin embargo, el uso prolongado de algunos de estos antimicóticos, como los azoles y la 5-fluorocitosina, puede causar efectos adversos significativos, como la hepatotoxicidad [16, 89]. Además, la resistencia de *Candida* spp. a los antimicóticos ha ido en aumento. Según un informe de 2019 del Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC, por sus siglas en inglés) de EE. UU., más de 34,000 casos y 1,700 muertes anuales se deben a infecciones por *Candida* resistentes a los medicamentos[90].

Debido a la creciente resistencia de *C. albicans* a los antimicóticos convencionales, se ha propuesto el uso de terapias alternativas como los probióticos y postbióticos [91]. Entre las cepas de probióticos que han mostrado potencial terapéutico se encuentran *L. plantarum* 299V (DSM 9843), *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ATCC 11842 y *L. acidophilus* ATCC 4356. Estas cepas están clasificadas como Generalmente Reconocidas como Seguras (GRAS, por sus siglas en inglés) por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los EE. UU. (FDA, por sus siglas en inglés), debido a su capacidad para sobrevivir al paso por el sistema gastrointestinal[92–94]. Diversos estudios han demostrado que estas cepas son capaces de inhibir el crecimiento de patógenos, incluyendo varias especies de *Enterobacteriaceae*, regular la microbiota intestinal y frenar el crecimiento de otros microorganismos como *Bacillus subtilis* [84, 95, 96]

Además de sus efectos frente a bacterias patógenas, estas cepas también han demostrado la capacidad de inhibir el crecimiento de *C. albicans*. Informes recientes sobre la interacción entre *C. albicans* y *L. plantarum* han evidenciado su efectividad. En 2018, un estudio con *L. plantarum* MG989 demostró que esta cepa inhibía aislados de *C. albicans* provenientes de mujeres con vulvovaginitis [97] En 2020, una investigación en ratas reveló que *L. plantarum* CCFM8724 podía prevenir y combatir caries inducidas por *C. albicans* y *S. mutans* [98]. En 2022, un estudio con cocultivos de *C. albicans*, *S. mutans* y *L. plantarum* 8014 mostró una inhibición significativa de *C. albicans*[31]. Más recientemente, en 2024, se llevaron a cabo cocultivos de *L. plantarum* y *C. albicans* que analizaron tanto las interacciones como la expresión génica de cada microorganismo [99].

Las interacciones entre *L. acidophilus* y *C. albicans* han sido ampliamente investigadas. En 2015, un estudio demostró que *L. acidophilus* ATCC 4356 inhibía la

formación de biopelículas de *C. albicans* y atenuaba la candidiasis en el modelo in vivo de *Galleria mellonella* [100]. Posteriormente, en 2019, se encontró que esta misma cepa tenía la capacidad de inhibir el crecimiento de diversas cepas de *C. albicans* provenientes de aislados vaginales[101]. En 2023, se observaron diferencias significativas en la inhibición de la biomasa de *C. albicans* tras la exposición al CFS de *L. acidophilus* después de 24 horas de incubación [17].

Otra cepa que ha sido estudiada por su interacción con *C. albicans* es *L. delbrueckii*. Un estudio de 2019 mostró una reducción significativa de la infección por *C. albicans* en ratas después del consumo oral o tratamiento intravaginal con este probiótico [102]. En 2023, se cocultivó *C. albicans* ATCC 10231 con *L. delbrueckii* VG2, y se encontró una inhibición de 1 ciclo logarítmico del crecimiento de *C. albicans* [103]. Y en este año, Yocheva et al. (2024) demostraron que diversas cepas de *L. delbrueckii* aisladas de productos lácteos, humanos y vegetales tenían un efecto inhibitorio sobre *C. albicans* ATCC 10231 cuando se evaluó su interacción en cocultivo[104].

A lo largo de los años, se han realizado numerosos estudios sobre las interacciones entre las BAL y *Candida albicans*. Sin embargo, la mayoría de estas investigaciones han enfocado su atención principalmente en los efectos inhibitorios que generan los metabolitos de las BAL, como el peróxido de hidrógeno, el ácido láctico, las bacteriocinas, los biosurfactantes, los exopolisacáridos y los ácidos grasos[99, 104–107] . Los hallazgos sugieren que la capacidad de las BAL para inhibir a *C. albicans* varía según diversos factores, incluyendo la especie y cepa de la bacteria, la concentración celular, el tiempo de exposición y las condiciones ambientales en las que ocurre la interacción [104, 108, 109].

Además, se han observado discrepancias entre el porcentaje de inhibición de *C. albicans* en medios sólidos en comparación con medios semisólidos o líquidos, encontrándose mayor inhibición en los medios líquidos [104, 106]. La mayoría de los estudios se han centrado en cepas de *C. albicans* provenientes de colecciones como la ATCC o aislados vaginales, mientras que los aislados clínicos orales han sido menos estudiados [100, 110]. Asimismo, no se ha evaluado de manera exhaustiva el efecto antimicótico de los postbióticos, ya que la mayoría de los estudios se han centrado en los probióticos o en algunos de sus metabolitos [46, 99].

Aunque se han realizado cocultivos entre BAL y *C. albicans*, aún no se ha evaluado cómo varía el comportamiento de diferentes cepas de *Lactobacillus* o *Lactiplantibacillus* a lo largo del tiempo, ya que muchos estudios solo han realizado conteos a las 0 y 24 horas [104]. Además, aunque se ha reportado inhibición a diferentes concentraciones de *L. acidophilus* y *L. plantarum*, no siempre se detallan los resultados de los controles de crecimiento, lo que dificulta las comparaciones en términos de porcentaje de inhibición entre distintas cepas de probióticos [111].

Por lo tanto, resulta necesario llevar a cabo un estudio que compare de manera más exhaustiva las diferencias en la inhibición de *C. albicans* en medios líquidos y sólidos, así como el efecto inhibitorio de los probióticos, postbióticos y CFS bajo distintas condiciones experimentales. En este contexto, el presente estudio se propone investigar las interacciones antagónicas entre *L. plantarum*, *L. acidophilus*, *L. delbrueckii* y *C. albicans*, cocultivando estos microorganismos y evaluando su comportamiento a lo largo del tiempo. También se evaluará el efecto antimicótico de los CFS, los postbióticos y los probióticos. Con el fin de establecer una base científica para el desarrollo de terapias

alternativas, solas o en combinación con antibióticos, que contribuyan al tratamiento de infecciones por *C. albicans* en la mucosa oral.

## **CAPÍTULO 3**

### **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

#### **3.1. Hipótesis**

Las bacterias, el postbiótico y/o sobrenadante libre de células de *L. plantarum* 299V (DSM 9843), *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ATCC 11842 y *L. acidophilus* ATCC 4356 al cocultivarse con *C. albicans* son capaces de desarrollar una relación antagónica en el medio MRS fortificado.

#### **3.2. Objetivo General**

Determinar los efectos antagónicos de las bacterias *L. plantarum* 299V (DSM 9843), *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ATCC 11842, *L. acidophilus* ATCC 4356, el postbiótico y/o sobrenadante libre de células al cocultivarse con el patógeno *C. albicans* en MRS fortificado.

### 3.3. Objetivos Específicos

1. Establecer un medio de cultivo que permita el crecimiento óptimo de *L. plantarum* 299 V (DSM 9843), *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ATCC 11842, *L. acidophilus* ATCC 4356 y *C. albicans*.
2. Evaluar el desarrollo a través del tiempo de *L. plantarum* 299 V (DSM 9843), *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ATCC 11842, *L. acidophilus* ATCC 4356 y *C. albicans* en el medio MRS fortificado tanto de manera individual como en conjunto.
3. Evaluar la CMI de las BAL, el postbiótico y/o el sobrenadante libre de células de *L. plantarum* 299 V (DSM 9843), *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ATCC 11842, *L. acidophilus* ATCC 4356 contra *C. albicans*.
4. Caracterizar uno de los mecanismos de interacción entre *C. albicans* y las BAL, el postbiótico y/o el sobrenadante libre de células de *L. plantarum* 299 V (DSM 9843), *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ATCC 11842 y *L. acidophilus* ATCC 4356.

## CAPÍTULO 4

### METODOLOGÍA

#### 4.1. Estrategia General del proyecto

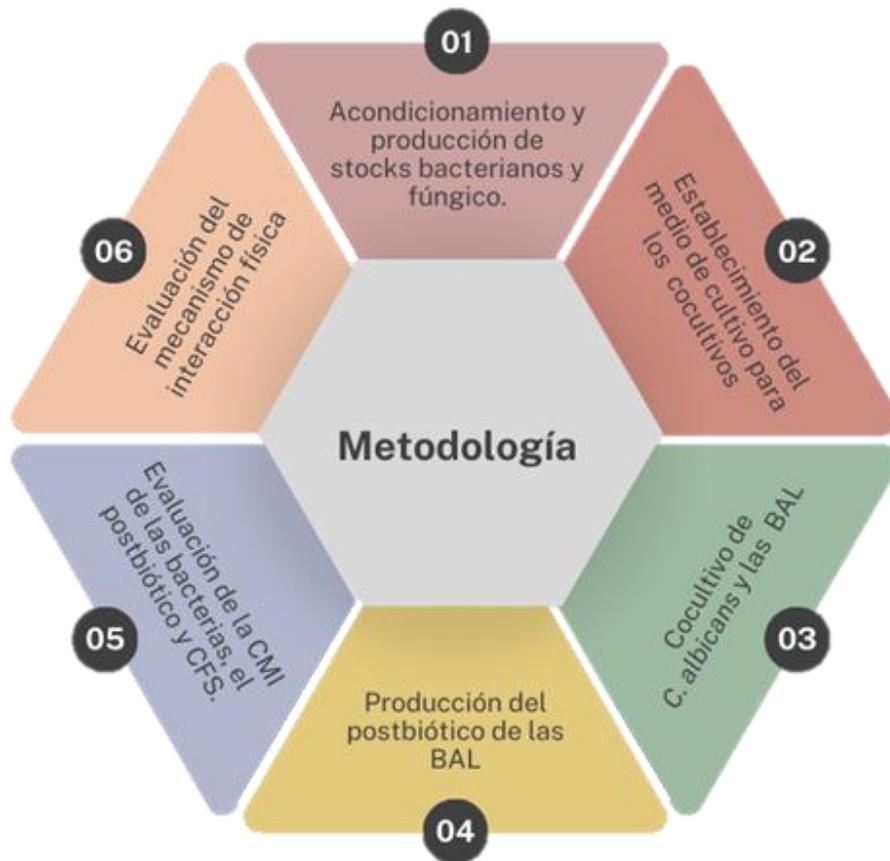


Figura 4. Estrategia general de trabajo

## 4.2. Localización

Este proyecto se realizó en el Laboratorio de Biología Sintética y de Sistemas (LBSS), perteneciente al Laboratorio de Innovación y Desarrollo Biotecnológico del Centro de Investigación en Biotecnología y Nanotecnología (CIBYN) de la Facultad de Ciencias Químicas de la U.A.N.L. Los experimentos con *C. albicans* se llevaron a cabo en el Centro de Biotecnología FEMSA del Tecnológico de Monterrey.

### 4.3. Material, reactivos y equipo utilizado

**Tabla 1. Material**

<b>Material</b>	<b>Marca</b>
Micropipetas capacidad 2-20, 20-200 y 100-1000 $\mu$ L	Thermo Fisher
Puntillas para micropipeta	Corning
Filtros de jeringa de 0.22 $\mu$ m	Merck Millipore
Cajas Petri de poliestireno	BD
Matraces Erlenmeyer 125, 250 y 500 mL	Pyrex
Tubos para cultivo	HACH
Tubos para centrifuga de 15 y 50 mL	Corning
Placas de 96 pocillos	Corning
Celdas para espectrofotómetro	Brand
Bureta graduada de 100 mL	Kavalier

**Tabla 2. Reactivos**

<b>Reactivo</b>	<b>Marca</b>
Agar bacteriológico	BD Bioxon
Caldo De Man, Rogosa Y Sharpe (MRS)	Merck
Caldo Yeast Mold (YM)	Neogen
Caldo Trypticase Soy Broth (TSB)	BD Bioxon
Cristal Violeta	CTR
Etanol al 96 %	CTR
Pastillas de Phosphate Buffered Saline (PBS)	Merck
Fenolftaleina Solución 1 % Etanólica	Merck
Peptona bacteriológica	MCD LAB
Fluconazol	Sigma Aldrich
Eritromicina	Sigma Aldrich
Agua desionizada	No aplica

**Tabla 3. Equipos**

<b>Equipo</b>	<b>Marca</b>	<b>Modelo</b>
Incubadora	Shell LabLabtech	1575
Balanza analítica	Mettler Toledo	ML54 /03
Vortex	Lab-Line	1195
Contador de colonias	Leica	3327
Campana de flujo laminar	Labconco	3621204
Autoclave	Sanyo	MLS-3751
Espectrofotómetro	Optizen	2120 UV Plus
Lector de placas	Thermo Fisher	Multiskan GO
Centrífuga	ThermoElectron	Centrac-034
Potenciometro Orion Star	Thermo Fisher	A210
Ultracongelador	ThermoFisher	TDE40086FA
Microondas	Daewoo	KOR-1NOAW
Ultrasonicador	QSonica	Q125

#### **4.4. Acondicionamiento y Producción de Stocks Bacterianos y Fúngico**

Las BAL *L. plantarum* 299V (DSM 9843), *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (ATCC 11842) y *Lactobacillus acidophilus* (ATCC 4356) fueron proporcionadas por el grupo de investigación Nutrinomics del Instituto Tecnológico de Monterrey.

Por otro lado, *C. albicans* fue donada por el Hospital San Vicente en Monterrey, Nuevo León, México[112]. El protocolo de aislamiento de la levadura en el hospital consistió en tomar una muestra bucal de un paciente con un hisopo de algodón, frotando la cara interna de la mejilla. Luego, la muestra fue sembrada en CHROMagar Candida utilizando la técnica de estría cruzada. La identificación de esta cepa se realizó mediante el sistema VITEK 2 (BioMérieux, Marcy-l'Étoile, Francia), que también fue utilizado para

evaluar la susceptibilidad de la cepa a diversos antifúngicos, incluyendo fluconazol ( $\leq 0.5$   $\mu\text{g/mL}$ ), voriconazol ( $\leq 0.12$   $\mu\text{g/mL}$ ), caspofungina ( $\leq 0.12$   $\mu\text{g/mL}$ ), micafungina ( $0.06$   $\mu\text{g/mL}$ ), anfotericina B ( $\leq 0.25$   $\mu\text{g/mL}$ ) y flucitosina ( $\leq 1$   $\mu\text{g/mL}$ ), a través de la tarjeta AST-Y08.

Los cultivos bacterianos y fúngicos se activaron incubándolos durante 24 horas a  $37^{\circ}\text{C}$  en medios específicos: caldo MRS para las bacterias y medio YM para la levadura. Posteriormente, tanto las bacterias como la levadura se lavaron tres veces con PBS, eliminando el sobrenadante tras cada centrifugación, la cual se realizó a  $10,000 \times g$  durante 10 minutos. Finalmente, cada microorganismo se resuspendió en una solución compuesta por 18 mL de PBS y 2 mL de glicerol. Esta mezcla se distribuyó en alícuotas de 1 mL en tubos Eppendorf y se almacenó a  $-70^{\circ}\text{C}$  en un ultracongelador para su conservación [113].

#### **4.5. Establecimiento del Medio de Cultivo que Permita el Cocultivo de los Microorganismos**

Para establecer un medio de cultivo adecuado que permitiera el cocultivo de *C. albicans* y las BAL, se realizaron pruebas en diferentes medios. Uno de los medios evaluados fue el agar TSBYE siguiendo con la metodología propuesta por Zeng et al., (2022) [31], compuesto por tripteína (17 g/L), peptona de soya (3 g/L), cloruro de sodio (5 g/L), fosfato dipotásico (2.5 g/L), glucosa (20 g/L) y extracto de levadura (0.5 g/L). También se probó el agar MRS, que incluye peptona (10.0 g/L), extracto de carne (5.0 g/L), extracto de levadura (5.0 g/L), glucosa D (+) (20.0 g/L), fosfato dipotásico (2.0 g/L), citrato de amonio (2.0 g/L), acetato de sodio (5.0 g/L), sulfato de magnesio (0.1 g/L) y sulfato de manganeso monohidratado (0.05 g/L). Además, se evaluó una versión

suplementada del agar MRS, que incluye peptona bacteriológica (10.0 g/L) y extracto de levadura (5.0 g/L), así como el agar YM, compuesto por extracto de malta (3.0 g/L), extracto de levadura (3.0 g/L), peptona (5.0 g/L) y dextrosa (10.0 g/L). A todos los medios se les añadió agar (2.0 g/L). El crecimiento de los microorganismos se evaluó mediante diluciones seriadas, sembrando 100  $\mu$ L de cada muestra en cajas Petri que contenían agar TSBYE, MRS, MRS fortificado y YM. Después de 48 horas de incubación a 37 °C, se realizaron los conteos de Unidades Formadoras de Colonias (UFC/mL) y se compararon con el crecimiento en los medios óptimos para estos microorganismos, específicamente YM para *C. albicans* y MRS para las BAL. Asimismo, se comparó el tamaño de las colonias en cada medio.

#### **4.6. Cocultivo de *C. albicans* y BAL**

Las combinaciones de los cocultivos se realizaron como se describe en la Tabla 4. Para el cocultivo se partió de los stocks de microorganismos previamente congelados y se les activó en 10 mL de caldo MRS las BAL y en 10 mL de YM para *C. albicans* a 37°C por 24 h sin agitación. Los cocultivos se realizaron en 250 mL de caldo MRS fortificado, se añadió una de las BAL a una concentración de  $1 \times 10^3$  UFC/mL, junto con *C. albicans* a una concentración de  $1 \times 10^2$  UFC/mL. Como control, se sembraron las BAL y *C. albicans* de forma individual a las mismas concentraciones con el fin de comparar el crecimiento de los microorganismos de forma individual y en cocultivo. Los cultivos se incubaron a 37°C durante 24 horas, y cada 6 horas se tomó una muestra de 30 mL de los cocultivos y controles para medir el pH, la acidez titulable y crecimiento.

Para determinar el crecimiento de los microorganismos, se realizó recuento en placa para lo cual se realizaron diluciones seriadas en agua peptonada (peptona bacteriológica 0.1 p/v) ya sea del cultivo o cocultivo, se tomaron 100  $\mu$ L y se sembraron en el agar correspondiente. Los conteos de las BAL en el cocultivo se realizaron en el medio MRS con fluconazol 2 mg/mL para inhibir el crecimiento de *C. albicans*, mientras que para *C. albicans* se empleó agar YM con eritromicina 1 mg/mL para inhibir el crecimiento de las BAL. El crecimiento de los cultivos control se llevó a cabo en agar MRS para las BAL y en agar YM para la levadura[114, 115].

**Tabla 4. Cocultivo *C. albicans* y *L. plantarum*, *L. delbrueckii*, *L. acidophilus***

Cocultivo	Microorganismos
1	<i>C. albicans</i> $1 \times 10^2$ UFC/mL + <i>L. acidophilus</i> $1 \times 10^3$ UFC/mL
2	<i>C. albicans</i> $1 \times 10^2$ UFC/mL + <i>L. delbrueckii</i> $1 \times 10^3$ UFC/mL
3	<i>C. albicans</i> $1 \times 10^2$ UFC/mL + <i>L. plantarum</i> $1 \times 10^3$ UFC/mL

La medición de la acidez se realizó de la siguiente manera se tomó una muestra de 10 mL del cultivo o cocultivo, se transfirió a un matraz Erlenmeyer y se añadió 50 mL de agua bidestilada para asegurar una correcta dilución. Posteriormente, se agregaron de 2 a 3 gotas de fenolftaleína como indicador. La solución se tituló con una base estándar NaOH a 1 N. La base se añadió de manera gradual, gota a gota, mientras se agitaba constantemente la solución para garantizar una mezcla homogénea. El punto final de la titulación se alcanzó cuando la solución adquirió un color rosa persistente por 30 seg, indicando que los ácidos presentes en la muestra habían sido neutralizados [116]. Para calcular el porcentaje de ácido láctico se utilizó la siguiente fórmula:

$$\% \text{ ácido láctico} = \left( \frac{V_2 \times N \times mEq}{V_1} \right) \times 100 \quad (1)$$

En donde

$V_1$ = Volumen de la muestra

$V_2$ = Volumen de NaOH dispensado

N= Normalidad de la solución de NaOH

mEq= 0.090 gr de ácido láctico

## **4.7. Producción de Sustancias Antifúngicas postbióticos, CFS y BAL**

### **4.7.1. Postbiótico**

#### **4.7.1.1. Sonicación.**

Para la producción de los postbióticos, se partió del stock de *L. acidophilus* previamente congelado y se activó en 10 mL de caldo MRS durante 24 horas a 37°C sin agitación. Posteriormente, se centrifugó a 10,000 x g durante 10 minutos, se eliminó el sobrenadante y la biomasa se resuspendió en 20 mL de PBS. Este proceso se repitió tres veces.

La biomasa final se resuspendió en PBS al 1.7 % (p/v) y se congeló a -20°C por 12 horas, no se utilizó ningún tipo de crioprotector con el fin de propiciar la lisis celular. Posteriormente, se descongeló a 24°C en un baño maría durante dos horas. Tras el descongelamiento, las muestras fueron vortexeadas con el fin de uniformizarlas y sometidas a la sonicación para lisar las células. Las condiciones específicas de sonicación se detallan en la Tabla 5, utilizando el equipo Q125 Sonicator (QSonica). Para evaluar la inactivación bacteriana, se realizó recuento en placa para lo cual se realizaron diluciones seriadas en agua peptonada del control que no recibió ningún

tratamiento, de la muestra luego de congelación y de la muestra que fue sometida a congelación y sonicación.

**Tabla 5. Condiciones de sonicación para la producción de postbióticos**

<b>Tratamiento</b>
59 seg on
20 seg off
14 min
70 % amplitud
20 kHz

#### **4.7.1.2. Autoclavado.**

Para la producción de postbióticos, se activaron los stocks de cada una de las BAL y se procedió al lavado de la biomasa según el procedimiento descrito previamente en la sección 4.7.1.1. Posteriormente, la biomasa fue sometida a 121°C y 15 psi durante 15 minutos en la autoclave para asegurar la eliminación completa de microorganismos viables. Finalmente, la biomasa se resuspendió en medio YM al 3 % (p/v) para su uso posterior. Se realizaron conteos en placa haciendo diluciones con agua peptonada con fin de corroborar que todos los microorganismos fueron muertos por calor.

#### **4.7.2. Producción del CFS pH normal y CFS a pH 7**

Para la producción del CFS, se activaron los stocks de cada una de las BAL como se describió anteriormente en la sección 4.6. Posteriormente, se centrifugó a 10,000 x g durante 10 minutos, se recolectó el sobrenadante y se filtró utilizando una membrana de 0.22  $\mu\text{m}$  y se almacenó a 5 °C para su uso posterior. Para descartar la actividad antimicrobiana de los ácidos presentes en el CFS, se siguió el mismo procedimiento; sin embargo, antes de la filtración, se ajustó el pH a 7 utilizando NaOH a una concentración de 8 M y luego se filtró a 0.22  $\mu\text{m}$ .

#### **4.7.3. Producción de las BAL**

Para este procedimiento, se activaron los stocks de cada una de las BAL y se procedió al lavado de la biomasa según el procedimiento descrito previamente en la sección 4.7.1.1. Se centrifugó a 10,000 x g, se eliminó el sobrenadante y, posteriormente, se ajustó la concentración mediante la Densidad Óptica (OD) a un valor de  $1.4 \approx 1 \times 10^9$  UFC/mL y  $0.16 \approx 1 \times 10^6$  UFC/mL. La OD fue leída a 600 nm utilizando un lector de microplacas.

#### **4.8. Evaluación de la actividad antimicrobiana del CFS, CFS pH 7 y Postbiótico de cada una de las BAL mediante el Método Difusión en Pocillos de Agar**

Para este ensayo se siguió la metodología de Yocheva et al., (2024) [104], con algunas modificaciones. Primeramente, se utilizó agar YM en doble capa, para lo cual

se vertió una capa de agar YM en una caja Petri y se dejó solidificar antes de añadir una segunda capa. A continuación, se inoculó *C. albicans* a una concentración de  $1 \times 10^7$  UFC/mL. Con un hisopo previamente esterilizado, se dispersó el inóculo en tres direcciones: horizontal, vertical y diagonal, asegurando que no quedaran espacios sin inocular. Luego, se perforaron pocillos de 6 mm de diámetro utilizando puntillas de micropipeta estériles. En cada pocillo, se añadieron 100  $\mu$ L de las sustancias antimicrobianas producidas por las BAL (microorganismo inactivado, CFS, CFS pH7 y las BAL). Se dejaron incubar las cajas Petri a 37°C por 24 horas sin agitación.

#### **4.9. Evaluación de la Actividad Antimicrobiana del CFS, CFS pH 7 y Postbiótico de cada una de las BAL Mediante el Método de Concentración Mínima Inhibitoria (CMI).**

Para esta metodología, se siguió el protocolo descrito por (García-Gamboa et al., 2022) [117], con algunas modificaciones. Inicialmente, se realizaron diluciones del CFS, CFS a pH 7 y del postbiótico, a una concentración del 100 % (sin diluir) y diluidas en el medio YM al 90 %, 80 %, 70 % y 60 % v/v. Luego, en una microplaca de 96 pocillos, se colocaron 100  $\mu$ L de cada dilución antifúngica en sus respectivas concentraciones. Esto resultó en concentraciones finales del 50 %, 45 %, 40 %, 35 % y 30 % v/v junto con 100  $\mu$ L de una suspensión de *C. albicans* a una concentración de  $1 \times 10^6$  UFC/mL previamente incubado a 37°C por 24 h sin agitación a partir de un stock congelado en medio YM. Las microplacas fueron incubadas a 37°C durante 24 horas sin agitación.

Todos los ensayos se realizaron por triplicado, y se incluyeron controles de crecimiento y esterilidad. Transcurrido el tiempo se realizó la lectura de la OD en un

lector de microplacas a 600 nm.

Para corroborar si los postbióticos inhibían a *C. albicans*, se realizó un conteo en placa. Se utilizó un cocultivo en partes iguales, mezclando 4 mL de una suspensión de *C. albicans* a una concentración de  $1 \times 10^6$  UFC/mL y 4 mL de los postbióticos de las BAL a una concentración del 50 % v/v, producidos según lo descrito en la sección 4.7.1.2. La mezcla se incubó durante 24 horas a 37°C. Se realizaron diluciones seriadas en agua peptonada y se sembraron muestras tanto al inicio (0 horas) como después de las 24 horas de incubación.

#### **4.10. Evaluación Microscópica**

Con el objetivo de evaluar la posible coagregación entre los postbióticos derivados de las BAL y *C. albicans*, se realizaron tinciones a partir de cultivos mixtos de las mismas. Para ello, primero se fijaron las muestras en un porta objetos mediante calor, luego se aplicó Cristal Violeta CV durante 1 minuto. Posteriormente, se lavaron con agua destilada y se fijaron nuevamente al calor. Finalmente, las muestras se observaron bajo un microscopio óptico con un aumento de 100x, utilizando aceite mineral.

#### **4.11. Análisis estadístico**

En este estudio, todos los tratamientos y el control se llevaron a cabo por triplicado. Para determinar las diferencias significativas en los datos recolectados, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de un solo factor, seguido de un análisis post hoc de Tukey HSD (Honestly-Significant-Difference) con un intervalo de confianza del

95 %. Las pruebas estadísticas se realizaron utilizando Microsoft Excel, versión 2408.

#### **4.12. Manejo y disposición de residuos**

Los desechos generados por la ejecución de este proyecto fueron depositados en los contenedores proporcionados por el Departamento de Medio Ambiente y Seguridad de la Facultad de Ciencias Químicas, siguiendo lo establecido en el Procedimiento para la Clasificación de Residuos peligrosos PR-CLB-SRR/000.

## **CAPÍTULO 5**

### **RESULTADOS**

#### **5.1. Establecimiento del Medio de Cultivo que Permita el Cocultivo De Los Microorganismos**

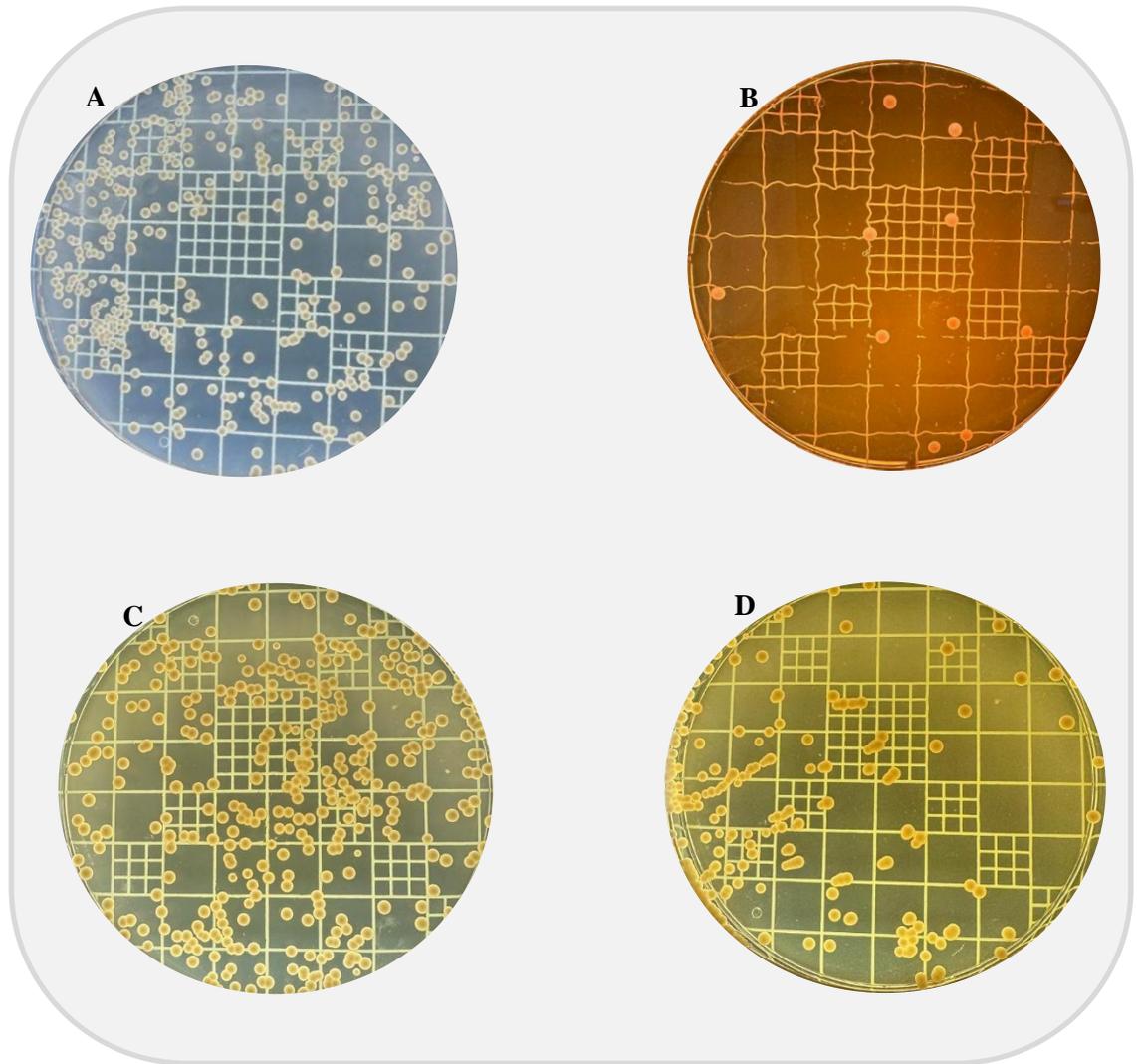
Con el objetivo de establecer un medio adecuado para el cocultivo de *C. albicans* y las BAL, se probaron diferentes medios de cultivo. El crecimiento se evaluó mediante el conteo de UFC/mL en placa, y se comparó con los medios control: YM para *C. albicans* y MRS para *L. acidophilus*. La levadura *C. albicans* no mostró diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en su crecimiento entre los medios de prueba: MRS suplementado, TSBYE, MRS y YM, siendo este último su medio óptimo de crecimiento. En cambio, la bacteria *L. acidophilus* sí presentó diferencias en los medios YM y TSBYE, mientras que en el MRS suplementado no mostró diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) con respecto al control en el medio MRS (Tabla 6).

**Tabla 6. Crecimiento de *C. albicans* y *L. acidophilus* (Log10 UFC/m/L) en los medios evaluados para el cocultivo**

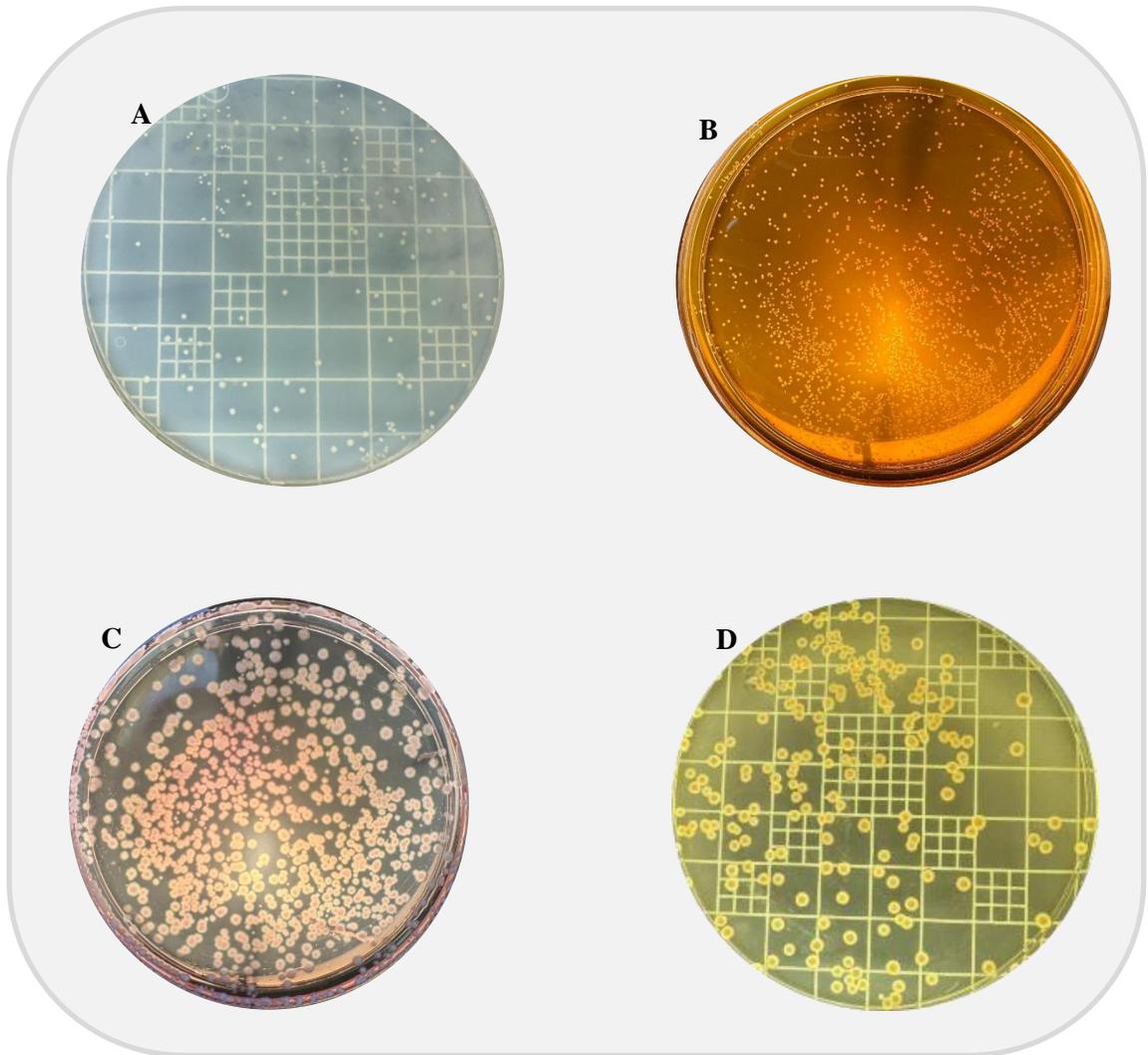
Microorganismo	Medio de cultivo			
	MRS suplementado	TSBYE	MRS	YM
<i>C. albicans</i>	8.31 ± 0.04 <sup>a</sup>	8.30 ± 0.15 <sup>a</sup>	8.13 ± 0.04 <sup>a</sup>	8.36 ± 0.12 <sup>a</sup>
<i>L. acidophilus</i>	9.91 ± 0.06 <sup>a</sup>	9.61 ± 0.07 <sup>b</sup>	9.92 ± 0.06 <sup>a</sup>	9.71 ± 0.0 <sup>b</sup>

\* Letras distintas indican diferencias significativas (p<0.05)

En cuanto a la morfología de las colonias, *C. albicans* presentó colonias blancas, blandas, cremosas y lisas, mostrando características similares en los medios MRS suplementado, TSBYE, MRS y YM (Figura 5). Por otro lado, *L. acidophilus* desarrolló colonias más pequeñas en los medios TSBYE y YM, mientras que en MRS y MRS suplementado las colonias fueron lisas, convexas y con bordes no definidos (Figura 6). Con base en los resultados de crecimiento y morfología observados, se decidió utilizar el medio MRS suplementado para realizar los cocultivos.



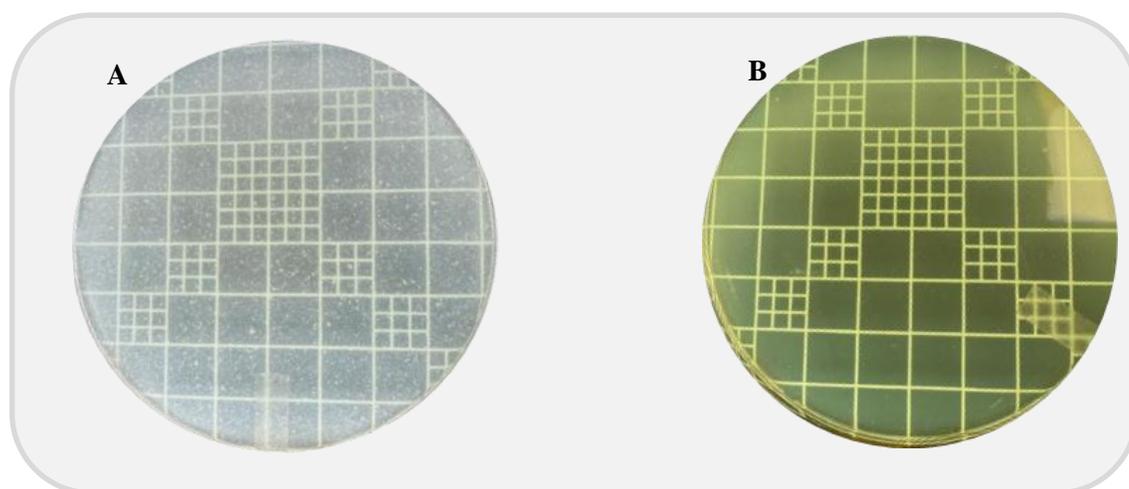
**Figura 5. Comparación de la morfología de las colonias de *C. albicans* en los medios A) YM, B) TSBYE, C) MRS, D) MRS suplementado.**



**Figura 6. Comparación de la morfología de las colonias de *L. acidophilus* en los medios A) YM, B) TSBYE, C) MRS, D) MRS suplementado.**

## 5.2 Cocultivo de *C. albicans* y BAL

Antes de proceder con el cocultivo de *C. albicans* con las BAL, fue necesario establecer las concentraciones adecuadas de antibióticos para permitir el conteo de las *L. acidophilus* e inhibir el crecimiento de *C. albicans*. Para ello, se utilizó MRS con fluconazol a una concentración de 2 mg/mL. Por otro lado, para realizar el conteo de *C. albicans* y suprimir el crecimiento de *L. acidophilus*, se utilizó YM con 1 mg/mL de eritromicina. Los microorganismos fueron sembrados en el medio que los inhibía para confirmar la ausencia de crecimiento de estos (Figura 7).



**Figura 7. Confirmación de la inhibición del crecimiento de los microorganismos mediante el uso antibióticos A) *L. acidophilus* en medio YM con eritromicina 1 mg/mL, B) *C. albicans* en medio MRS con fluconazol 2 mg/mL.**

El siguiente paso fue confirmar si había un crecimiento normal de los microorganismos en los medios con antibióticos. Para esto, *C. albicans* se sembró en medio YM con eritromicina (1 mg/L) y se comparó con su control en medio YM sin antibiótico, mientras que *L. acidophilus* se sembró en medio MRS con fluconazol (2 mg/L) y se comparó con su control en medio MRS. El crecimiento de *C. albicans* en el

medio YM con 1 mg/L de eritromicina no mostró diferencias estadísticas significativas ( $p < 0.05$ ). De forma similar, no se encontraron diferencias estadísticas significativas en el crecimiento de *L. acidophilus* en el medio MRS con 2 mg/L de fluconazol comparado con su control en medio MRS sin antibiótico (Tabla 7).

**Tabla 7. Crecimiento de *C. albicans* y *L. acidophilus* ( $\text{Log}_{10}$  UFC/mL) en los medios con antibiótico y los medios control**

Microorganismo	Medio de cultivo			
	MRS + 2 mg/L fluconazol	MRS	YM + 1mg/L eritromicina	YM
<i>C. albicans</i>	-	-	$7.72 \pm 0.21^a$	$7.76 \pm 0.14^a$
<i>L. acidophilus</i>	$9.19 \pm 0.17^a$	$9.40 \pm 0.21^a$	-	-

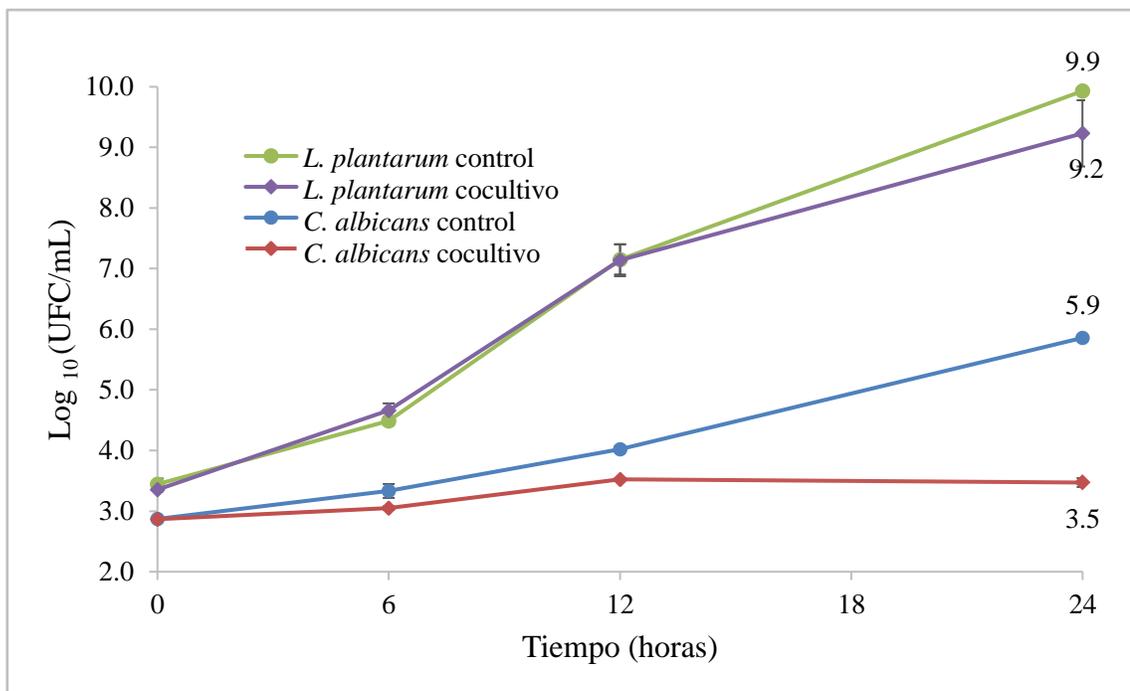
\* Letras distintas indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ )

Finalmente, se realizaron los cocultivos para evaluar la inhibición de las BAL contra *C. albicans*, se llevaron a cabo conteos en placa utilizando los medios descritos en la sección 4.6. Los resultados obtenidos se ilustran en las Figuras 8, 9 y 10, que muestran los cocultivos de *L. plantarum*, *L. delbrueckii* y *L. acidophilus* respectivamente, en su interacción con *C. albicans*, de igual manera se incluyeron controles de cada microorganismo.

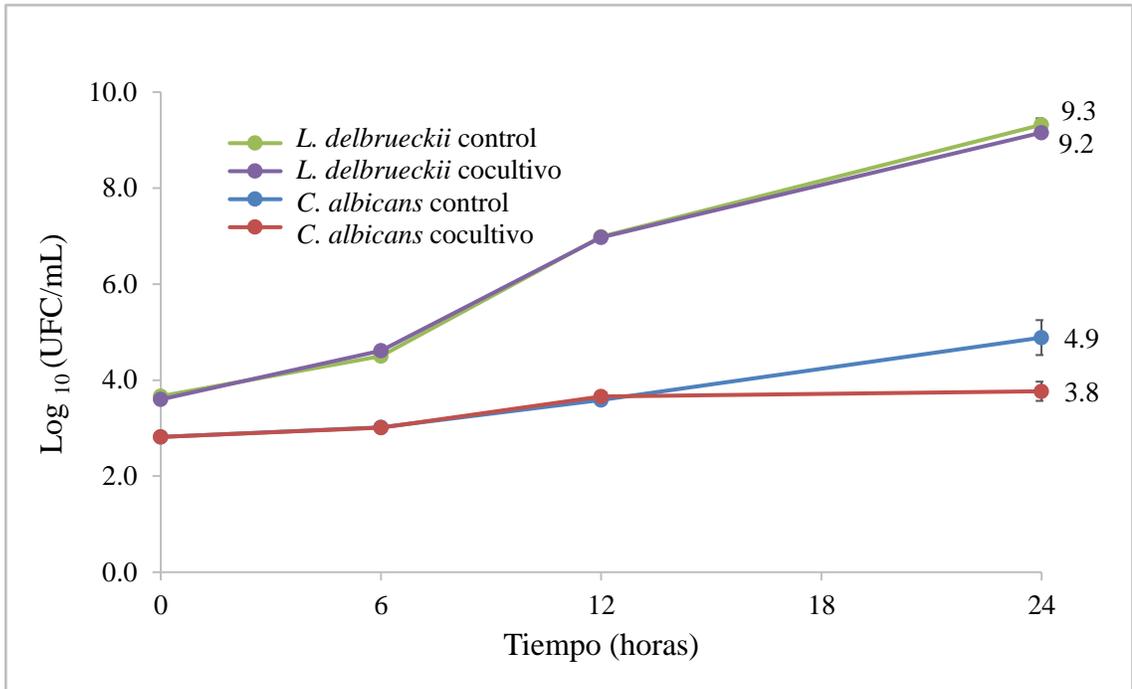
En la Figura 8, se observa que la inhibición hacia *C. albicans* por *L. plantarum* comienza a partir de las 12 horas, momento en el que su crecimiento empieza a disminuir. Un comportamiento similar se muestra en las Figuras 9 y 10, para *L. delbrueckii* y *L.*

*acidophilus*, donde la inhibición de *C. albicans* también ocurre a partir de las 12 horas.

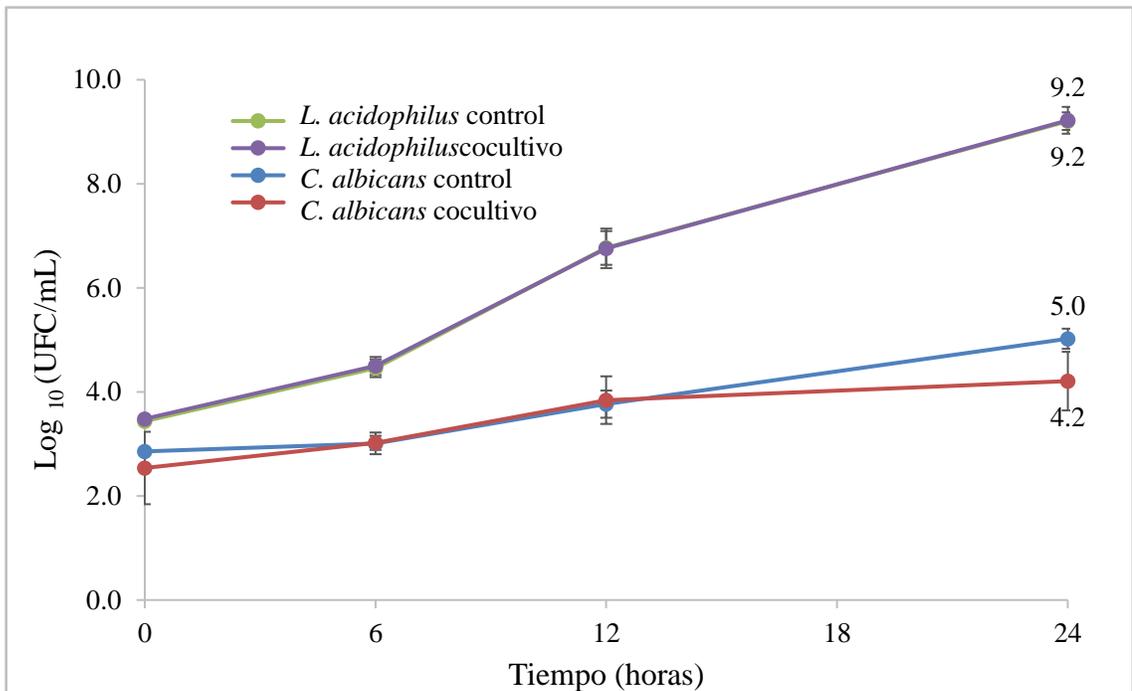
A lo largo de estos cocultivos, el crecimiento de las BAL fue similar al de los controles, lo que indica que su desarrollo no se vio afectado por la presencia de *C. albicans*. Tanto las BAL como *C. albicans* pasaron por una fase de adaptación de aproximadamente 6 horas en los cocultivos y en sus cultivos individuales. Después de esta fase de adaptación, todos los microorganismos entraron en la fase exponencial de crecimiento, que se extendió desde las 6 hasta las 24 horas. La inhibición por parte de *L. plantarum* fue de 2.39 ciclos logarítmicos a las 24 horas, seguida por *L. delbrueckii*, con una inhibición de 1.28 ciclos logarítmicos, mientras que *L. acidophilus* mostró una reducción de 0.81 ciclos logarítmicos.



**Figura 8.** Curva de crecimiento de *L. plantarum* vs. *C. albicans* en cocultivo y de forma individual.

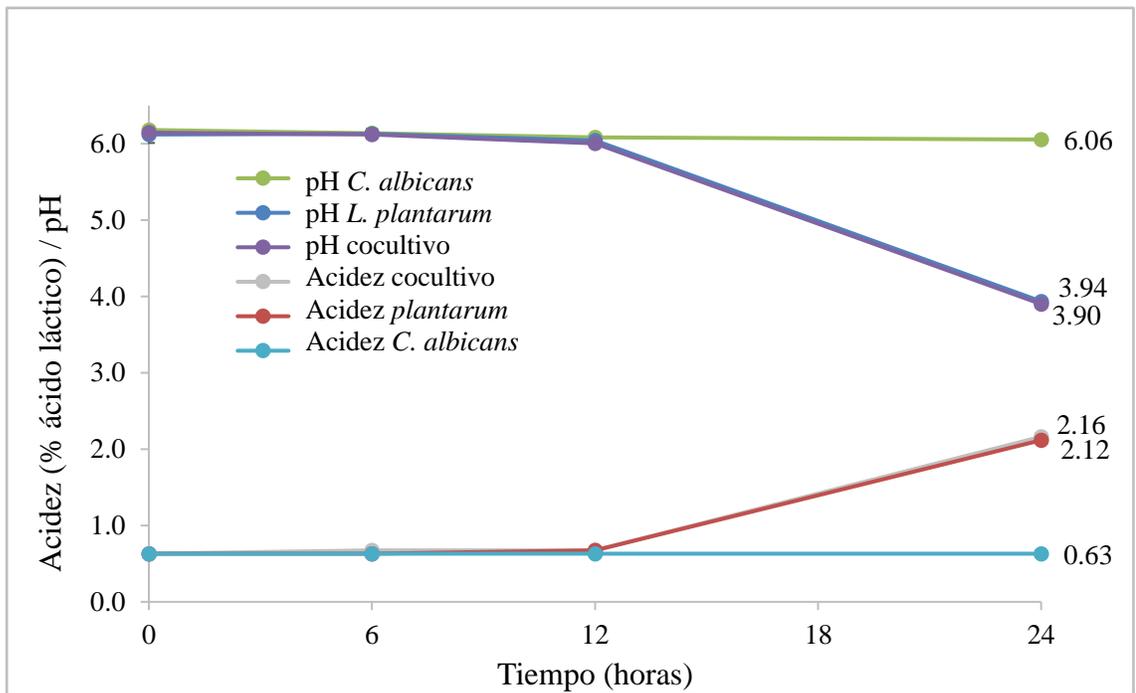


**Figura 9. Curva de crecimiento de *L. delbrueckii* vs. *C. albicans* en cocultivo y de forma individual.**

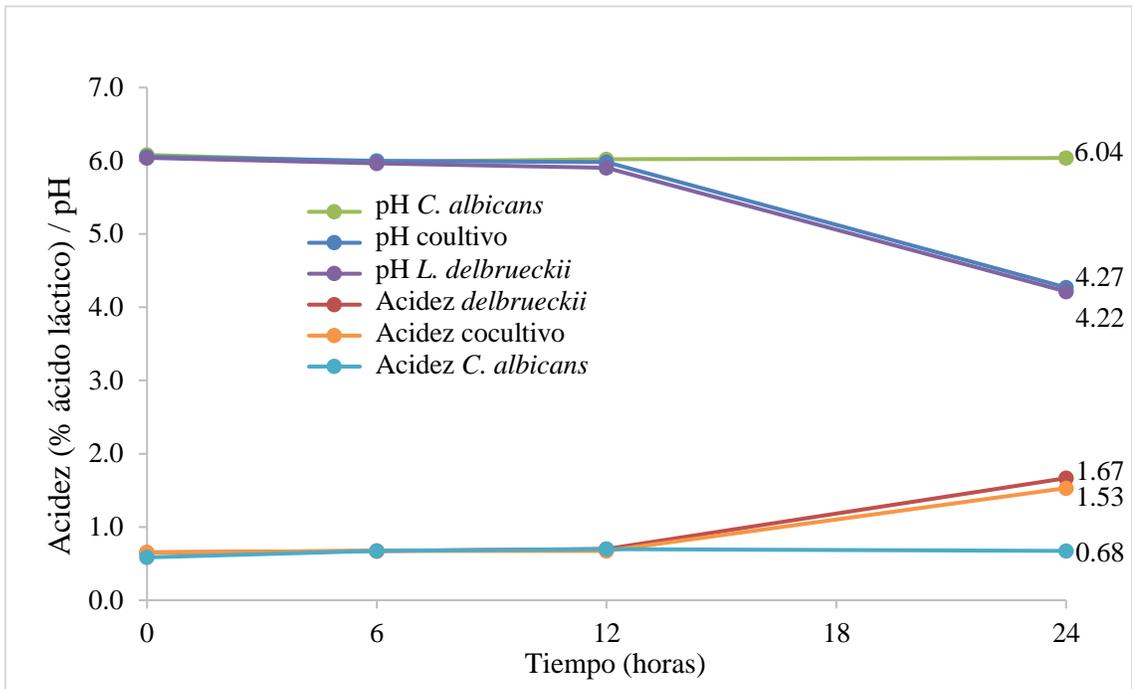


**Figura 10. Curva de crecimiento de *L. acidophilus* vs. *C. albicans* en cocultivo y de forma individual**

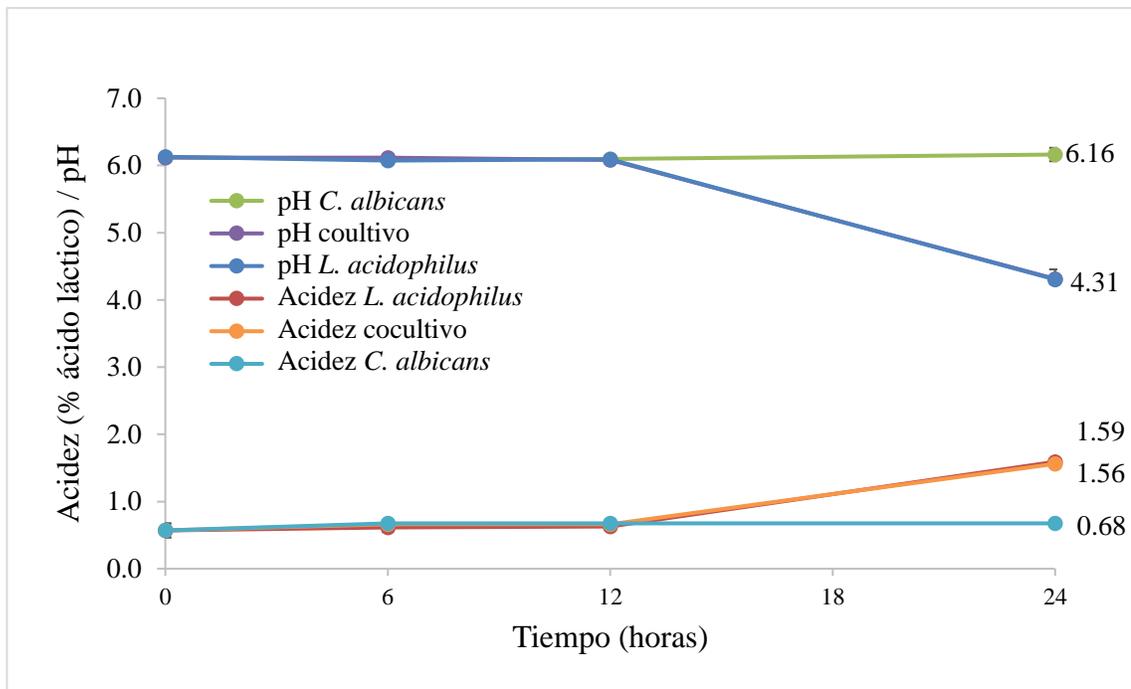
En cada cocultivo se midieron el pH y la acidez, expresada como porcentaje de ácido láctico, el principal compuesto producido por las BAL utilizadas en este estudio. *L. plantarum* (Figura 11) fue el microorganismo que generó la mayor cantidad de ácido láctico 2.16 %, mientras que *L. delbrueckii* 1.67 % (Figura 12) y *L. acidophilus* 1.59 % (Figura 13) produjeron cantidades menores, pero similares entre sí. La producción de ácido se mantuvo constante tanto en los cultivos individuales de las BAL como en los cocultivos, lo que sugiere que las BAL regularon efectivamente el pH en los cocultivos. Además, se observó una relación inversa entre el aumento de la acidez y la disminución del pH en todos los casos. Por su parte, en los cultivos control de *C. albicans*, el pH y la acidez no variaron significativamente a lo largo del tiempo



**Figura 11.** Acidez (% ácido láctico) y pH de *C. albicans* vs. *L. plantarum*



**Figura 12.** Acidez (% ácido láctico) y pH de *C. albicans* vs *L. delbrueckii*



**Figura 13.** Acidez (% ácido láctico) y pH de *C. albicans* vs *L. acidophilus*

### 5.3. Producción de Sustancias Antifúngicas Microorganismos Inactivados, CFS y BAL

#### 5.3.1. Postbióticos

##### 5.3.1.1. Sonicación.

Para inactivar las BAL, se probó la técnica de sonicación en *L. acidophilus* siguiendo el procedimiento descrito en la sección 4.7.1.1. Los resultados mostraron diferencias significativas en la viabilidad celular entre el control y el tratamiento que combinó congelación y sonicación, lo que indica que esta combinación afectó notablemente la viabilidad de *L. acidophilus* en comparación con el control Tabla 8.

**Tabla 8. Comparación de la viabilidad celular de *L. acidophilus* (Log<sub>10</sub> UFC/mL) luego de los tratamientos de congelación y sonicación**

Microorganismo	Tratamiento		
	Control	Congelación	Congelación + sonicación
<i>L. acidophilus</i>	8.31 ± 0.10 <sup>a</sup>	8.18 ± 0.02 <sup>ab</sup>	8.04 ± 0.00 <sup>bc</sup>

\* Letras distintas indican diferencias significativas (p<0.05)

##### 5.3.1.2. Autoclavado.

Se utilizó la técnica de sonicación, logrando una inactivación significativa de los microorganismos en comparación con el control. Sin embargo, no se alcanzó el objetivo de inactivar completamente los *Lactobacillus*. Por ello, se sometió la biomasa a condiciones de alta presión y temperatura, según lo descrito en la sección 4.7.1.2. Tras

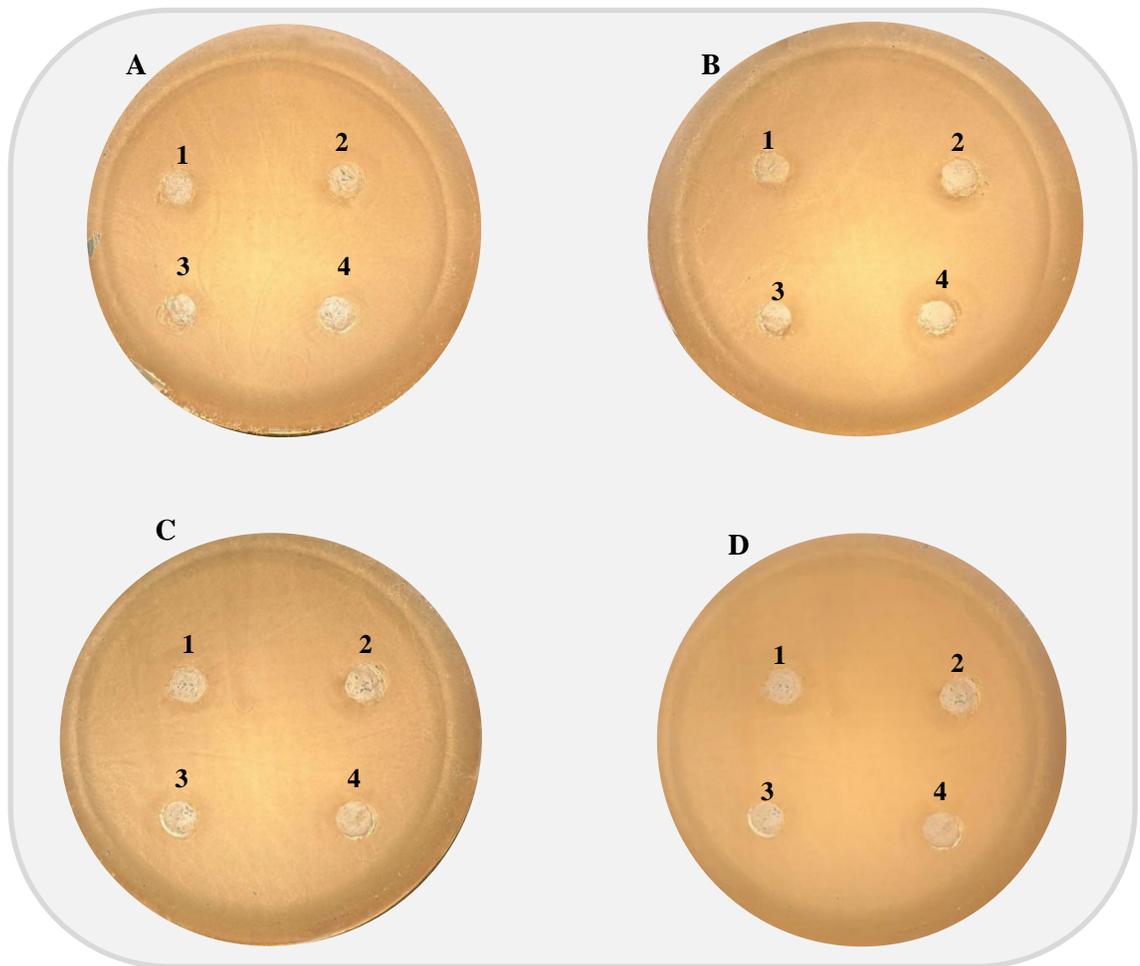
este procedimiento, se realizaron conteos en placa para evaluar su efectividad, confirmando la ausencia de crecimiento.

### **5.3.2. Producción del CFS pH normal y CFS a pH 7**

Para confirmar que los CFS pH normal y CFS a pH 7 fueron filtrados de manera adecuada se realizaron conteos en placa haciendo diluciones seriadas. No se encontró crecimiento microbiano en ninguna de las muestras de CFS.

#### 5.4. Evaluación de la Actividad Antimicrobiana Mediante el Método de los Pocillos del CFS, CFS pH 7, postbiótico y las BAL

No se encontró ningún tipo de inhibición hacia *C. albicans* por parte de las sustancias probadas al emplear este método (Figura 14).



**Figura 14. Actividad Antimicrobiana Mediante el Método de los Pocillos contra *C. albicans*. A) Postbiótico, B) BAL vivas, C) CFS, D) CFS pH7. 1. *L. plantarum*, 2. *L. delbrueckii*, 3.*L. acidophilus* 4.PBS como control negativo**

## 5.5. Evaluación de la Actividad Antimicrobiana Mediante el Método CMI del CFS, CFS pH 7 y Postbiótico de cada una de las BAL.

Otro tipo de ensayo que se realizó fue el de CMI con el fin de determinar si las sustancias antifúngicas tenían inhibición sobre *C. albicans* al estar en un medio líquido. En los ensayos realizados se encontraron los siguientes resultados.

### 5.5.1. CMI del CFS

Todas las diluciones del CFS de *L. plantarum* (Figura 15) presentaron un efecto inhibitorio significativo ( $p < 0.05$ ) sobre *C. albicans* en comparación con el crecimiento del control. El CFS a una concentración 50 % v/v tuvo una inhibición del 74.59 %. El efecto inhibitorio fue dependiente de la concentración.

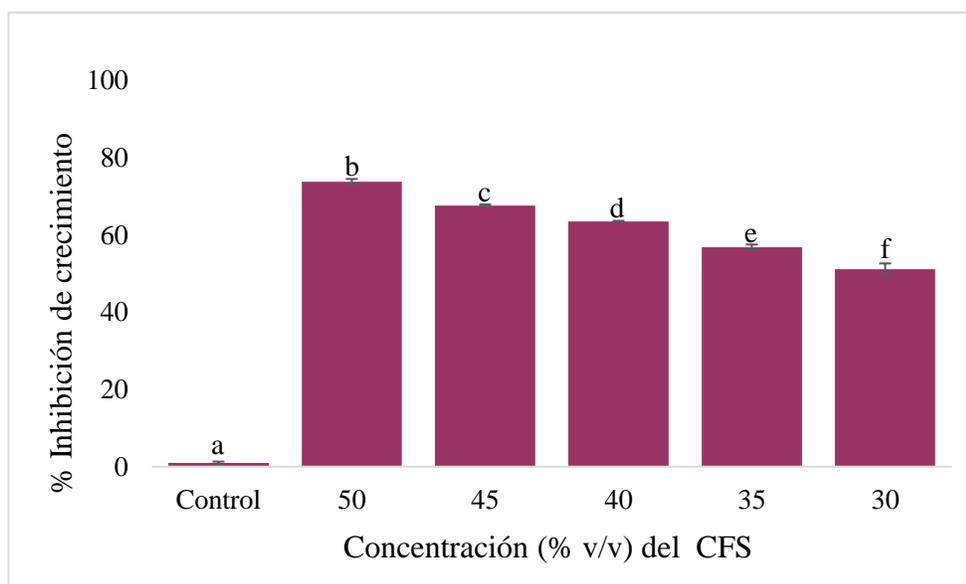
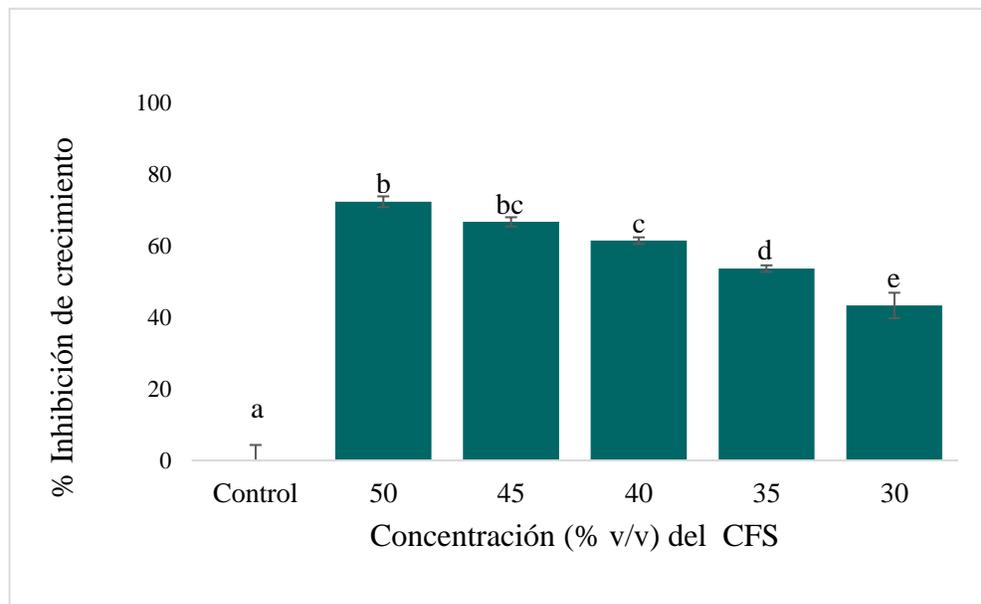


Figura 15. Actividad antifúngica del CFS de *L. plantarum* contra *C. albicans*

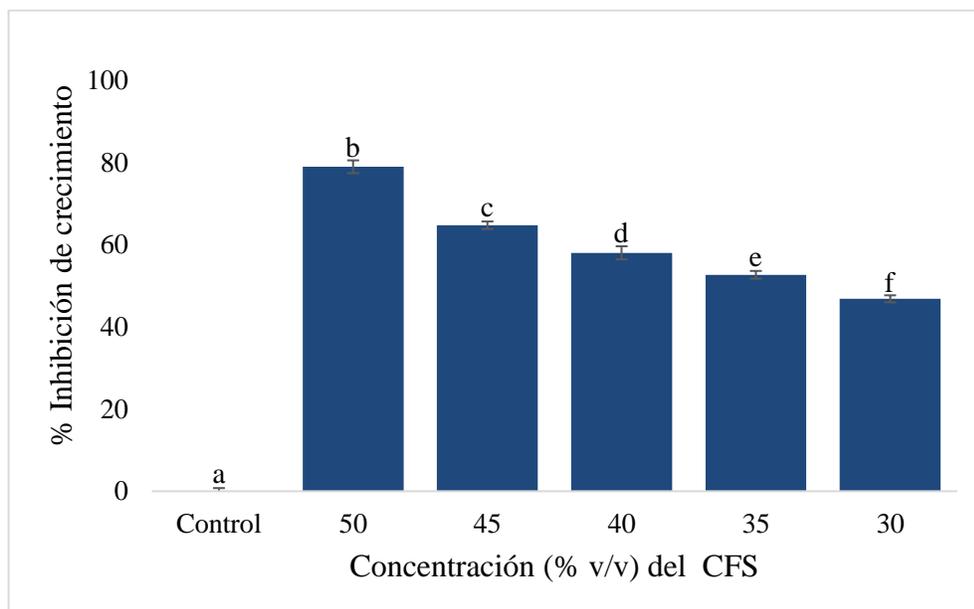
\* Letras distintas indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

En cuanto a la inhibición del CFS de *L. delbrueckii* (Figura 16), la concentración del 50 % v/v mostró la mayor inhibición del crecimiento de *C. albicans*, alcanzando un 72.42 %. Todas las diluciones evaluadas presentaron un efecto inhibitorio estadísticamente significativo ( $p < 0.05$ ) en comparación con el control. Sin embargo, no se observaron diferencias en la inhibición cuando el CFS se encontraba a concentraciones del 45 % y 40 % v/v.



**Figura 16. Actividad antifúngica del CFS de *L. delbrueckii* contra *C. albicans*. \* Letras distintas indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).**

El CFS de *L. acidophilus* al 50 % v/v mostró una inhibición del 79.01 % contra *C. albicans* (Figura 17), con una diferencia significativa en comparación con el control. Todas las diluciones evaluadas presentaron un efecto inhibitorio significativo ( $p < 0.05$ ) sobre el crecimiento del patógeno, mostrando diferencias tanto en comparación con el control como entre las distintas concentraciones del CFS.

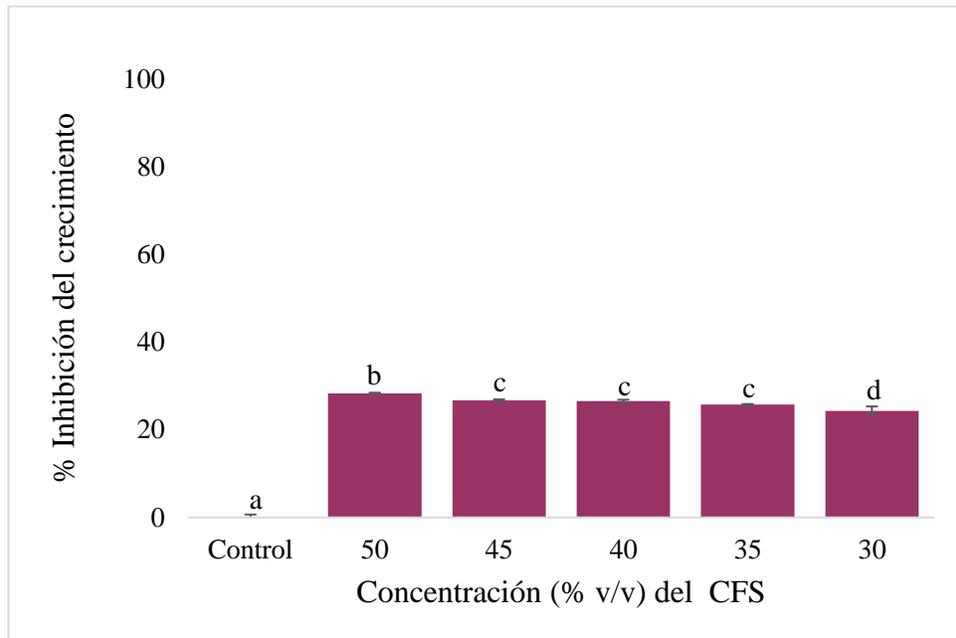


**Figura 17. Actividad antifúngica del CFS de *L. acidophilus* contra *C. albicans*.**

**\* Letras distintas indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).**

### **5.5.2. CMI del CFS pH7**

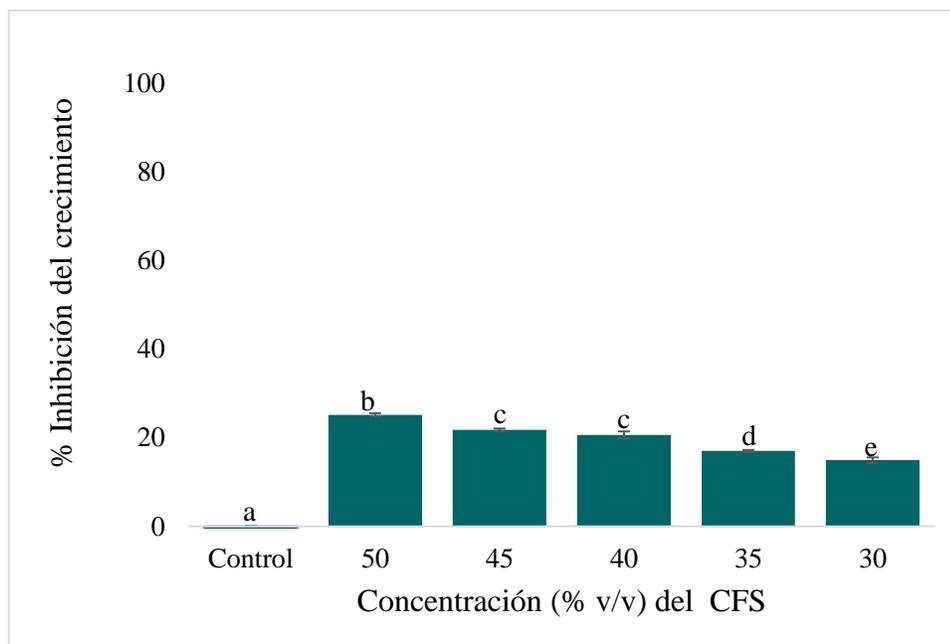
Al evaluar el CFS de *L. plantarum* a pH 7 (Figura 18) en una concentración del 50 % v/v, se observó una inhibición del 28.35 %, estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) en comparación con el control. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en la inhibición de *C. albicans* entre las concentraciones al 45 %, 40 % y 35 % v/v.



**Figura 18. Actividad antifúngica del CFS pH 7 de *L. plantarum* vs. *C. albicans*.**

**\* Letras distintas indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).**

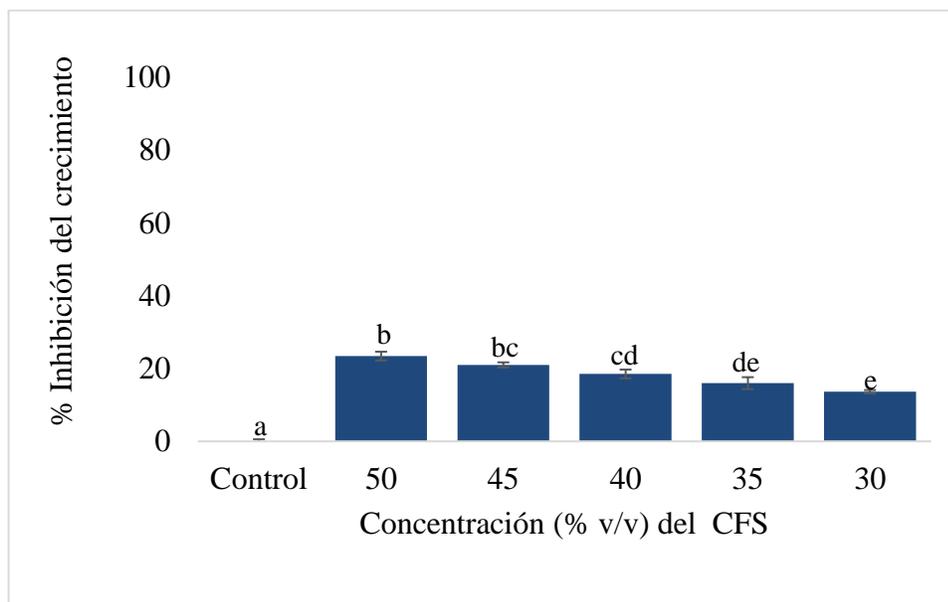
Al tratar *C. albicans* con el CFS pH 7 de *L. delbrueckii* (Figura 19), se observó una inhibición significativa en todos los tratamientos en comparación con el control. La máxima inhibición, obtenida con el CFS al 50 % v/v, fue del 25.21 %. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre las concentraciones del CFS al 45 % y 40 % v/v.



**Figura 19. Actividad antifúngica del CFS pH 7 de *L. delbreuckii* vs. *C. albicans***

**\* Letras distintas indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).**

En relación con la actividad antifúngica del CFS a pH 7 de *L. acidophilus* (Figura 20) contra *C. albicans*, todos los tratamientos presentaron una inhibición significativa en comparación con el control. La mayor inhibición se obtuvo con el CFS al 50 % v/v, alcanzando un 23.43 %.

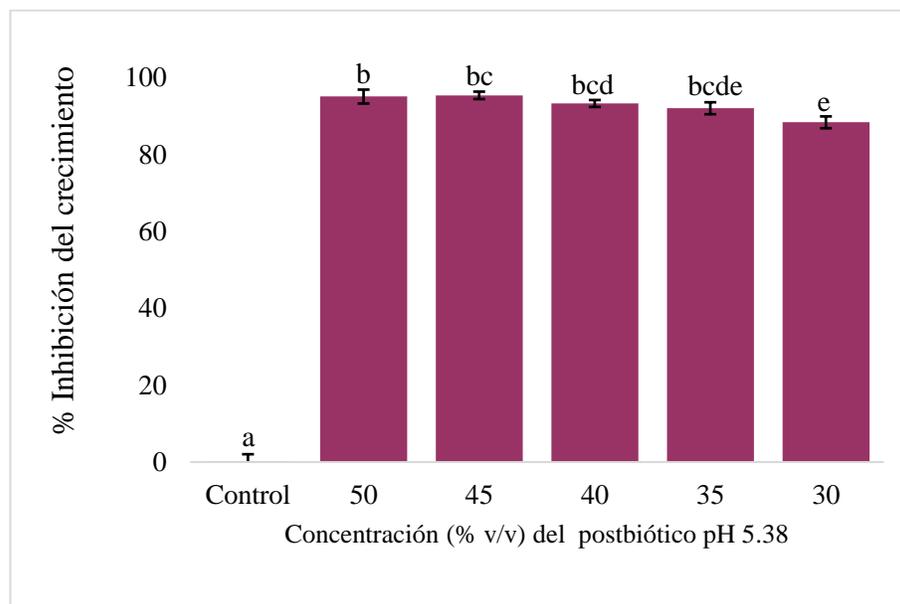


**Figura 20. Actividad antifúngica del CFS pH 7 de *L. acidophilus* vs. *C. albicans*.**

**\* Letras distintas indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).**

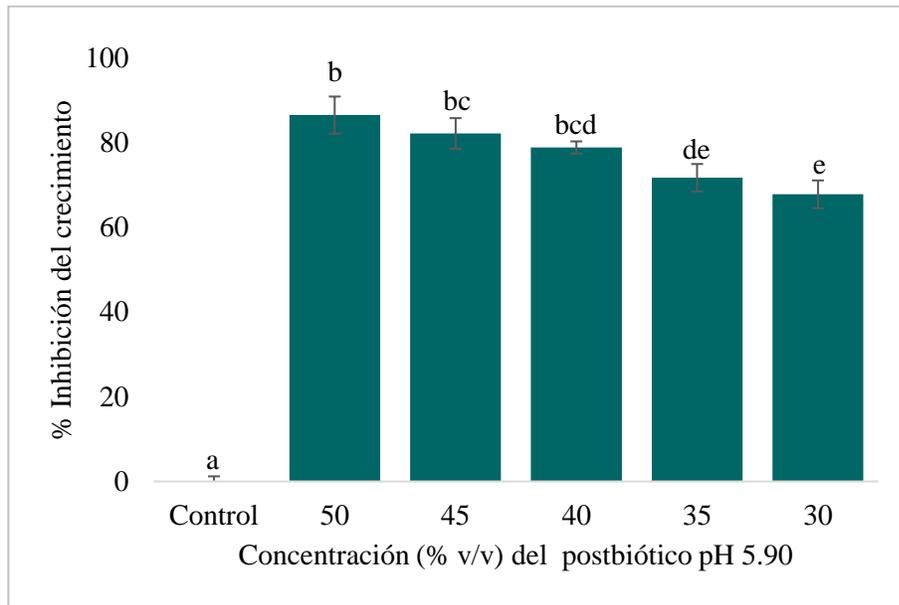
### 5.5.3. CMI del postbiótico

El postbiótico de *L. plantarum* (Figura 21) mostró una inhibición del 95.04 % en el crecimiento de *C. albicans* cuando se probó a una concentración 50 % v/v. Todas las diluciones ensayadas presentaron diferencias estadísticas significativas en comparación con el control, con una inhibición del crecimiento que varió entre el 95.14 % y el 88 %. El efecto inhibitorio fue dependiente de la concentración.



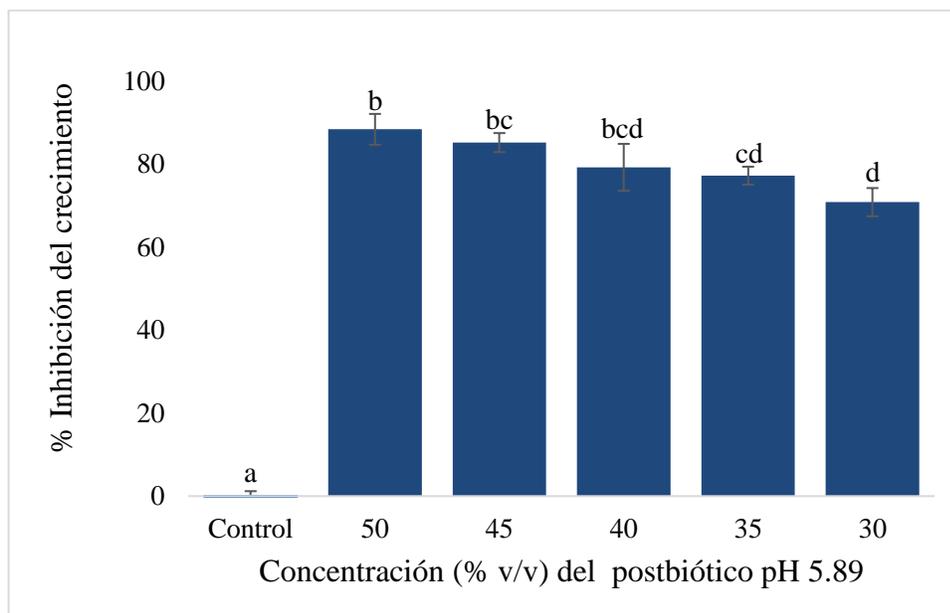
**Figura 21. Actividad antifúngica del del postbiótico derivado de *L. plantarum* vs. *C. albicans*. \* Letras distintas indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).**

El postbiótico derivado de *L. delbrueckii* (Figura 22) mostró una inhibición del 86.5 % en el crecimiento de *C. albicans* cuando se probó al 50 % v/v. Todas las diluciones ensayadas presentaron diferencias estadísticas significativas en comparación con el control, con una inhibición del crecimiento que varió entre el 86.5 % y el 67.81 %. El efecto inhibitorio fue dependiente de la concentración.



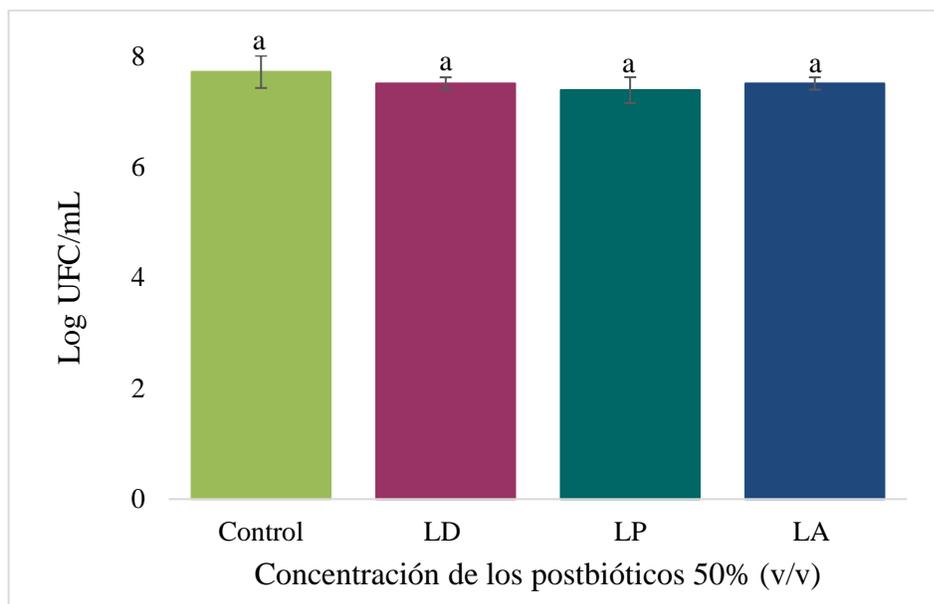
**Figura 22. Actividad antifúngica del postbiótico derivado de *L. delbrueckii* vs. *C. albicans*. \* Letras distintas indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ )**

El postbiótico derivado de *L. acidophilus* (Figura 23) mostró una inhibición del 88.35 % en el crecimiento de *C. albicans* cuando se probó al 50 % v/v. Todas las diluciones ensayadas presentaron diferencias estadísticas significativas ( $p < 0.05$ ) en comparación con el control, con una inhibición del crecimiento que varió entre el 88.35 % y el 70.81 %. El efecto inhibitorio fue dependiente de la concentración.



**Figura 23. Actividad antifúngica del postbiótico derivado de *L. acidophilus* vs. *C. albicans*. \* Letras distintas indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ )**

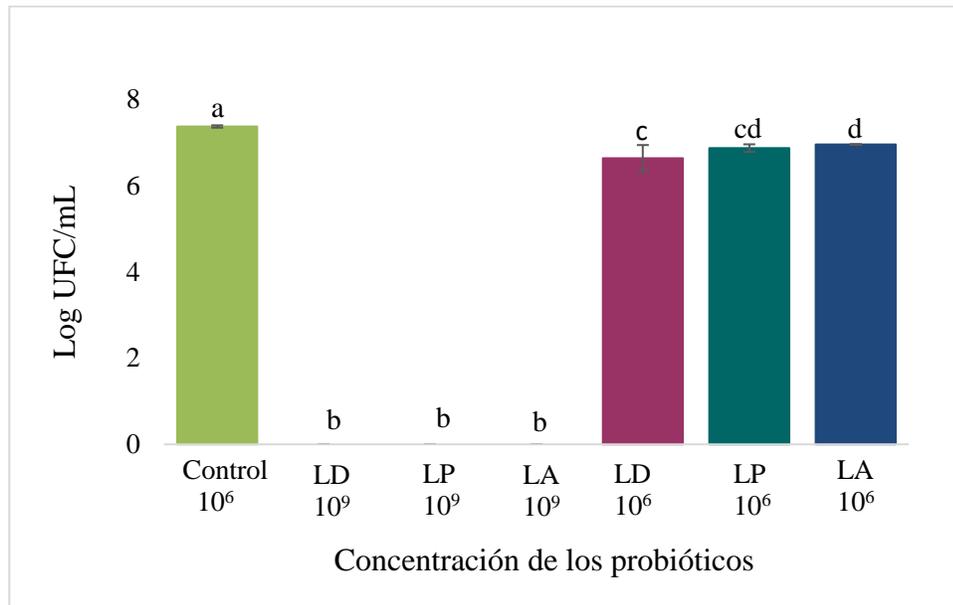
Para confirmar el efecto antimicótico de los postbióticos, se realizó un conteo en placa. Los postbióticos de *L. delbrueckii*, *L. plantarum* y *L. acidophilus* no mostraron un efecto inhibitorio significativo contra *C. albicans* (Figura 24), y no se encontraron diferencias significativas entre el control y los tratamientos. El crecimiento de *C. albicans* al cocultivarse con los postbióticos varió entre 7.39 y 7.51 ciclos logarítmicos, mientras que el control presentó un crecimiento de 7.72 ciclos logarítmicos.



**Figura 24. Actividad antifúngica de los postbióticos vs. *C. albicans*. LD: *L. delbrueckii* LP: *L. plantarum*, LA: *L. acidophilus* conteo en placa.  
\* Letras distintas indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).**

#### 5.5.4. CMI del probiótico

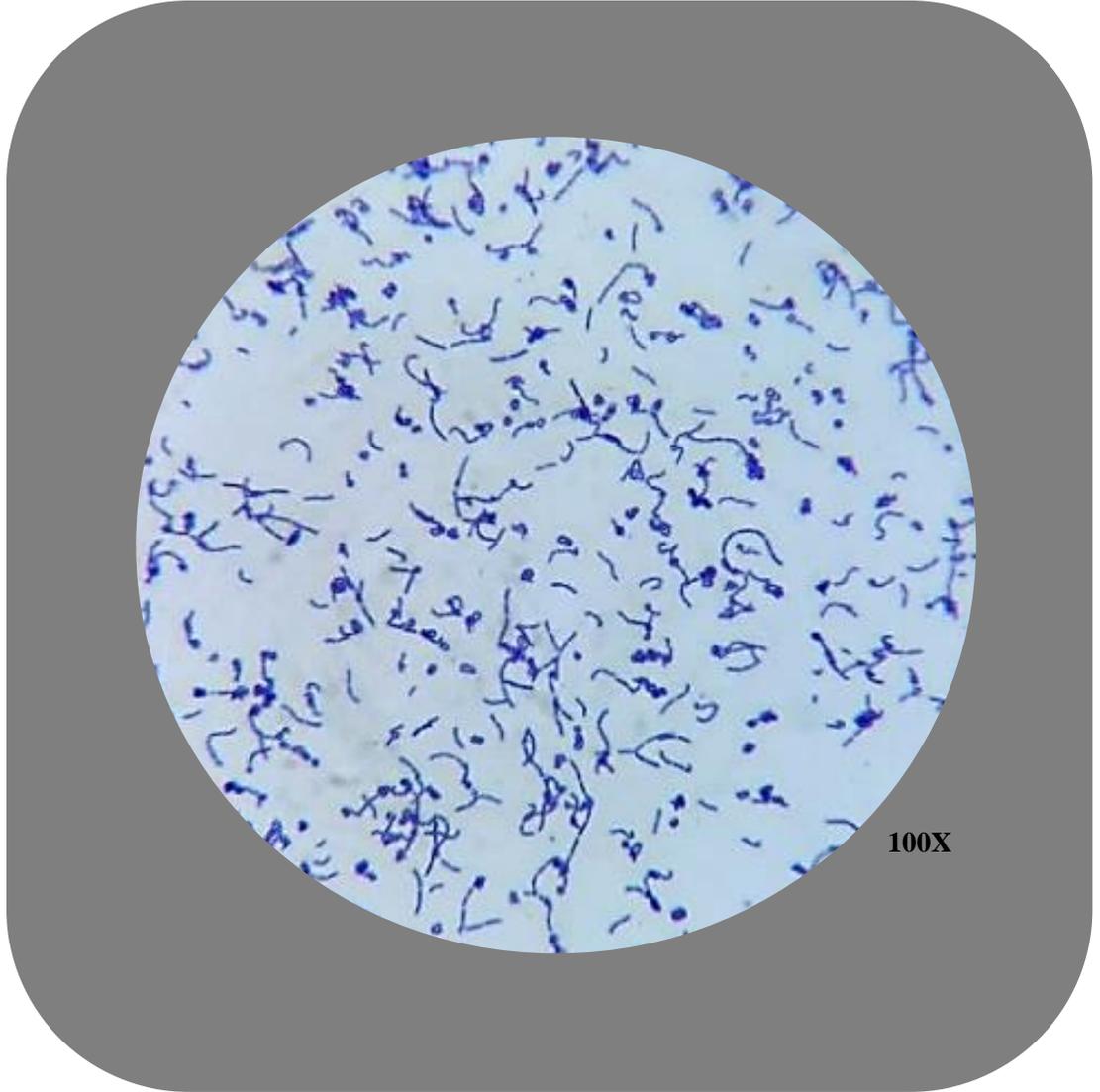
Las BAL vivas a una concentración de  $1 \times 10^9$  lograron una inhibición del 100 % contra *C. albicans*. En contraste, a una concentración de  $1 \times 10^6$ , la inhibición fue del 78.72 % para *L. delbrueckii*, 68.09 % para *L. plantarum* y 61.70 % para *L. acidophilus* (Figura 25).



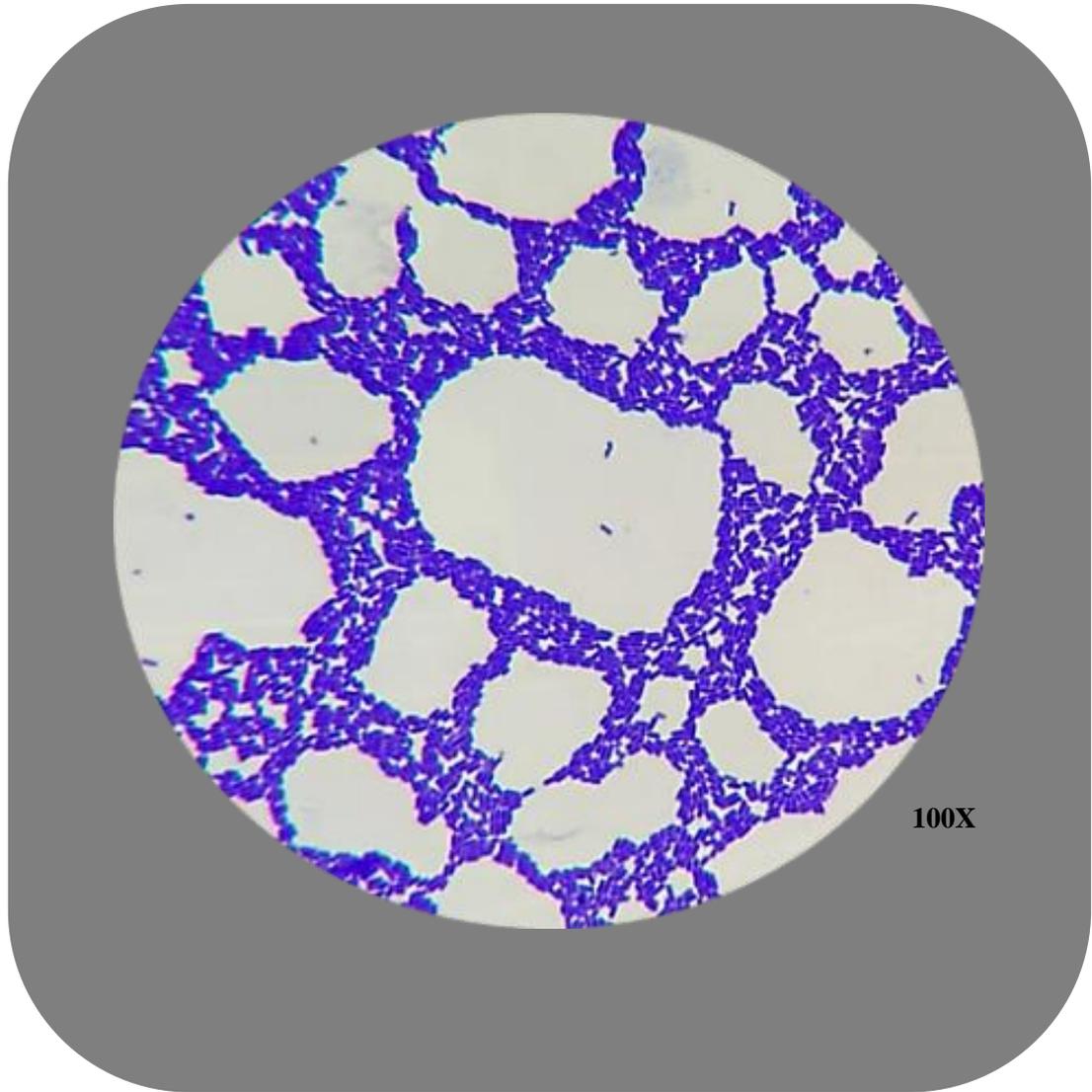
**Figura 25. Actividad antifúngica de los probióticos vs. *C. albicans*. LD: *L. delbrueckii* LP: *L. plantarum*, LA: *L. acidophilus*.  
\* Letras distintas indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).**

### 5.6. Evaluación Microscópica

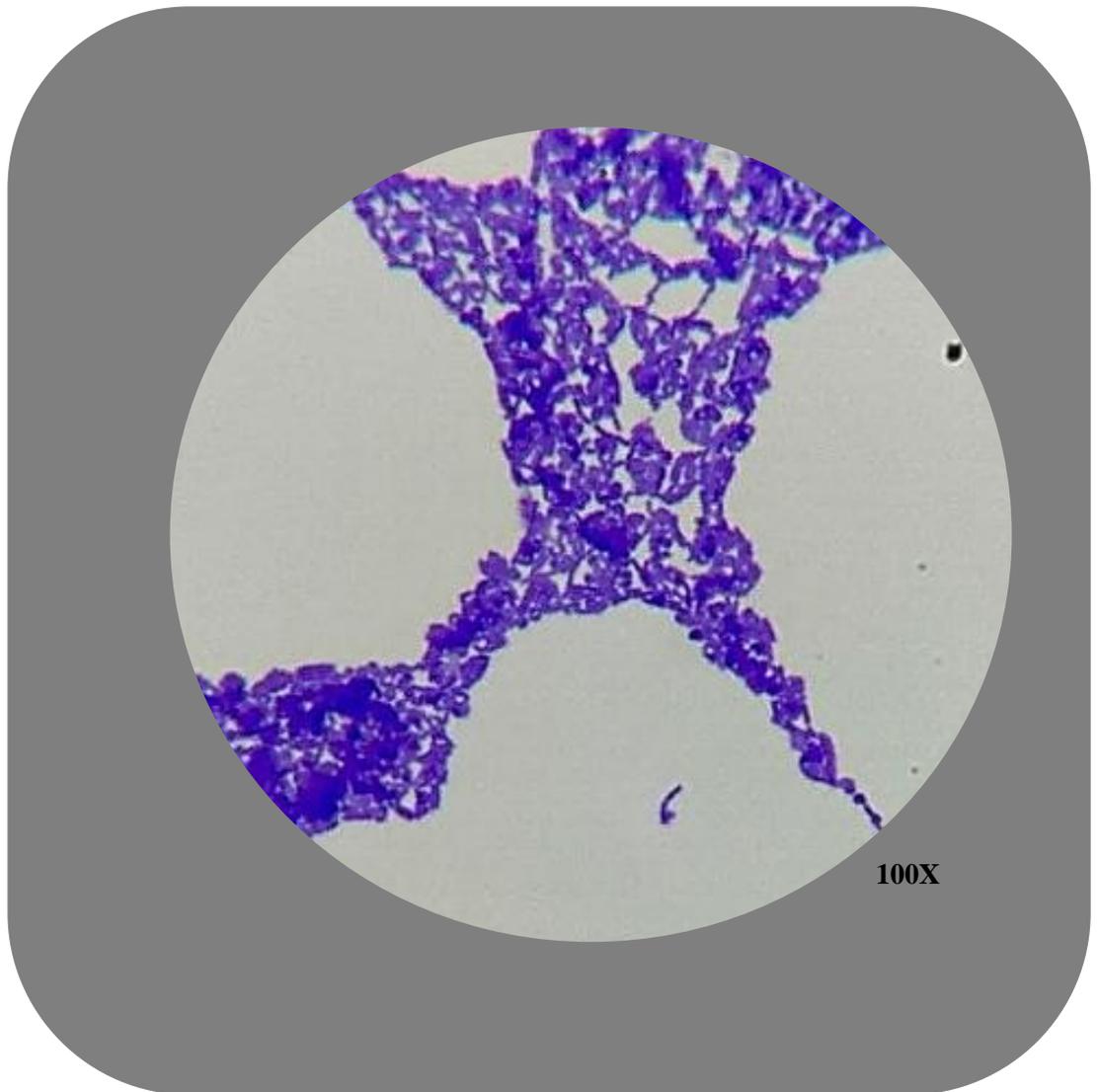
Al observar los cocultivos de *C. albicans* con los postbióticos de las BAL bajo el microscopio, se pudo ver que estos se coagregaban alrededor de la levadura (Figura 29-31).



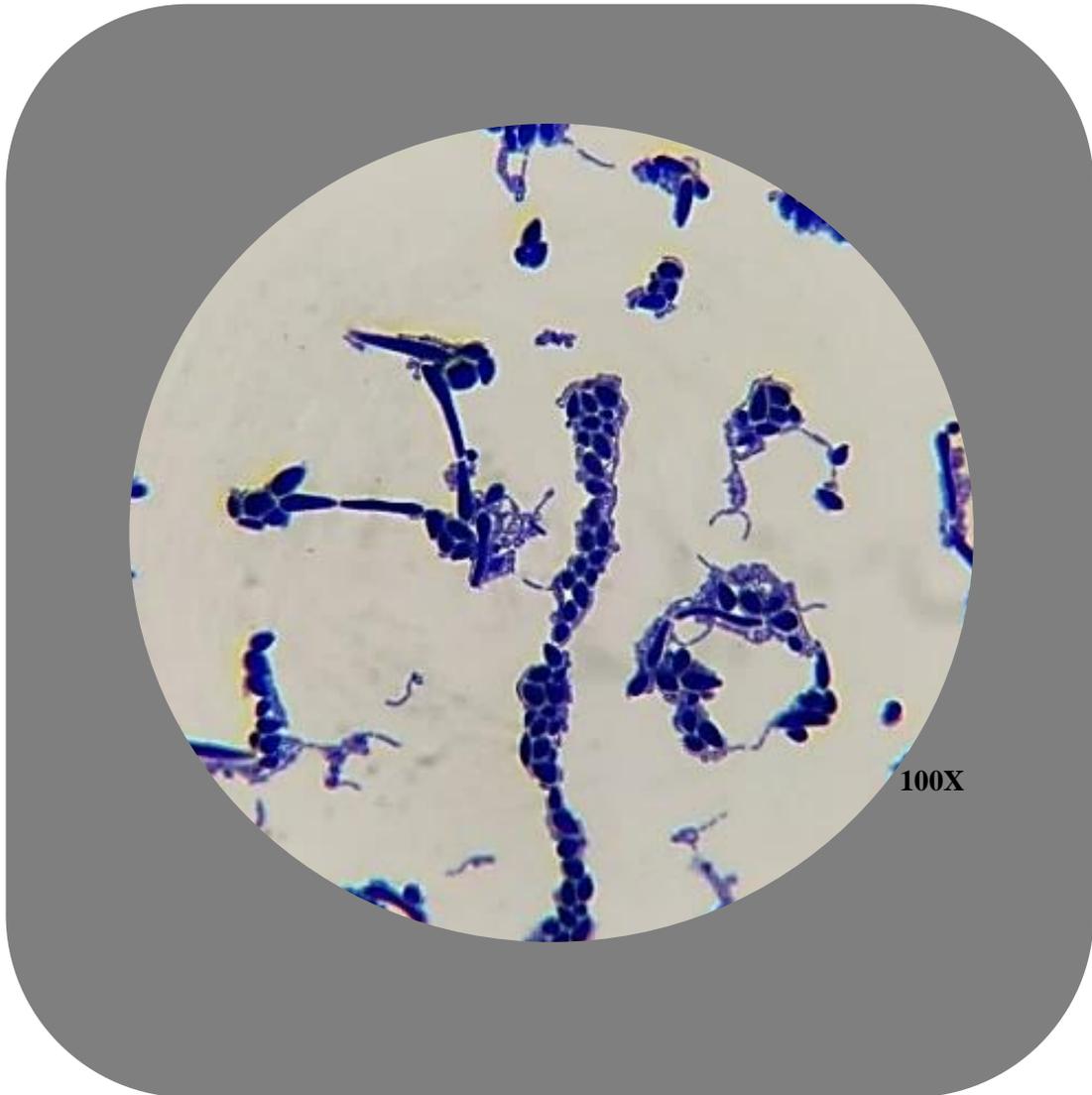
**Figura 26. Postbióticos de *L. delbrueckii*. Aumento 100X.**



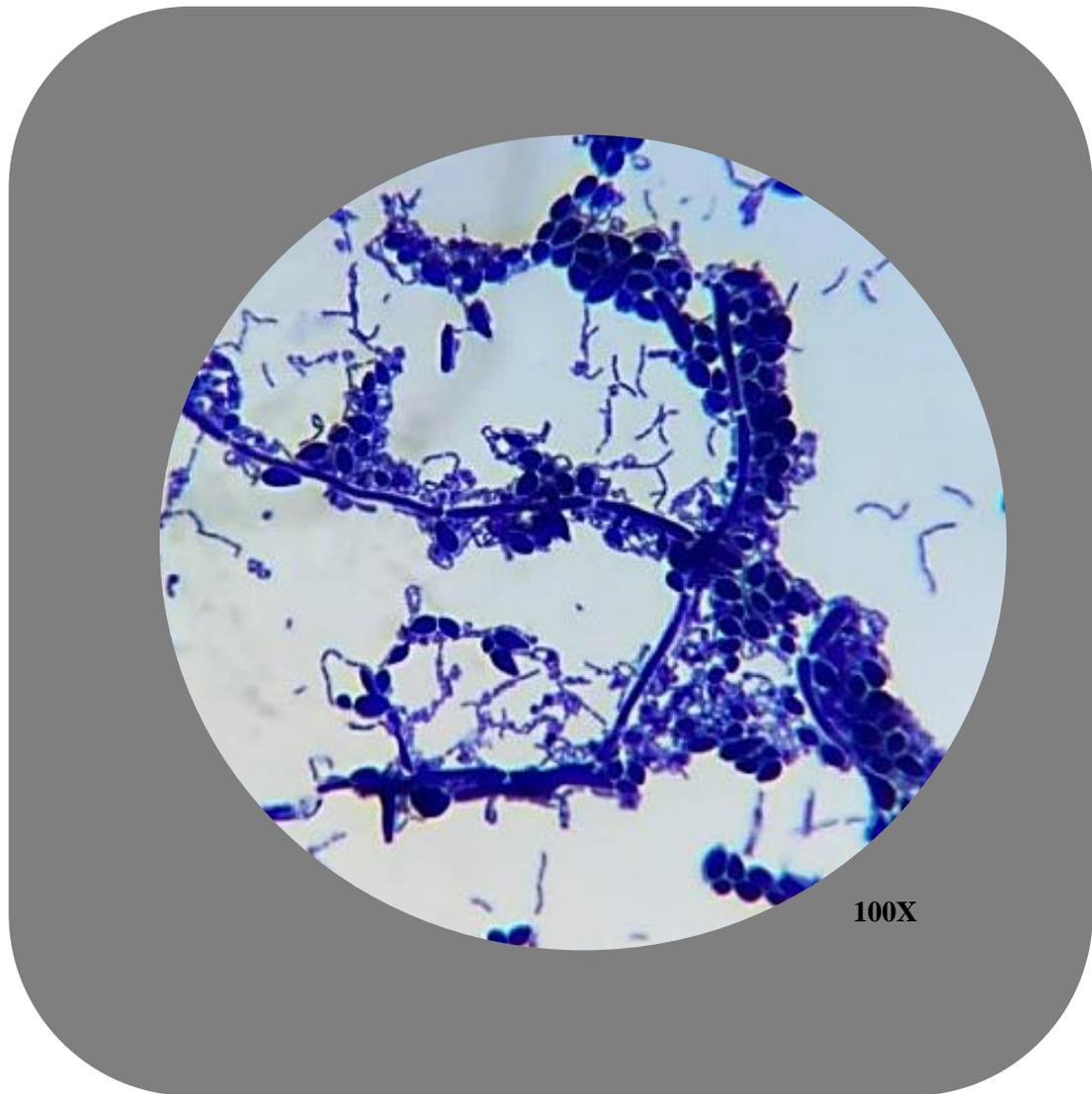
**Figura 27. Postbióticos de *L. acidophilus*. Aumento 100X.**



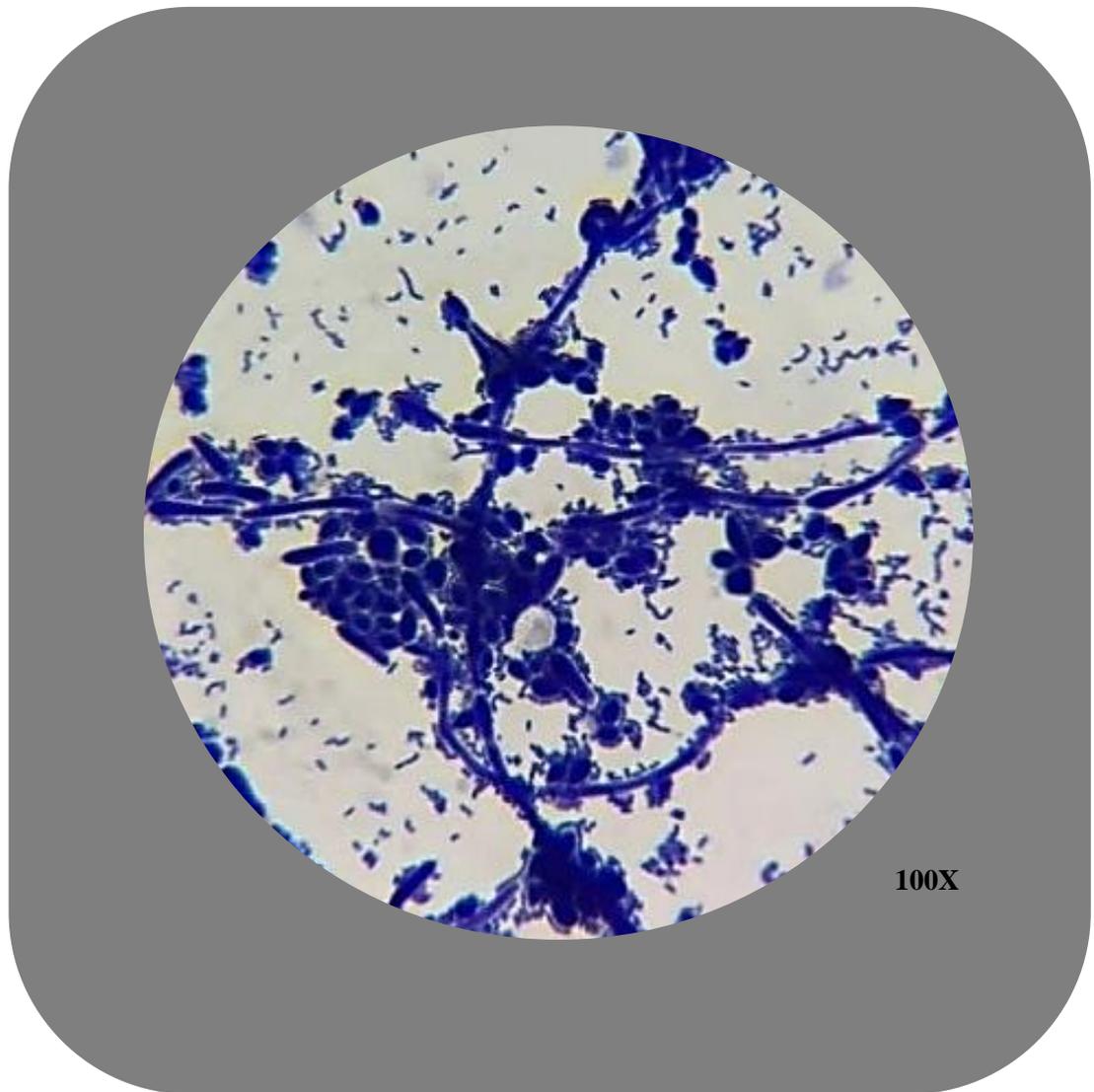
**Figura 28. Postbióticos de *L. plantarum*. Aumento 100X.**



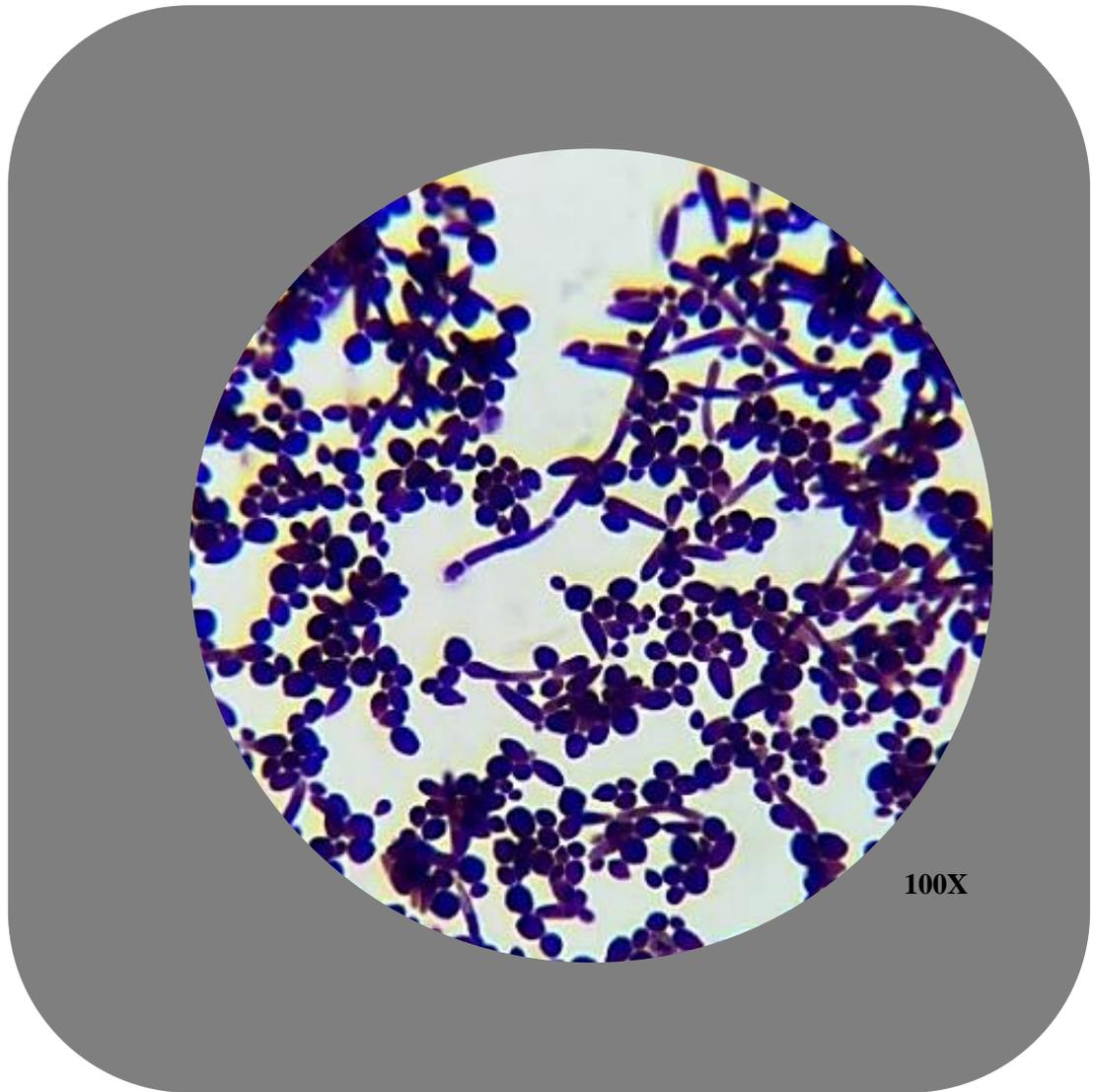
**Figura 29. Coagregación de postbióticos de *L. delbrueckii* con *C. albicans*. Aumento 100X.**



**Figura 30. Coagregación de postbióticos de *L. acidophilus* con *C. albicans*. Aumento 100X.**



**Figura 31. Coagregación de postbióticos de *L. plantarum* con *C. albicans*. Aumento 100X.**



**Figura 32. *C. albicans*. Aumento 100X.**

## CAPÍTULO 6

### DISCUSIÓN DE RESULTADOS

#### **6.1. Establecimiento del medio de cultivo que permita el cocultivo de los microorganismos.**

En este estudio, se probaron diferentes medios de cultivo para realizar los cocultivos de *C. albicans* y las BAL. Al cultivar *C. albicans* en los medios MRS suplementado, TSBYE, MRS, y YM, no se observaron diferencias significativas ( $p < 0.005$ ) en su crecimiento, de acuerdo con los conteos realizados en placa en cada uno de estos medios. En cuanto al medio TSBYE, los resultados coinciden con lo reportado por Zeng et al. (2022)[31], quienes utilizaron este medio para cocultivar *C. albicans* con *Lactobacillus*. El crecimiento normal de la levadura en el medio MRS es consistente con los resultados de Yocheva et al. (2024) [104] quienes cultivaron conjuntamente *C. albicans* y *Lactobacillus*.

El medio YM, por su parte, es el medio óptimo para el crecimiento de levaduras. Aunque en el medio MRS obtuvimos un crecimiento normal de *C. albicans*, fue necesario suplementarlo con peptona y extracto de levadura para proporcionar los nutrientes esenciales que tienen otros medios de crecimiento de levaduras. Este crecimiento estable

en todos los medios evaluados se puede atribuir a la presencia de glucosa, que es utilizada como la principal fuente de carbono por parte de *C. albicans*. De igual manera, el extracto de levadura provee carbono y proteínas, mientras que la peptona actúa como una fuente adicional de carbono, nitrógeno y aminoácidos [118, 119].

Respecto a *L. acidophilus*, su crecimiento en el medio MRS y en el MRS suplementado fue similar. Sin embargo, en el medio TSBYE se observó un crecimiento diferente, y además las colonias presentaron un diámetro menor. Aunque este medio ha sido utilizado en diversos estudios para cocultivos líquidos de *Lactobacillus*, es difícil comparar nuestros resultados en cuanto a la morfología de las colonias, ya que no se realizaron conteos en placa en los estudios mencionados [31, 50]. La menor dimensión en las colonias de *L. acidophilus* podría estar relacionado con la menor concentración de glucosa en los medios TSBYE y YM, dado que la glucosa es la principal fuente de carbono para estos microorganismos. Además, la presencia de ingredientes en el medio MRS que aportan iones metálicos, como el sulfato de magnesio y el sulfato de manganeso, así como tampones como el fosfato dipotásico y el acetato de sodio, ayudan a cubrir los complejos requerimientos nutricionales de los *Lactobacillus* [120].

## **6.2. Cocultivo de *C. albicans* y BAL**

Para realizar el conteo específico de cada microorganismo en los cocultivos, se emplearon antibióticos para inhibir el crecimiento del microorganismo no deseado en el conteo. Al sembrar *L. acidophilus* en medio MRS y comparar su crecimiento en el medio MRS que contenía 2 mg/L de fluconazol, no se observaron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en los conteos en placa. Esto se explica por el mecanismo de acción del

fluconazol, que inhibe la síntesis de ergosterol al bloquear la enzima 14-alfa-desmetilasa, responsable de convertir el lanosterol en ergosterol, un componente esencial de la membrana celular de los hongos [121]. Este hecho respalda su uso en investigaciones que combinan terapias de *Lactobacillus* con fluconazol para tratar vaginitis causada por *C. albicans* [122, 123].

Por otro lado, para cuantificar el crecimiento de *C. albicans* en los cocultivos, se utilizó medio YM suplementado con 1 mg/L de eritromicina. En nuestro estudio, este antibiótico no afectó el crecimiento de *C. albicans*. La eritromicina actúa uniéndose a la subunidad 50S del ribosoma bacteriano, inhibiendo la síntesis de proteínas; sin embargo, no tiene efecto sobre *C. albicans* debido a las diferencias estructurales en los ribosomas de los hongos, lo que la hace ineficaz contra ellos [124, 125]. En estudios previos, se ha empleado cloranfenicol a 50 mg/L para inhibir el crecimiento de las BAL y facilitar el conteo de *C. albicans* [126].

En los cocultivos se evaluó la interacción de *C. albicans* con cada una de las cepas de *Lactobacillus* durante 24 horas. En todos los cocultivos se observó una inhibición de *C. albicans* a partir de las 12 horas, coincidiendo con la disminución del pH a 3.94, 4.27, 4.31 para *L. plantarum*, *L. delbrueckii* y *L. acidophilus* respectivamente manteniéndose así hasta las 24 horas. Esto se observó tanto en los cocultivos como en los controles de las BAL. Nuestros resultados difieren de los reportados por Zeng et al. (2022) [31], quienes cocultivaron diferentes *Lactobacillus* con *C. albicans* y observaron inhibición a las 6 horas junto con una disminución del pH a 4 en ese mismo periodo, manteniéndose estable hasta las 20 horas. Esta diferencia podría deberse a que utilizaron el medio TSBYE, que no contiene tampones como los acetatos y fosfatos presentes en el medio

MRS, lo que provoca una reducción más gradual del pH en nuestro caso[120].

En el cocultivo con *L. plantarum*, se observó la mayor inhibición, coincidiendo con el pH más bajo 3.94 con una reducción de 2.4 ciclos logarítmicos a las 24 horas, lo que concuerda con lo reportado por Beck et al. (2019) [127], quienes encontraron la misma inhibición hacia *C. albicans* por parte de *L. plantarum*. En otro estudio, cocultivaron *C. albicans*, *S. mutans* y *L. plantarum* en TSBYE con 1 % de glucosa, obtuvieron una inhibición de 1 ciclo logarítmico al compararlo con el control sin *L. plantarum*[50]. Por su parte, *L. delbrueckii* mostró una inhibición de 1.1 ciclos logarítmicos, en concordancia con lo reportado por Yocheva et al. (2024)[104], quienes encontraron una reducción de 1.3 ciclos log al cocultivar *C. albicans* con esta cepa en medio MRS. En cuanto a *L. acidophilus* ATCC 4356, se observó una inhibición de 0.8 ciclos logarítmicos, similar a lo encontrado en un estudio en *G. mellonella* infectada con *C. albicans*, donde el crecimiento del hongo se redujo en menos de 1 ciclo logarítmico luego de 24 horas de tratamiento con el probiótico [100].

Uno de los mecanismos de acción de los *Lactobacillus* frente a *C. albicans* es la producción de ácido láctico. La actividad antifúngica del ácido láctico está estrechamente relacionada con el pH, ya que a un pH de 3.86, la mitad de sus moléculas no están disociadas, lo que facilita su penetración en la pared celular del patógeno [128]. Una vez dentro de la célula, el ácido láctico se disocia en un ion hidrógeno ( $H^+$ ) y un ion lactato ( $C_3H_5O_3^-$ ) y provoca la acidificación de la célula. Esta acidificación altera la homeostasis celular, comprometiendo procesos esenciales como la síntesis de ARN y desencadenando desequilibrios metabólicos que pueden hacer a *C. albicans* más vulnerable al estrés oxidativo[129].

El crecimiento de las BAL en cocultivo con *C. albicans* fue similar al del control, lo que sugiere que la presencia de la levadura no afectó significativamente su crecimiento. Estos resultados coinciden con lo reportado por Xu et al. (2024), quienes tampoco encontraron diferencias en el crecimiento de *L. plantarum* en cocultivo con *C. albicans* comparado con su control [99]. Sin embargo, aunque el crecimiento no fue afectado, Xu et al. observaron que *L. plantarum* tiende a sobreexpresar genes del sistema lamBDCA, involucrado en la detección de señales del ambiente y regulación de la adhesión. Además, reportaron la represión del sistema luxS/AI-2, que codifica proteínas responsables de la comunicación interbacteriana entre grampositivas y gramnegativas. También, otros genes que codifican proteínas de membrana y de respuesta al estrés fueron activados [99].

En cuanto a *C. albicans*, se ha evidenciado la regulación negativa de los genes *als3*, *hwp1*, *cph1* y *bcr1*, que están involucrados en la formación de hifas y adhesión, cuando fue cocultivada con *L. rhamnosus* [130]. De manera similar, otro estudio reportó que *L. paracasei* 28.4 suprimió los genes *tec1* y *ume6*, responsables de la morfogénesis y elongación de hifas en *C. albicans* [131]. Aunque no se encontraron diferencias en el crecimiento de las BAL en presencia de *C. albicans*, existe evidencia de una regulación genética en ambos microorganismos.

### **6.3. Evaluación de la Actividad Antimicrobiana Mediante el Método de los Pocillos del CFS, CFS pH 7, Postbiótico de cada una de las BAL y las BAL.**

#### **6.3.1. CFS Y CFS pH 7**

Los resultados obtenidos mostraron que los CFS y CFS ajustados a pH 7 de *L. plantarum*, *L. delbrueckii* y *L. acidophilus* no presentaron inhibición contra *C. albicans*. Estos resultados coinciden con los reportados por Yocheva et al. (2024), quienes tampoco encontraron zonas de inhibición con los CFS de *L. bulgaricus* LLB-02, *L. acidophilus* LLA-01 y *L. plantarum* LLP-2L. Sin embargo, reportaron una zona de inhibición de 14 mm con otra cepa de *L. plantarum* LLP-4B. Además, en ninguno de los casos se observó inhibición cuando el CFS fue ajustado a pH 7, lo que sugiere que el ácido láctico juega un papel importante en la actividad antifúngica [104].

Por otro lado, estudios que utilizaron el método de doble capa para evaluar la inhibición de *C. albicans* por el CFS de *L. plantarum*, reportaron halos de inhibición menores a 6 mm [105], lo que difiere de nuestros hallazgos. Sin embargo, nuestros resultados son consistentes con otro estudio que evaluó la actividad anticándida de aislados vaginales y no encontró inhibición en agar sólido mediante el método de pocillos, pero sí en medio líquido [106]. Lo que sugiere que la inhibición podría ser dependiente de la cepa utilizada, y que el contacto directo con la sustancia inhibidora es crucial para ejercer un efecto sobre el patógeno.

### 6.3.2. Postbióticos

En nuestro estudio, no observamos halos de inhibición al utilizar postbióticos, lo que contrasta con los resultados de Miao et al. (2024). Ellos reportaron halos de inhibición al evaluar *L. acidophilus* IFFI 6005 inactivado por calor, con diámetros de 11.5, 16, 16.5 y 15.5 mm frente a *E. coli*, *S. enterica*, *Clostridium. perfringens* y *S. aureus*, respectivamente, utilizando la técnica de difusión en pozos de agar [132]. Además, al utilizar *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NCDO 2394 inactivado por calor bajo condiciones similares, encontraron inhibiciones de 11.8 mm contra *E. coli* BCRC 10675 y 13.5 mm frente a *Klebsiella pneumoniae* BCRC 110694 [133]. No se encontraron reportes en los que se haya evaluado la inhibición de los postbióticos contra *C. albicans* bajo esta técnica. Estas diferencias en los resultados podrían deberse a variaciones en las cepas bacterianas utilizadas o a diferencias en las metodologías empleadas para evaluar la inhibición.

### 6.3.3. BAL

En nuestro estudio, no se observó inhibición de *C. albicans* por parte de las BAL. Estos resultados contrastan con lo reportado por Xu et al. (2024), quienes detectaron halos de inhibición de 6 a 10 mm al evaluar la acción de *L. plantarum* frente a la levadura mediante la técnica de superposición con agar [99]. Un estudio adicional que utilizó la técnica de superposición de agar encontró una inhibición de 19 mm al evaluar *L. paracasei* 28.4 contra *C. albicans* [134]. La discrepancia podría deberse a que la interacción entre los microorganismos es mayor en la técnica de superposición, donde se

utilizó agar al 0.7 %, lo que facilita la difusión de los compuestos antifúngicos, en comparación con el agar al 2 % empleado en nuestra técnica.

Por lo tanto, la falta de inhibición en nuestro experimento podría estar relacionada con la menor capacidad de difusión de compuestos en medios sólidos. Además, factores como la humedad, el grosor del agar, la volatilización de compuestos, así como el tamaño y la concentración de las sustancias evaluadas, pueden influir en la efectividad de la técnica de difusión en pozos de agar [93]. Las partículas de menor peso molecular, tienden a difundirse más fácilmente, lo que podría explicar la diferencia entre los resultados obtenidos con distintos métodos [135].

#### **6.4. Evaluación de la Actividad Antifúngica Mediante el Método CMI del CFS, CFS pH 7 y postbiótico de cada una de las BAL.**

##### **6.4.1. CMI del CFS**

En nuestros resultados, se observó que el CFS de *L. plantarum* pH 3.81, *L. delbrueckii* pH 3.84 y *L. acidophilus* pH 3.85 a una concentración de 50 % v/v inhibió significativamente el crecimiento de *C. albicans* en un 73.73 %, 72.42 % y 79.01 %, respectivamente (Figura 23). Estos resultados son acordes con estudios previos, donde se reportó una inhibición del 74.92 % por parte del CFS de *L. plantarum* sobre *C. albicans* [99]. Sin embargo, otros estudios muestran menores porcentajes de inhibición al evaluar el CFS de otras especies, como *L. bulgaricus* LLB-02 y *L. acidophilus* LLA-01, con valores de 9.7 % y 13.5 %, respectivamente[104]. Cabe destacar que un estudio con el

CFS de *L. plantarum* LS1 no observó ninguna inhibición contra la cepa *C. albicans* SC5314 [107], lo que resalta la variabilidad antimicrobiana entre cepas.

A pesar de que se ha evaluado el efecto del ácido láctico comercial en concentraciones de 0 a 160 mM a pH 4, no se ha observado una inhibición significativa sobre *C. albicans*. Este resultado sugiere que la actividad antimicrobiana del ácido láctico podría no ser suficiente por sí sola para inhibir eficazmente el crecimiento de *Candida*. Es posible que su efectividad dependa de la sinergia con otros metabolitos bacterianos, como las bacteriocinas y el peróxido de hidrógeno, que, actuando en conjunto, podrían potenciar el efecto antimicrobiano y contribuir a la inhibición del crecimiento de *C. albicans* [136]. Por otro lado, un estudio previo demostró que el uso de ácido láctico a una concentración de 200 mM disminuye la formación de hifas en *C. albicans*, aunque también redujo la viabilidad celular de este hongo. Este hallazgo refuerza la idea de que el ácido láctico tiene un impacto en la morfología y supervivencia de *C. albicans*. Además, los autores señalaron que las condiciones ácidas son fundamentales para la efectividad del ácido láctico, lo que coincide con nuestra interpretación de que el ambiente ácido facilita la penetración del ácido láctico a través de la membrana celular, potenciando su acción antimicrobiana.[137]. En otro estudio, el sobrenadante del cocultivo de *L. plantarum* y *C. albicans* mostró mayor inhibición sobre *C. albicans* que el de monocultivo de *L. plantarum*. Este efecto podría estar relacionado tanto con la producción de metabolitos secundarios como con la disminución de nutrientes a lo largo del tiempo, lo que afecta la viabilidad de *C. albicans*. El efecto fue más pronunciado en los sobrenadantes recolectados a las 24 horas, lo que sugiere que el agotamiento de nutrientes y los metabolitos producidos juegan un papel importante en la inhibición observada. [99]

Aparte del ácido láctico los *Lactobacillus* tienen la capacidad de producir diversas sustancias con propiedades antimicrobianas que se liberan en su sobrenadante, tales como peróxido de hidrógeno, biosurfactantes y bacteriocinas.

El peróxido de hidrógeno, un subproducto del metabolismo aeróbico de las BAL, puede penetrar las membranas celulares y generar especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés), las cuales dañan proteínas, lípidos y ADN, causando estrés oxidativo [138]. A pesar de su potencial, no todas las cepas de *Lactobacillus* o *Lactiplantibacillus* producen peróxido de hidrógeno y su efectividad depende de factores como la disponibilidad de oxígeno en el entorno [139]. Además, *C. albicans* es capaz de producir peroxidasas para neutralizar el estrés oxidativo, lo que podría reducir la eficacia de este mecanismo [140].

Los biosurfactantes producidos por las BAL son compuestos anfifílicos que pueden estar asociados a la pared celular o ser liberados extracelularmente. Estos reducen la tensión superficial y tienen propiedades antimicrobianas y antibiopelícula, lo que los hace útiles combatir infecciones [141, 142]. Su acción antimicrobiana se basa en la alteración de las membranas celulares de los patógenos, provocando la pérdida de iones esenciales y conduciendo a la muerte celular [143]. En el caso de *C. albicans*, el biosurfactante de *Lactobacillus crispatus* BC1 ha demostrado propiedades antiadhesivas en células epiteliales cervicales humanas, lo que podría ayudar a reducir la colonización y formación de biopelículas por parte del patógenos [144].

Finalmente, BLIS son proteínas o péptidos producidos principalmente por las BAL, capaces de inhibir el crecimiento de otros microorganismos. Se clasifican en tres

clases según su peso molecular: las de clase I (< 5 kDa) que son modificadas postraduccionalmente, las de clase II (< 10 kDa) que no sufren modificaciones postraduccionales, y las de clase III (> 30 kDa) [145]. Las bacteriocinas pueden actuar alterando la membrana citoplasmática, causando lisis celular, o interfiriendo con la síntesis de proteínas y la regulación genética [146]. Respecto a *C. albicans*, se ha reportado que las bacteriocinas producidas por *L. delbrueckii* subsp. *lactis* I, *L. rhamnosus* I y *Lactobacillus. pentosus* pueden inhibir su crecimiento incluso después de ser sometidas al calor y a pH 7 [147]. Asimismo, las BLIS de *L. fermentum* CS57 han mostrado actividad inhibitoria contra *C. albicans* ATCC 60193.

#### **6.4.2. CMI del CFS 7**

En nuestros resultados, observamos que el CFS ajustado a pH 7 de *Lactobacillus plantarum*, *L. delbrueckii* y *L. acidophilus* mostró inhibiciones del 28.35 %, 25.21 % y 23.43 %, respectivamente, sobre el crecimiento de *C. albicans* (Figura 24). Estos resultados coinciden en gran medida con los reportados por Scillato et al. (2021), quienes evaluaron las cepas *L. fermentum* 18 A-TV, *Lactobacillus gasseri* 1A-TV y *L. crispatus* 35 A-TV, encontrando inhibiciones del 33.33 %, 33.33 % y 0 %, respectivamente, al ajustar el pH de sus CFS a 7.5 [148]

El ajuste del pH a valores neutros, como el pH 7 en nuestro estudio, tiene un impacto notable en la eficacia antimicótica del ácido láctico, uno de los principales metabolitos producidos por las BAL. En condiciones de pH ácido, parte de sus moléculas se encuentran en la forma no disociada, lo que le permite atravesar de manera más

eficiente la membrana c citoplasmática de *C. albicans*. Mientras que, al ajustar el pH a 7, el ácido láctico se disocia en sus iones, lo que disminuye su capacidad para penetrar la membrana citoplasmática y, por tanto, reduce su actividad antimicótica [128, 129].

### **6.4.3. CMI de los postbióticos**

Los postbióticos a una concentración de 50 % v/v mostraron una inhibición significativa en el crecimiento de *C. albicans* del 95.04 % por *L. plantarum*, 86.5 % por *L. delbrueckii*, y 88.35 % por *L. acidophilus*. Aunque estos resultados son prometedores en términos de inhibición del crecimiento del patógeno, es necesario analizar ciertos aspectos que pueden haber influido en los resultados.

En primer lugar, se dio la coagregación entre los microorganismos en nuestras tinciones (Figura 26-32). Este fenómeno puede influir en la precisión de las mediciones de crecimiento, ya que los microorganismos agrupados tienden a dispersar menos luz que las células individuales [149]. En nuestro experimento, la prueba de CMI se llevó a cabo utilizando un espectrofotómetro lector de microplacas, midiendo la OD. En este tipo de técnica, un haz de luz atraviesa la muestra y la luz dispersada es detectada para calcular la OD, la cual se correlaciona con las UFC/mL [150]. Sin embargo, la relación entre OD y UFC/mL puede verse afectada por factores como la longitud de la trayectoria de la luz, la densidad del cultivo celular y el tamaño de las células [151].

Para evaluar el efecto inhibitorio sobre *C. albicans*, se realizaron conteos en placa, pero no se observó inhibición, lo que confirma que la coagregación genera un efecto óptico capaz de reducir la OD sin reflejar actividad antimicrobiana directa. La

coagregación observada, al involucrar postbióticos, se limita a una interacción física con *C. albicans*, sin evidenciar un efecto inhibitorio sobre el patógeno. Sin embargo, estudios previos han destacado que los postbióticos pueden ofrecer importantes beneficios para la salud humana, incluyendo la activación de receptores inmunitarios como TLR2 y NOD2 mediante componentes celulares como peptidoglicano y ácido lipoteicoico, así como la regulación de citoquinas inflamatorias (TNF- $\alpha$ , IL-6) y antiinflamatorias (IL-10) [152]. Esto los posiciona como una alternativa segura, sin riesgos asociados a la translocación bacteriana ni a la resistencia a antibióticos[153]. No obstante, este estudio no abordó dichos beneficios, limitándose al análisis de su interacción física con *C. albicans*.

#### **6.4.4. CMI del probiótico**

Nuestros resultados muestran que la exposición de *C. albicans* a una concentración de  $1 \times 10^9$  de cualquiera de las BAL estudiadas produjo una inhibición completa (100 %) de su crecimiento. Estos resultados difieren de los reportados por Zeng et al. (2022), quienes observaron una inhibición de 1,5 ciclos log al utilizar *L. plantarum* a una concentración de  $1 \times 10^8$ , junto con *C. albicans* y *S. mutans* a una concentración de  $1 \times 10^3$ . La menor inhibición en su estudio podría deberse al tipo de medio utilizado (TSBYE) y al cultivo mixto con otra bacteria. [31].

Respecto a nuestros hallazgos sobre el cocultivo de *C. albicans* con *L. delbrueckii*, *L. plantarum* y *L. acidophilus* en proporciones iguales ( $1 \times 10^6$ ), observamos inhibiciones del 78.82 %, 87.23 % y 68.09 %, respectivamente. Estos resultados son similares a los

reportados por Xu et al. (2024), quienes registraron una inhibición del 82,34 % tras 24 horas de cocultivo en medio MRS suplementado con Extracto de Levadura, Peptona y Dextrosa (YDP, por sus siglas en inglés) de *L. plantarum* y *C. albicans* [99].

El efecto inhibitorio del probiótico podría estar relacionado principalmente con la proporción de bacterias por cada célula de *C. albicans*. Dado que la levadura (6  $\mu\text{m}$ ) es significativamente más grande que las BAL (1.5  $\mu\text{m}$ ), un mayor número de bacterias se adheriría y cubriría una mayor superficie de la levadura a través de la coagregación y habrá mayor consumo de nutrientes por parte de las BAL al encontrarse en mayor proporción [154, 155]. Esta interacción física, sumada a la producción de metabolitos antimicrobianos como ácidos orgánicos, bacteriocinas, biosurfactantes y peróxido de hidrogeno, podría haber un contacto más directo y mayor efectividad de los compuesto antifúngicos producidos por las BAL [101]. Otro factor crucial en la inhibición de *C. albicans* por parte de las BAL es la competencia por nutrientes. Gracias a su menor tiempo de generación, las BAL consume los nutrientes esenciales, como la glucosa, de manera más rápida y eficiente que *C. albicans*, lo que limita la disponibilidad de estos recursos para la levadura. Este agotamiento de nutrientes no solo reduce el crecimiento de *C. albicans*, sino que también altera el entorno del cultivo, como el pH, creando condiciones desfavorables para su desarrollo y virulencia. Como resultado, las BAL puede inhibir la proliferación del patógeno al dominar el acceso a los nutrientes y modificar las condiciones del cocultivo [138, 156, 157].

## **6.5. Evaluación Microscópica**

Al observar las muestras de *C. albicans* bajo el microscopio, se evidenció una

clara coagregación entre ambos microorganismos tras 24 horas de incubación (Figura 26-32). Un estudio previo mostró que la coagregación de *L. plantarum*, inactivado a 80°C durante 15 minutos, con *L. monocytogenes* aumentaba significativamente en comparación con el control sin tratamiento térmico[76]. Nuestros resultados son consistentes con los reportados por Salari et al. (2020), quienes también observaron la coagregación pero con probióticos vivos de *L. plantarum* y *L. acidophilus* con *C. albicans* [111]. De manera similar, en otro estudio reportaron la coagregación de células vivas de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* LLB-02 y *L. acidophilus* LLA-01 con *C. albicans* [104]. Además, en otro estudio de cocultivos de *Lactobacillus* y *Saccharomyces cerevisiae* CNCM I-3856 contra *C. albicans* determinaron que la coagregación jugaba un papel importante para evitar la adhesión del patógeno a tejidos epiteliales y incrementa el contacto entre *C. albicans* y los metabolitos antifúngicos de las bacterias y *S. cerevisiae*, promoviendo efectos sinérgicos [107].

Esta coagregación parece estar mediada principalmente por las proteínas de la capa superficial (S-layer), cuya composición hidrófoba permite la interacción con los lípidos de la pared celular de otros microorganismos [158, 159]. En el caso de *L. helveticus*, se ha documentado que el gen *slpA* codifica para las proteínas S-layer, que se adhieren a la pared celular a través de interacciones con ácidos teicoicos y lipoteicoicos [159–161]. Este anclaje es crucial para la estabilidad de la capa S y su capacidad de mediar la coagregación. De hecho, estudios con cepas de *L. plantarum* han demostrado que la eliminación de la capa S reduce significativamente sus propiedades de adhesión [162]. Además, investigaciones con *L. helveticus* mostraron que la exposición a LiCl provoca el desprendimiento de las proteínas de la capa S, lo que disminuye notablemente la

coagregación tanto con otras BAL como con bacterias patógenas, lo que subraya la importancia de esta estructura en la interacción entre microorganismos [163] Otras moléculas importantes en la coagregación son las proteínas asociadas a la capa S (SLAPs, por sus siglas en inglés) también juegan un rol importante en la coagregación y la adhesión al tejido del huésped. Se ha reportado que la eliminación de las SLAPs puede reducir la adhesión bacteriana hasta en un 90 % [164, 165].

Aunque no se han realizado estudios específicos sobre la desnaturalización de las proteínas de la capa S a altas temperaturas, se sabe que estas proteínas tienen la capacidad de autoensamblarse y resistir condiciones extremas, como pH por debajo de 3. Esto sugiere que las proteínas de la capa S podrían conservar su funcionalidad tras la exposición a altas temperaturas, permitiendo a los postbióticos formar coagregados con microorganismos vivos [166].

Por otro lado, *C. albicans* también demuestra capacidad de coagregarse con patógenos orales mediante diversos mecanismos. En este contexto, *efg1*, un regulador morfológico asociado a la formación de hifas resulta fundamental al inducir la expresión de genes adhesivos clave como *als3* y *hwp1* [167]. Por ejemplo, en cocultivos con *P. gingivalis*, dicha interacción se establece a través de la adhesina fúngica *als3* y la gingipaína RgpA, mientras que en las interacciones con *S. mutans*, los EPS sintetizados por esta bacteria generan una matriz rica en glucanos que contribuye a la estabilidad y cohesión del biofilm mixto [168]. Por lo tanto, la coagregación podría estar mediada no solo por los *Lactobacillus*, sino también por *C. albicans*.

## CAPÍTULO 7

### CONCLUSIONES

- El medio MRS suplementado con peptona bacteriológica (10.0 g/L) y extracto de levadura (5.0 g/L) permitió el crecimiento y cocultivo de *L. plantarum* 299 V (DSM 9843), *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ATCC 11842, *L. acidophilus* ATCC 4356 y *C. albicans* sin encontrar diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en comparación con el crecimiento observado en el medio control MRS para las BAL y YM para *C. albicans*. Además, no se observaron cambios en la morfología de las colonias en ninguno de los microorganismos.
- La bacteria *L. plantarum* 299 V (DSM 9843) mostró la mayor actividad antimicótica contra la levadura *C. albicans* en los cocultivos, reduciéndola en 2.39 ciclos logarítmicos a las 24 horas, seguida por *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ATCC 11842, con una inhibición de 1.28 ciclos logarítmicos, mientras que *L. acidophilus* ATCC 4356 mostró una reducción menor de 0.81 ciclos logarítmicos.
- La sonicación con ciclos de 59 segundos encendido y 20 segundos apagado, a una

amplitud del 70 % y una frecuencia de 125 KHz durante 14 minutos, no fue un tratamiento efectivo para matar todas las células de *L. acidophilus* ATCC 4356; sin embargo, mostró una reducción significativa de 0.28 ciclos logarítmicos ( $p < 0.05$ ) al compararla con su control.

- Las BAL, su CFS y su postbiótico no mostraron inhibición frente a *C. albicans* mediante la técnica de difusión en pozos de agar. No obstante, a través de la CMI por microdilución en medio líquido se observaron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en los porcentajes de inhibición respecto al control.
- El CFS de *L. acidophilus* ATCC 4356, a una concentración del 50 % v/v, mostró la mayor inhibición frente a *C. albicans*, con un 79.01 % a pH 3.85, seguido por *L. plantarum* 299V (DSM 9843) con un 74.59 % a pH 3.81 y *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ATCC 11842 con un 72.42 % a pH 3.84, todos evaluados a la misma concentración. Sin embargo, al ajustar el pH de los CFS a 7 y mantener la concentración al 50 % v/v, la inhibición disminuyó significativamente: *L. acidophilus* ATCC 4356 alcanzó un 23.43 %, *L. plantarum* 299V (DSM 9843) un 28.35 %, y *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ATCC 11842 un 25.21 %.
- Los postbióticos, a una concentración del 50 % v/v, mostraron una aparente inhibición contra *C. albicans*: 95.04 % para *L. plantarum* 299V (DSM 9843), 88.35 % para *L. acidophilus* ATCC 4356, y 86.5 % para *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ATCC 11842. Esta inhibición se observó utilizando la CMI. Sin embargo, los resultados estuvieron influenciados por interferencias ópticas debido a la coagregación entre los postbióticos de las BAL y *C. albicans*. Al verificar los

resultados mediante conteo en placa, no se detectó ningún tipo de inhibición.

- La concentración de  $1 \times 10^9$  UFC/mL de las BAL vivas de las cepas estudiadas mostró un efecto antimicótico, ya que no se observó crecimiento de *C. albicans* después de 24 horas de cocultivo. Este efecto podría estar relacionado con la coagregación de las bacterias alrededor de la levadura, lo que facilita una acción más directa del ácido láctico y otras sustancias inhibitorias. Además, debido a que los *Lactobacillus* tienen un tiempo de generación más corto, pueden consumir los nutrientes más rápidamente, lo que limita el crecimiento de *C. albicans*.
- Con base en los resultados obtenidos, se concluye que las BAL estudiadas no presentan un único mecanismo de acción para inhibir a *C. albicans*. Por el contrario, la inhibición parece resultar de una combinación de diversos mecanismos que actúan de manera sinérgica. La coagregación observada se limita principalmente a una interacción física entre los probióticos y el patógeno, pero facilita un contacto más directo con las sustancias antifúngicas producidas. Además, el ácido láctico generado por las BAL, en condiciones de pH ácido, podría contribuir a la disrupción de la membrana de *C. albicans*, complementado por la acción de bacteriocinas y el peróxido de hidrógeno. Por otro lado, la rápida tasa de crecimiento de las BAL disminuye la disponibilidad de nutrientes esenciales, impactando negativamente el desarrollo del patógeno.

## 7.1. Perspectivas

- Llevar a cabo un análisis detallado de la expresión génica de las BAL y *Candida albicans* durante el cocultivo a lo largo del tiempo, con el objetivo de identificar los cambios en la expresión de genes que puedan estar asociados con la inhibición de *C. albicans*.
- Utilizar microscopía electrónica de barrido (SEM) para observar los coagregados formados entre los postbióticos de las BAL y *C. albicans*. Esta técnica permitirá obtener información detallada sobre las interacciones físicas entre las membranas de ambos microorganismos.
- Separar las membranas de los postbióticos de BAL tras su inactivación mediante métodos químicos, como el uso de LiCl, y confirmar si persiste la coagregación entre los postbióticos y *C. albicans*, para explorar el papel de las proteínas S-layer en estas interacciones físicas.

## CAPÍTULO 8

### REFERENCIAS

1. Rokas, A.: Evolution of the human pathogenic lifestyle in fungi. *Nat Microbiol.* 7, 607–619 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41564-022-01112-0>
2. Thambugala, K.M., Daranagama, D.A., Tennakoon, D.S., Jayatunga, D.P.W., Hongsanan, S., Xie, N.: Humans vs. Fungi: An Overview of Fungal Pathogens against Humans. *Pathogens.* 13, 426 (2024). <https://doi.org/10.3390/pathogens13050426>
3. Bongomin, F., Gago, S., Oladele, R., Denning, D.: Global and Multi-National Prevalence of Fungal Diseases—Estimate Precision. *JoF.* 3, 57 (2017). <https://doi.org/10.3390/jof3040057>
4. Perea, S., Patterson, T.F.: Antifungal Resistance in Pathogenic Fungi. *CLIN INFECT DIS.* 35, 1073–1080 (2002). <https://doi.org/10.1086/344058>
5. Hossain, C.M., Ryan, L.K., Gera, M., Choudhuri, S., Lyle, N., Ali, K.A., Diamond, G.: Antifungals and Drug Resistance. *Encyclopedia.* 2, 1722–1737 (2022). <https://doi.org/10.3390/encyclopedia2040118>
6. Nnadi, N.E., Carter, D.A.: Climate change and the emergence of fungal pathogens. *PLoS Pathog.* 17, e1009503 (2021). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009503>
7. OMS: WHO Fungal Priority Pathogens List to Guide Research, Development and Public Health Action. World Health Organization, Geneva (2022)
8. Richardson, J.P.: *Candida albicans*: A Major Fungal Pathogen of Humans. *Pathogens.* 11, 459 (2022). <https://doi.org/10.3390/pathogens11040459>
9. Pappas, P.G., Lionakis, M.S., Arendrup, M.C., Ostrosky-Zeichner, L., Kullberg, B.J.: Invasive candidiasis. *Nat Rev Dis Primers.* 4, 18026 (2018). <https://doi.org/10.1038/nrdp.2018.26>
10. Talapko, J., Juzbašić, M., Matijević, T., Pustijanac, E., Bekić, S., Kotris, I., Škrlec, I.: *Candida albicans*—The Virulence Factors and Clinical Manifestations of Infection. *JoF.* 7, 79 (2021). <https://doi.org/10.3390/jof7020079>
11. Reyes-Montes, M.D.R., Duarte-Escalante, E., Martínez-Herrera, E., Acosta-Altamirano, G., Frías-De León, M.G.: Current status of the etiology of candidiasis in Mexico. *Revista Iberoamericana de Micología.* 34, 203–210 (2017). <https://doi.org/10.1016/j.riam.2017.05.001>
12. Vila, T., Sultan, A.S., Montelongo-Jauregui, D., Jabra-Rizk, M.A.: Oral Candidiasis: A Disease of Opportunity. *JoF.* 6, 15 (2020). <https://doi.org/10.3390/jof6010015>
13. Hato, H., Sakata, K., Sato, J., Hasebe, A., Yamazaki, Y., Kitagawa, Y.: Factor associated

- with oral candidiasis caused by co-infection of *Candida albicans* and *Candida glabrata*: A retrospective study. *Journal of Dental Sciences*. 17, 1458–1461 (2022). <https://doi.org/10.1016/j.jds.2021.10.020>
14. Li, Y., Huang, S., Du, J., Wu, M., Huang, X.: Current and prospective therapeutic strategies: tackling *Candida albicans* and *Streptococcus mutans* cross-kingdom biofilm. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 13, 1106231 (2023). <https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1106231>
  15. Lee, Y., Robbins, N., Cowen, L.E.: Molecular mechanisms governing antifungal drug resistance. *npj Antimicrob Resist.* 1, 5 (2023). <https://doi.org/10.1038/s44259-023-00007-2>
  16. Wall, G., Lopez-Ribot, J.L.: Current Antimycotics, New Prospects, and Future Approaches to Antifungal Therapy. *Antibiotics*. 9, 445 (2020). <https://doi.org/10.3390/antibiotics9080445>
  17. Poon, Y., Hui, M.: Inhibitory effect of lactobacilli supernatants on biofilm and filamentation of *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, and *Candida parapsilosis*. *Front. Microbiol.* 14, 1105949 (2023). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1105949>
  18. Armstrong, A.W., Blauvelt, A., Mrowietz, U., Strober, B., Gisondi, P., Merola, J.F., Langley, R.G., Stähle, M., Lebwohl, M., Netea, M.G., Nunez Gomez, N., Warren, R.B.: A Practical Guide to the Management of Oral Candidiasis in Patients with Plaque Psoriasis Receiving Treatments That Target Interleukin-17. *Dermatol Ther (Heidelb)*. 12, 787–800 (2022). <https://doi.org/10.1007/s13555-022-00687-0>
  19. Henriques, M., Silva, S.: *Candida Albicans* Virulence Factors and Its Pathogenicity. *Microorganisms*. 9, 704 (2021). <https://doi.org/10.3390/microorganisms9040704>
  20. Kadosh, D.: Regulatory mechanisms controlling morphology and pathogenesis in *Candida albicans*. *Current Opinion in Microbiology*. 52, 27–34 (2019). <https://doi.org/10.1016/j.mib.2019.04.005>
  21. Prasad, P., Tippana, M.: Morphogenic plasticity: the pathogenic attribute of *Candida albicans*. *Curr Genet*. 69, 77–89 (2023). <https://doi.org/10.1007/s00294-023-01263-5>
  22. Pierce, C., Vila, T., Romo, J., Montelongo-Jauregui, D., Wall, G., Ramasubramanian, A., Lopez-Ribot, J.: The *Candida albicans* Biofilm Matrix: Composition, Structure and Function. *JoF*. 3, 14 (2017). <https://doi.org/10.3390/jof3010014>
  23. Ajetunmobi, O.H., Badali, H., Romo, J.A., Ramage, G., Lopez-Ribot, J.L.: Antifungal therapy of *Candida* biofilms: Past, present and future. *Biofilm*. 5, 100126 (2023). <https://doi.org/10.1016/j.biofilm.2023.100126>
  24. Ramage, G., Borghi, E., Rodrigues, C.F., Kean, R., Williams, C., Lopez-Ribot, J.: Our current clinical understanding of *Candida* biofilms: where are we two decades on? *APMIS*. 131, 636–653 (2023). <https://doi.org/10.1111/apm.13310>
  25. Hannah, V.E., O'Donnell, L., Robertson, D., Ramage, G.: Denture Stomatitis: Causes, Cures and Prevention. *Prim Dent J*. 6, 46–51 (2017). <https://doi.org/10.1308/205016817822230175>
  26. Ordaya, E.E., Clement, J., Vergidis, P.: The Role of Novel Antifungals in the Management of Candidiasis: A Clinical Perspective. *Mycopathologia*. 188, 937–948 (2023). <https://doi.org/10.1007/s11046-023-00759-5>
  27. Tits, J., Cammue, B.P.A., Thevissen, K.: Combination Therapy to Treat Fungal Biofilm-Based Infections. *IJMS*. 21, 8873 (2020). <https://doi.org/10.3390/ijms21228873>
  28. Jordão, C.C., Klein, M.I., Barbugli, P.A., Mima, E.G.D.O., De Sousa, T.V., Ferrisse, T.M., Pavarina, A.C.: DNase improves the efficacy of antimicrobial photodynamic therapy in the treatment of candidiasis induced with *Candida albicans*. *Front. Microbiol.* 14, 1274201 (2023). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1274201>
  29. Jørgensen, M.R., Kragelund, C., Jensen, P.Ø., Keller, M.K., Twetman, S.: Probiotic

- Lactobacillus reuteri* has antifungal effects on oral *Candida* species *in vitro*. *Journal of Oral Microbiology*. 9, 1274582 (2017). <https://doi.org/10.1080/20002297.2016.1274582>
30. Alonso-Roman, R., Last, A., Mirhakkak, M.H., Sprague, J.L., Möller, L., Großmann, P., Graf, K., Gratz, R., Mogavero, S., Vylkova, S., Panagiotou, G., Schäuble, S., Hube, B., Gresnigt, M.S.: *Lactobacillus rhamnosus* colonisation antagonizes *Candida albicans* by forcing metabolic adaptations that compromise pathogenicity. *Nat Commun*. 13, 3192 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41467-022-30661-5>
  31. Zeng, Y., Fadaak, A., Alomeir, N., Wu, T.T., Rustchenko, E., Qing, S., Bao, J., Gilbert, C., Xiao, J.: *Lactobacillus plantarum* Disrupts *S. mutans*–*C. albicans* Cross-Kingdom Biofilms. *Front. Cell. Infect. Microbiol*. 12, 872012 (2022). <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.872012>
  32. Organización Mundial de Gastroenterología: Probióticos y prebióticos. (2023)
  33. George Kerry, R., Patra, J.K., Gouda, S., Park, Y., Shin, H.-S., Das, G.: Benefaction of probiotics for human health: A review. *Journal of Food and Drug Analysis*. 26, 927–939 (2018). <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2018.01.002>
  34. DiMattia, Z., Damani, J.J., Van Syoc, E., Rogers, C.J.: Effect of Probiotic Supplementation on Intestinal Permeability in Overweight and Obesity: A Systematic Review of Randomized Controlled Trials and Animal Studies. *Advances in Nutrition*. 15, 100162 (2024). <https://doi.org/10.1016/j.advnut.2023.100162>
  35. Maia, L.P., Levi, Y.L.D.A.S., Do Prado, R.L., Santinoni, C.D.S., Marsicano, J.A.: Effects of probiotic therapy on serum inflammatory markers: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Functional Foods*. 54, 466–478 (2019). <https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.01.051>
  36. Mazziotta, C., Tognon, M., Martini, F., Torreggiani, E., Rotondo, J.C.: Probiotics Mechanism of Action on Immune Cells and Beneficial Effects on Human Health. *Cells*. 12, 184 (2023). <https://doi.org/10.3390/cells12010184>
  37. Asan, M.F., Babu G, S., Bhat, S.: Effect of probiotics on oral *Candida*-a review. *GMJ*. 64, 289–294 (2022). <https://doi.org/10.4274/gulhane.galenos.2021.18291>
  38. Vazquez-Munoz, R., Thompson, A., Sobue, T., Dongari-Bagtzoglou, A.: *Lactobacillus johnsonii* is a dominant *Lactobacillus* in the murine oral mucosa and has chitinase activity that compromises fungal cell wall integrity. *mBio*. 15, e02416-24 (2024). <https://doi.org/10.1128/mbio.02416-24>
  39. Lau, L.Y.J., Quek, S.Y.: Probiotics: Health benefits, food application, and colonization in the human gastrointestinal tract. *Food Bioengineering*. 3, 41–64 (2024). <https://doi.org/10.1002/fbe2.12078>
  40. Tutunchi, H., Naghshi, S., Naemi, M., Naeini, F., Esmailzadeh, A.: Yogurt consumption and risk of mortality from all causes, CVD and cancer: a comprehensive systematic review and dose–response meta-analysis of cohort studies. *Public Health Nutr*. 26, 1196–1209 (2023). <https://doi.org/10.1017/S1368980022002385>
  41. Jan, G., Tarnaud, F., Rosa Do Carmo, F.L., Illikoud, N., Canon, F., Jardin, J., Briard-Bion, V., Guyomarc’h, F., Gagnaire, V.: The stressing life of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* in soy milk. *Food Microbiology*. 106, 104042 (2022). <https://doi.org/10.1016/j.fm.2022.104042>
  42. Tang, J., Peng, X., Liu, D., Xu, Y., Liang, M., Xiong, J., Wu, J.: Assessment of the safety and probiotic properties of *Lactobacillus delbrueckii* DMLD-H1 based on comprehensive genomic and phenotypic analysis. *LWT*. 184, 115070 (2023). <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2023.115070>
  43. M.A., N.: *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium and *Lactobacillus* spp. interactions *in vitro* elicit improved antimicrobial production. *Trop Biomed*. 40, 14–22 (2023). <https://doi.org/10.47665/tb.40.1.006>

44. Gönczi, N.N., Strang, O., Bagi, Z., Rákhely, G., Kovács, K.L.: Interactions between probiotic and oral pathogenic strains. *BIOLOGIA FUTURA*. 72, 461–471 (2021). <https://doi.org/10.1007/s42977-021-00091-3>
45. Lorenzo, J.M., Munekata, P.E., Dominguez, R., Pateiro, M., Saraiva, J.A., Franco, D.: Main Groups of Microorganisms of Relevance for Food Safety and Stability. In: *Innovative Technologies for Food Preservation*. pp. 53–107. Elsevier (2018)
46. Zeng, Z., Huang, Z., Yue, W., Nawaz, S., Chen, X., Liu, J.: *Lactobacillus plantarum* modulate gut microbiota and intestinal immunity in cyclophosphamide-treated mice model. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 169, 115812 (2023). <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2023.115812>
47. Huang, S., Jiang, S., Huo, D., Allaband, C., Estaki, M., Cantu, V., Belda-Ferre, P., Vázquez-Baeza, Y., Zhu, Q., Ma, C., Li, C., Zarrinpar, A., Liu, Y.-Y., Knight, R., Zhang, J.: Candidate probiotic *Lactiplantibacillus plantarum* HNU082 rapidly and convergently evolves within human, mice, and zebrafish gut but differentially influences the resident microbiome. *Microbiome*. 9, 151 (2021). <https://doi.org/10.1186/s40168-021-01102-0>
48. Abou Elez, R.M.M., Elsohaby, I., Al-Mohammadi, A.-R., Seliem, M., Tahoun, A.B.M.B., Abousaty, A.I., Algendy, R.M., Mohamed, E.A.A., El-Gazzar, N.: Antibacterial and anti-biofilm activities of probiotic *Lactobacillus plantarum* against *Listeria monocytogenes* isolated from milk, chicken and pregnant women. *Front. Microbiol.* 14, 1201201 (2023). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1201201>
49. Abootaleb, M., Mohammadi Bandari, N., Arbab Soleimani, N.: Interference of *Lactiplantibacillus plantarum* With *Pseudomonas aeruginosa* on the Infected Burns in Wistar Rats. *Journal of Burn Care & Research*. 43, 951–956 (2022). <https://doi.org/10.1093/jbcr/irab229>
50. Huang, X., Bao, J., Zeng, Y., Meng, G., Lu, X., Wu, T.T., Ren, Y., Xiao, J.: Anti-cariogenic Properties of *Lactobacillus plantarum* in the Utilization of Galacto-Oligosaccharide. *Nutrients*. 15, 2017 (2023). <https://doi.org/10.3390/nu15092017>
51. Zhang, J., Duan, Z.: Identification of a new probiotic strain, *Lactiplantibacillus plantarum* VHProbi® V38, and its use as an oral health agent. *Front. Microbiol.* 13, 1000309 (2022). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1000309>
52. Jia, G., Liu, X., Zhi, A., Li, J., Wu, Y., Zhang, Y.: Characterization and Selection of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus paracasei* for prevention of oral bacterial infections from Chinese pickle. *AMB Expr.* 11, 84 (2021). <https://doi.org/10.1186/s13568-021-01245-1>
53. Gaspar, C., Donders, G.G., Palmeira-de-Oliveira, R., Queiroz, J.A., Tomaz, C., Martinez-de-Oliveira, J., Palmeira-de-Oliveira, A.: Bacteriocin production of the probiotic *Lactobacillus acidophilus* KS400. *AMB Expr.* 8, 153 (2018). <https://doi.org/10.1186/s13568-018-0679-z>
54. Pratiwi, S.T., Andana, P.: Identification of Bacteriocin Gene in *Lactobacillus acidophilus*. In: Kumala, Y.Y., Juliastuti, H., and Pratiwi, S.T. (eds.) *Proceedings of The 13th Annual Scientific Conference of Medical Faculty, Universitas Jenderal Achmad Yani (ASCMF 2022)*. pp. 3–8. Atlantis Press International BV, Dordrecht (2023)
55. Wu, Z., Pan, D., Guo, Y., Zeng, X.: Structure and anti-inflammatory capacity of peptidoglycan from *Lactobacillus acidophilus* in RAW-264.7 cells. *Carbohydrate Polymers*. 96, 466–473 (2013). <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.04.028>
56. Bertuccini, L., Russo, R., Iosi, F., Superti, F.: Effects of *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus acidophilus* on bacterial vaginal pathogens. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 30, 163–167 (2017). <https://doi.org/10.1177/0394632017697987>
57. Zhao, L., Zhang, D., Liu, Y., Zhang, Y.-N., Meng, D.-Q., Xu, Q., Zhong, J., Jiang, Q.-Y., Zhao, Y., Wang, S.-J.: Quantitative PCR Assays for the Strain-Specific Identification and

- Enumeration of Probiotic Strain *Lacticaseibacillus rhamnosus* X253. *Foods*. 11, 2282 (2022). <https://doi.org/10.3390/foods11152282>
58. McFarland, L.V., Ship, N., Auclair, J., Millette, M.: Primary prevention of *Clostridium difficile* infections with a specific probiotic combining *Lactobacillus acidophilus*, *L. casei*, and *L. rhamnosus* strains: assessing the evidence. *Journal of Hospital Infection*. 99, 443–452 (2018). <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2018.04.017>
  59. Srivastava, S.: Effect of Probiotic Curd on Salivary pH and *Streptococcus mutans*: A Double Blind Parallel Randomized Controlled Trial. *JCDR*. (2016). <https://doi.org/10.7860/JCDR/2016/15530.7178>
  60. Lee, S.-H., Kim, Y.-J.: A comparative study of the effect of probiotics on cariogenic biofilm model for preventing dental caries. *Arch Microbiol*. 196, 601–609 (2014). <https://doi.org/10.1007/s00203-014-0998-7>
  61. Salminen, S., Collado, M.C., Endo, A., Hill, C., Lebeer, S., Quigley, E.M.M., Sanders, M.E., Shamir, R., Swann, J.R., Szajewska, H., Vinderola, G.: The International Scientific Association of Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of postbiotics. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 18, 649–667 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41575-021-00440-6>
  62. Thorakkattu, P., Khanashyam, A.C., Shah, K., Babu, K.S., Mundanat, A.S., Deliephan, A., Deokar, G.S., Santivarangkna, C., Nirmal, N.P.: Postbiotics: Current Trends in Food and Pharmaceutical Industry. *Foods*. 11, 3094 (2022). <https://doi.org/10.3390/foods11193094>
  63. Kadry, A.A., El-Antrawy, M.A., El-Ganiny, A.M.: Impact of short chain fatty acids (SCFAs) on antimicrobial activity of new  $\beta$ -lactam/ $\beta$ -lactamase inhibitor combinations and on virulence of *Escherichia coli* isolates. *J Antibiot*. 76, 225–235 (2023). <https://doi.org/10.1038/s41429-023-00595-1>
  64. Tarique, M., Ali, A.H., Kizhakkayil, J., Gan, R.-Y., Liu, S.-Q., Kamal-Eldin, A., Ayyash, M.: Investigating the biological activities and prebiotic potential of exopolysaccharides Produced by *Lactobacillus delbrueckii* and *Lacticaseibacillus rhamnosus*: Implications for gut microbiota modulation and rheological properties in fermented milk. *Food Hydrocolloids for Health*. 4, 100162 (2023). <https://doi.org/10.1016/j.fhfh.2023.100162>
  65. Rafique, N., Jan, S.Y., Dar, A.H., Dash, K.K., Sarkar, A., Shams, R., Pandey, V.K., Khan, S.A., Amin, Q.A., Hussain, S.Z.: Promising bioactivities of postbiotics: A comprehensive review. *Journal of Agriculture and Food Research*. 14, 100708 (2023). <https://doi.org/10.1016/j.jafr.2023.100708>
  66. Mgomi, F.C., Yang, Y., Cheng, G., Yang, Z.: Lactic acid bacteria biofilms and their antimicrobial potential against pathogenic microorganisms. *Biofilm*. 5, 100118 (2023). <https://doi.org/10.1016/j.bioflm.2023.100118>
  67. Drumond, M.M., Tapia-Costa, A.P., Neumann, E., Nunes, Á.C., Barbosa, J.W., Kassuha, D.E., Mancha-Agresti, P.: Cell-free supernatant of probiotic bacteria exerted antibiofilm and antibacterial activities against *Pseudomonas aeruginosa*: A novel biotic therapy. *Front. Pharmacol*. 14, 1152588 (2023). <https://doi.org/10.3389/fphar.2023.1152588>
  68. Arrijoja-Bretón, D., Mani-López, E., Palou, E., López-Malo, A.: Antimicrobial activity and storage stability of cell-free supernatants from lactic acid bacteria and their applications with fresh beef. *Food Control*. 115, 107286 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107286>
  69. Salemi, R., Vivarelli, S., Ricci, D., Scillato, M., Santagati, M., Gattuso, G., Falzone, L., Libra, M.: *Lactobacillus rhamnosus* GG cell-free supernatant as a novel anti-cancer adjuvant. *J Transl Med*. 21, 195 (2023). <https://doi.org/10.1186/s12967-023-04036-3>
  70. Rossoni, R.D., Velloso, M.D.S., De Barros, P.P., De Alvarenga, J.A., Santos, J.D.D., Santos Prado, A.C.C.D., Ribeiro, F.D.C., Anbinder, A.L., Junqueira, J.C.: Inhibitory effect of probiotic *Lactobacillus* supernatants from the oral cavity on *Streptococcus mutans*

- biofilms. *Microbial Pathogenesis*. 123, 361–367 (2018). <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.07.032>
71. Hirasawa, M.: Probiotic Potential of Lactobacilli Isolated from Saliva of Periodontally Healthy Individuals. *Oral Health and Preventive Dentistry*. 18, 563–570 (2020). <https://doi.org/10.3290/j.ohpd.a44693>
  72. Aguilar-Toalá, J.E., Arioli, S., Behare, P., Belzer, C., Berni Canani, R., Chatel, J.-M., D’Auria, E., De Freitas, M.Q., Elinav, E., Esmerino, E.A., García, H.S., Da Cruz, A.G., González-Córdova, A.F., Guglielmetti, S., De Toledo Guimarães, J., Hernández-Mendoza, A., Langella, P., Liceaga, A.M., Magnani, M., Martin, R., Mohamad Lal, M.T., Mora, D., Moradi, M., Morelli, L., Mosca, F., Nazzaro, F., Pimentel, T.C., Ran, C., Ranadheera, C.S., Rescigno, M., Salas, A., Sant’Ana, A.S., Sivieri, K., Sokol, H., Taverniti, V., Vallejo-Cordoba, B., Zelenka, J., Zhou, Z.: Postbiotics — when simplification fails to clarify. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 18, 825–826 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41575-021-00521-6>
  73. Yenkie, K.M., Wu, W., Clark, R.L., Pflieger, B.F., Root, T.W., Maravelias, C.T.: A roadmap for the synthesis of separation networks for the recovery of bio-based chemicals: Matching biological and process feasibility. *Biotechnology Advances*. 34, 1362–1383 (2016). <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.10.003>
  74. Cuevas-González, P.F., Liceaga, A.M., Aguilar-Toalá, J.E.: Postbiotics and paraprobiotics: From concepts to applications. *Food Research International*. 136, 109502 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109502>
  75. Kongsinkaew, C., Hongphankul, K., Soontornkitlert, T., Surarit, W., Sutheerawattananonda, M., Thitasirikul, P., Pornpukdeewattana, S., Chittapun, S., Panpeang, K., Charoenrat, T.: Large-scale production of paraprobiotic soy milk in stirred tank bioreactor: A dual-step fermentation approach. *Applied Food Research*. 4, 100446 (2024). <https://doi.org/10.1016/j.afres.2024.100446>
  76. Karbowski, M., Gałek, M., Szydłowska, A., Zielińska, D.: The Influence of the Degree of Thermal Inactivation of Probiotic Lactic Acid Bacteria and Their Postbiotics on Aggregation and Adhesion Inhibition of Selected Pathogens. *Pathogens*. 11, 1260 (2022). <https://doi.org/10.3390/pathogens11111260>
  77. Nam, Y., Kim, J., Baek, J., Kim, W.: Improvement of Cutaneous Wound Healing via Topical Application of Heat-Killed *Lactococcus chungangensis* CAU 1447 on Diabetic Mice. *Nutrients*. 13, 2666 (2021). <https://doi.org/10.3390/nu13082666>
  78. Ancuța, D.L., Alexandru, D.M., Muselin, F., Cristina, R.T., Coman, C.: Assessment of the Effect on Periodontitis of Antibiotic Therapy and Bacterial Lysate Treatment. *IJMS*. 25, 5432 (2024). <https://doi.org/10.3390/ijms25105432>
  79. Ievtushenko, M.S., Koshova, A.Yu., Kryzhna, S.I., Tyupka, T.I.: STUDY OF THE INFLUENCE OF BACTERIAL LYSATE ON OXIDATIVE STRESS INDICATORS IN EXPERIMENTAL PERIODONTIS IN RATS. *Lik. sprava*. 50–55 (2020). [https://doi.org/10.31640/JVD.7-8.2020\(6\)](https://doi.org/10.31640/JVD.7-8.2020(6))
  80. Mudaliar, S.B., Poojary, S.S., Bharath Prasad, A.S., Mazumder, N.: Probiotics and Paraprobiotics: Effects on Microbiota-Gut-Brain Axis and Their Consequent Potential in Neuropsychiatric Therapy. *Probiotics & Antimicro. Prot*. 16, 1440–1464 (2024). <https://doi.org/10.1007/s12602-024-10214-6>
  81. Rosero-Chasoy, G., Rodríguez-Jasso, R.M., Aguilar, C.N., Buitrón, G., Chairez, I., Ruiz, H.A.: Microbial co-culturing strategies for the production high value compounds, a reliable framework towards sustainable biorefinery implementation – an overview. *Bioresource Technology*. 321, 124458 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124458>
  82. Lodhi, A.F., Zhang, Y., Adil, M., Deng, Y.: Antibiotic discovery: combining isolation chip (iChip) technology and co-culture technique. *Appl Microbiol Biotechnol*. 102, 7333–7341

- (2018). <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9193-0>
83. Ravikrishnan, A., Blank, L.M., Srivastava, S., Raman, K.: Investigating metabolic interactions in a microbial co-culture through integrated modelling and experiments. *Computational and Structural Biotechnology Journal*. 18, 1249–1258 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2020.03.019>
  84. Li, Y., Ten, M.M.Z., Zwe, Y.H., Li, D.: Lactiplantibacillus plantarum 299v as starter culture suppresses Enterobacteriaceae more efficiently than spontaneous fermentation of carrots. *Food Microbiology*. 103, 103952 (2022). <https://doi.org/10.1016/j.fm.2021.103952>
  85. Jeong, J.H., Park, S., Jang, M., Kim, K.: Evaluating the Antagonistic Activity of Lactic Acid Bacteria in Cadaverine Production by Vibrio Strains during Co-Culture. *Fermentation*. 10, 356 (2024). <https://doi.org/10.3390/fermentation10070356>
  86. Gómez, B.L., Escandón, P.: Las infecciones fúngicas: una amenaza creciente. *biomedica*. 43, 11–16 (2023). <https://doi.org/10.7705/biomedica.7214>
  87. Costa-de-Oliveira, S., Rodrigues, A.G.: Candida albicans Antifungal Resistance and Tolerance in Bloodstream Infections: The Triad Yeast-Host-Antifungal. *Microorganisms*. 8, 154 (2020). <https://doi.org/10.3390/microorganisms8020154>
  88. Fioriti, S., Brescini, L., Pallotta, F., Canovari, B., Morroni, G., Barchiesi, F.: Antifungal Combinations against Candida Species: From Bench to Bedside. *JoF*. 8, 1077 (2022). <https://doi.org/10.3390/jof8101077>
  89. Benitez, L.L., Carver, P.L.: Adverse Effects Associated with Long-Term Administration of Azole Antifungal Agents. *Drugs*. 79, 833–853 (2019). <https://doi.org/10.1007/s40265-019-01127-8>
  90. Bhattacharya, S., Sae-Tia, S., Fries, B.C.: Candidiasis and Mechanisms of Antifungal Resistance. *Antibiotics*. 9, 312 (2020). <https://doi.org/10.3390/antibiotics9060312>
  91. Divyashree, S., Shruthi, B., Vanitha, P.R., Sreenivasa, M.Y.: Probiotics and their postbiotics for the control of opportunistic fungal pathogens: A review. *Biotechnology Reports*. 38, e00800 (2023). <https://doi.org/10.1016/j.btre.2023.e00800>
  92. Nordström, E.A., Teixeira, C., Montelius, C., Jeppsson, B., Larsson, N.: Lactiplantibacillus plantarum 299v (LP299V®): three decades of research. *BM*. 12, 441–466 (2021). <https://doi.org/10.3920/BM2020.0191>
  93. Teixeira, P.: LACTOBACILLUS | Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus. In: *Encyclopedia of Food Microbiology*. pp. 425–431. Elsevier (2014)
  94. Chen, L., Liu, W., Li, Y., Luo, S., Liu, Q., Zhong, Y., Jian, Z., Bao, M.: Lactobacillus acidophilus ATCC 4356 attenuates the atherosclerotic progression through modulation of oxidative stress and inflammatory process. *International Immunopharmacology*. 17, 108–115 (2013). <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2013.05.018>
  95. Li, C., Niu, Z., Zou, M., Liu, S., Wang, M., Gu, X., Lu, H., Tian, H., Jha, R.: Probiotics, prebiotics, and synbiotics regulate the intestinal microbiota differentially and restore the relative abundance of specific gut microorganisms. *Journal of Dairy Science*. 103, 5816–5829 (2020). <https://doi.org/10.3168/jds.2019-18003>
  96. Sarikhani, M., Kermanshahi, R.K., Ghadam, P., Gharavi, S.: The role of probiotic Lactobacillus acidophilus ATCC 4356 bacteriocin on effect of HBsu on planktonic cells and biofilm formation of Bacillus subtilis. *International Journal of Biological Macromolecules*. 115, 762–766 (2018). <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.03.087>
  97. Kang, C.-H., Kim, Y., Han, S.H., Kim, J.-S., Paek, N.-S., So, J.-S.: In vitro probiotic properties of vaginal Lactobacillus fermentum MG901 and Lactobacillus plantarum MG989 against Candida albicans. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. 228, 232–237 (2018). <https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2018.07.005>
  98. Zhang, Q., Qin, S., Xu, X., Zhao, J., Zhang, H., Liu, Z., Chen, W.: Inhibitory Effect of

- Lactobacillus plantarum CCFM8724 towards Streptococcus mutans- and Candida albicans-Induced Caries in Rats. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2020, 1–10 (2020). <https://doi.org/10.1155/2020/4345804>
99. Xu, Z., Li, Y., Xu, A., Xue, L., Soteyome, T., Yuan, L., Ma, Q., Seneviratne, G., Hong, W., Mao, Y., Kjellerup, B.V., Liu, J.: Differential alteration in Lactiplantibacillus plantarum subsp. plantarum quorum-sensing systems and reduced Candida albicans yeast survival and virulence gene expression in dual-species interaction. *Microbiol Spectr.* 12, e00353-24 (2024). <https://doi.org/10.1128/spectrum.00353-24>
  100. Vilela, S.F., Barbosa, J.O., Rossoni, R.D., Santos, J.D., Prata, M.C., Anbinder, A.L., Jorge, A.O., Junqueira, J.C.: Lactobacillus acidophilus ATCC 4356 inhibits biofilm formation by C. albicans and attenuates the experimental candidiasis in Galleria mellonella. *Virulence*. 6, 29–39 (2015). <https://doi.org/10.4161/21505594.2014.981486>
  101. Itapary Dos Santos, C., Ramos França, Y., Duarte Lima Campos, C., Quresma Bomfim, M.R., Oliveira Melo, B., Assunção Holanda, R., Santos, V.L., Gomes Monteiro, S., Buozzi Moffa, E., Souza Monteiro, A., Andrade Monteiro, C., Monteiro-Neto, V.: Antifungal and Antivirulence Activity of Vaginal Lactobacillus Spp. Products against Candida Vaginal Isolates. *Pathogens*. 8, 150 (2019). <https://doi.org/10.3390/pathogens8030150>
  102. Li, T., Liu, Z., Zhang, X., Chen, X., Wang, S.: Local Probiotic Lactobacillus crispatus and Lactobacillus delbrueckii Exhibit Strong Antifungal Effects Against Vulvovaginal Candidiasis in a Rat Model. *Front. Microbiol.* 10, 1033 (2019). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01033>
  103. Atanasov, N., Evstatieva, Y., Nikolova, D.: Antagonistic Interactions of Lactic Acid Bacteria from Human Oral Microbiome against Streptococcus mutans and Candida albicans. *Microorganisms*. 11, 1604 (2023). <https://doi.org/10.3390/microorganisms11061604>
  104. Yocheva, L., Tserovska, L., Danguleva-Cholakova, A., Todorova, T., Zhelezova, G., Karaivanova, E., Georgieva, R.: In Vitro Inhibitory Effects and Co-Aggregation Activity of Lactobacilli on Candida albicans. *Microbiology Research*. 15, 1576–1589 (2024). <https://doi.org/10.3390/microbiolres15030104>
  105. Bulgasem, B.Y., Lani, M.N., Hassan, Z., Yusoff, W.M.W., Fnaish, S.G.: Antifungal Activity of Lactic Acid Bacteria Strains Isolated from Natural Honey against Pathogenic Candida Species. *Mycobiology*. 44, 302–309 (2016). <https://doi.org/10.5941/MYCO.2016.44.4.302>
  106. De Gregorio, P.R., Silva, J.A., Marchesi, A., Nader-Macías, M.E.F.: Anti- Candida activity of beneficial vaginal lactobacilli in in vitro assays and in a murine experimental model. *FEMS Yeast Research*. 19, (2019). <https://doi.org/10.1093/femsyr/foz008>
  107. Spacova, I., Allonsius, C.N., De Boeck, I., Oerlemans, E., Tuyaerts, I., Van De Vliet, N., Van Den Broek, M.F.L., Jimenez, L., Boyer, M., Rodriguez, B., Ballet, N., Lebeer, S.: Multifactorial inhibition of Candida albicans by combinations of lactobacilli and probiotic Saccharomyces cerevisiae CNCM I-3856. *Sci Rep.* 14, 9365 (2024). <https://doi.org/10.1038/s41598-024-59869-9>
  108. Wang, S., Wang, Q., Yang, E., Yan, L., Li, T., Zhuang, H.: Antimicrobial Compounds Produced by Vaginal Lactobacillus crispatus Are Able to Strongly Inhibit Candida albicans Growth, Hyphal Formation and Regulate Virulence-related Gene Expressions. *Front. Microbiol.* 8, (2017). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00564>
  109. Allonsius, C.N., Van Den Broek, M.F.L., De Boeck, I., Kiekens, S., Oerlemans, E.F.M., Kiekens, F., Foubert, K., Vandenheuvel, D., Cos, P., Delputte, P., Lebeer, S.: Interplay between Lactobacillus rhamnosus GG and Candida and the involvement of exopolysaccharides. *Microbial Biotechnology*. 10, 1753–1763 (2017). <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12799>

110. Jang, S.J., Lee, K., Kwon, B., You, H.J., Ko, G.: Vaginal lactobacilli inhibit growth and hyphae formation of *Candida albicans*. *Sci Rep.* 9, 8121 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-44579-4>
111. Salari, S., Ghasemi Nejad Almani, P.: Antifungal effects of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus plantarum* against different oral *Candida* species isolated from HIV/ AIDS patients: an in vitro study. *Journal of Oral Microbiology.* 12, 1769386 (2020). <https://doi.org/10.1080/20002297.2020.1769386>
112. Garza-Cervantes, J.A., Mendiola-Garza, G., De Melo, E.M., Dugmore, T.I.J., Matharu, A.S., Morones-Ramirez, J.R.: Antimicrobial activity of a silver-microfibrillated cellulose biocomposite against susceptible and resistant bacteria. *Sci Rep.* 10, 7281 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-64127-9>
113. Faccinetto-Beltrán, P., Gómez-Fernández, A.R., Orozco-Sánchez, N.E., Pérez-Carrillo, E., Marín-Obispo, L.M., Hernández-Brenes, C., Santacruz, A., Jacobo-Velázquez, D.A.: Physicochemical Properties and Sensory Acceptability of a Next-Generation Functional Chocolate Added with Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids and Probiotics. *Foods.* 10, 333 (2021). <https://doi.org/10.3390/foods10020333>
114. Campedelli, I., Mathur, H., Salvetti, E., Clarke, S., Rea, M.C., Torriani, S., Ross, R.P., Hill, C., O'Toole, P.W.: Genus-Wide Assessment of Antibiotic Resistance in *Lactobacillus* spp. *Appl Environ Microbiol.* 85, e01738-18 (2019). <https://doi.org/10.1128/AEM.01738-18>
115. Dawoud, A.M., Saied, S.A., Torayah, M.M., Ramadan, A.E., Elaskary, S.A.: Antifungal susceptibility and virulence determinants profile of candida species isolated from patients with candidemia. *Sci Rep.* 14, 11597 (2024). <https://doi.org/10.1038/s41598-024-61813-w>
116. Kambire, O., Yao, K.M., Detto, K., Kamate, M.: Microbiological and Physicochemical Variations during Spontaneous Fermentation of Plantain Must. *International Journal of Food Science.* 2023, 1–6 (2023). <https://doi.org/10.1155/2023/8611252>
117. García-Gamboa, R., Domínguez-Simi, M., Gradilla-Hernández, M.S., Bravo, J., Moya, A., Ruiz-Álvarez, B., González-Avila, M.: Anticandidal and Antibiofilm Effect of Synbiotics including Probiotics and Inulin-Type Fructans. *Antibiotics.* 11, 1135 (2022). <https://doi.org/10.3390/antibiotics11081135>
118. BD Biosciences: *Manual of Microbiological Culture Media.* (2009)
119. Łubiech, K., Twarużek, M.: Fungal Infections of Human Mammary Gland During Lactation. In: *Encyclopedia of Mycology.* pp. 730–735. Elsevier (2021)
120. Meng, L., Li, S., Liu, G., Fan, X., Qiao, Y., Zhang, A., Lin, Y., Zhao, X., Huang, K., Feng, Z.: The nutrient requirements of *Lactobacillus acidophilus* LA-5 and their application to fermented milk. *Journal of Dairy Science.* 104, 138–150 (2021). <https://doi.org/10.3168/jds.2020-18953>
121. Berkow, E., Lockhart, S.: Fluconazole resistance in *Candida* species: a current perspective. *IDR.* Volume 10, 237–245 (2017). <https://doi.org/10.2147/IDR.S118892>
122. Mollazadeh-Narestan, Z., Yavarikia, P., Homayouni-Rad, A., Samadi Kafil, H., Mohammad-Alizadeh-Charandabi, S., Gholizadeh, P., Mirghafourvand, M.: Comparing the Effect of Probiotic and Fluconazole on Treatment and Recurrence of Vulvovaginal Candidiasis: a Triple-Blinded Randomized Controlled Trial. *Probiotics & Antimicro. Prot.* 15, 1436–1446 (2023). <https://doi.org/10.1007/s12602-022-09997-3>
123. Vahedpoor, Z., Abastabar, M., Sehat, M., Talebian, P., Felfelian Fini, T., Dastanpour, Z., Haghani, I., Chelongarian, R., Nazeri, M.: Vaginal and oral use of probiotics as adjunctive therapy to fluconazole in patients with vulvovaginal candidiasis: A clinical trial on Iranian women. *CMM.* (2021). <https://doi.org/10.18502/cmm.7.3.7803>
124. Zgadzay, Y., Kolosova, O., Stetsenko, A., Wu, C., Bruchlen, D., Usachev, K., Validov, S., Jenner, L., Rogachev, A., Yusupova, G., Sachs, M.S., Guskov, A., Yusupov, M.: E-site drug specificity of the human pathogen *Candida albicans* ribosome. *Sci. Adv.* 8, eabn1062

- (2022). <https://doi.org/10.1126/sciadv.abn1062>
125. Vázquez-Laslop, N., Mankin, A.S.: How Macrolide Antibiotics Work. *Trends in Biochemical Sciences*. 43, 668–684 (2018). <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2018.06.011>
  126. Rossoni, R.D., De Barros, P.P., De Alvarenga, J.A., Ribeiro, F.D.C., Velloso, M.D.S., Fuchs, B.B., Mylonakis, E., Jorge, A.O.C., Junqueira, J.C.: Antifungal activity of clinical *Lactobacillus* strains against *Candida albicans* biofilms: identification of potential probiotic candidates to prevent oral candidiasis. *Biofouling*. 34, 212–225 (2018). <https://doi.org/10.1080/08927014.2018.1425402>
  127. Beck, B.R., Park, G.-S., Lee, Y.H., Im, S., Jeong, D.Y., Kang, J.: Whole Genome Analysis of *Lactobacillus plantarum* Strains Isolated From Kimchi and Determination of Probiotic Properties to Treat Mucosal Infections by *Candida albicans* and *Gardnerella vaginalis*. *Front. Microbiol.* 10, 433 (2019). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00433>
  128. Robergs, R., O'Malley, B., Torrens, S., Siegler, J.: The missing hydrogen ion, part-1: Historical precedents vs. fundamental concepts. *Sports Medicine and Health Science*. 5, 336–343 (2023). <https://doi.org/10.1016/j.smhs.2023.10.008>
  129. Vazquez-Munoz, R., Dongari-Bagtzoglou, A.: Anticandidal Activities by *Lactobacillus* Species: An Update on Mechanisms of Action. *Front. Oral. Health*. 2, 689382 (2021). <https://doi.org/10.3389/froh.2021.689382>
  130. Ribeiro, F.C., De Barros, P.P., Rossoni, R.D., Junqueira, J.C., Jorge, A.O.C.: *Lactobacillus rhamnosus* inhibits *Candida albicans* virulence factors *in vitro* and modulates immune system in *Galleria mellonella*. *J Appl Microbiol.* 122, 201–211 (2017). <https://doi.org/10.1111/jam.13324>
  131. De Barros, P.P., Scorzoni, L., Ribeiro, F.D.C., Fugisaki, L.R.D.O., Fuchs, B.B., Mylonakis, E., Jorge, A.O.C., Junqueira, J.C., Rossoni, R.D.: *Lactobacillus paracasei* 28.4 reduces *in vitro* hyphae formation of *Candida albicans* and prevents the filamentation in an experimental model of *Caenorhabditis elegans*. *Microbial Pathogenesis*. 117, 80–87 (2018). <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.02.019>
  132. Miao, H., Liang, J., Lan, G., Wu, Q., Huang, Z.: Heat-Killed *Lactobacillus acidophilus* Promotes Growth by Modulating the Gut Microbiota Composition and Fecal Metabolites of Piglets. *Animals*. 14, 2528 (2024). <https://doi.org/10.3390/ani14172528>
  133. Van, V.T.H., Liu, Z.-S., Hsieh, Y.J., Shiu, W.-C., Chen, B.-Y., Ku, Y.-W., Chen, P.-W.: Therapeutic effects of orally administration of viable and inactivated probiotic strains against murine urinary tract infection. *Journal of Food and Drug Analysis*. 31, (2023). <https://doi.org/10.38212/2224-6614.3474>
  134. Ribeiro, F.D.C., Junqueira, J.C., Dos Santos, J.D., De Barros, P.P., Rossoni, R.D., Shukla, S., Fuchs, B.B., Shukla, A., Mylonakis, E.: Development of Probiotic Formulations for Oral Candidiasis Prevention: Gellan Gum as a Carrier To Deliver *Lactobacillus paracasei* 28.4. *Antimicrob Agents Chemother.* 64, e02323-19 (2020). <https://doi.org/10.1128/AAC.02323-19>
  135. Flanagan, J.N., Steck, T.R.: The Relationship Between Agar Thickness and Antimicrobial Susceptibility Testing. *Indian J Microbiol.* 57, 503–506 (2017). <https://doi.org/10.1007/s12088-017-0683-z>
  136. Lourenço, A., Pedro, N.A., Salazar, S.B., Mira, N.P.: Effect of Acetic Acid and Lactic Acid at Low pH in Growth and Azole Resistance of *Candida albicans* and *Candida glabrata*. *Front. Microbiol.* 9, 3265 (2019). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03265>
  137. MacAlpine, J., Daniel-Ivad, M., Liu, Z., Yano, J., Revie, N.M., Todd, R.T., Stogios, P.J., Sanchez, H., O'Meara, T.R., Tompkins, T.A., Savchenko, A., Selmecki, A., Veri, A.O., Andes, D.R., Fidel, P.L., Robbins, N., Nodwell, J., Whitesell, L., Cowen, L.E.: A small molecule produced by *Lactobacillus* species blocks *Candida albicans* filamentation by inhibiting a DYRK1-family kinase. *Nat Commun.* 12, 6151 (2021).

- <https://doi.org/10.1038/s41467-021-26390-w>
138. Zangl, I., Pap, I.-J., Aspöck, C., Schüller, C.: The role of *Lactobacillus* species in the control of *Candida* via biotrophic interactions. *Microb Cell*. 7, 1–14 (2020). <https://doi.org/10.15698/mic2020.01.702>
  139. Tachedjian, G., O’Hanlon, D.E., Ravel, J.: The implausible “in vivo” role of hydrogen peroxide as an antimicrobial factor produced by vaginal microbiota. *Microbiome*. 6, 29 (2018). <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0418-3>
  140. Shin, Y., Lee, S., Ku, M., Kwak, M.-K., Kang, S.-O.: Cytochrome c peroxidase regulates intracellular reactive oxygen species and methylglyoxal via enzyme activities of erythroascorbate peroxidase and glutathione-related enzymes in *Candida albicans*. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 92, 183–201 (2017). <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2017.10.004>
  141. Saha, P., Nath, D., Choudhury, M.D., Talukdar, A.D.: Probiotic Biosurfactants: A Potential Therapeutic Exercises in Biomedical Sciences. In: Patra, J.K., Das, G., and Shin, H.-S. (eds.) *Microbial Biotechnology*. pp. 499–514. Springer Singapore, Singapore (2018)
  142. Hajfarajollah, H., Eslami, P., Mokhtarani, B., Akbari Noghabi, K.: Biosurfactants from probiotic bacteria: A review. *Biotech and App Biochem*. 65, 768–783 (2018). <https://doi.org/10.1002/bab.1686>
  143. Singh, P., Patil, Y., Rale, V.: Biosurfactant production: emerging trends and promising strategies. *J Appl Microbiol*. 126, 2–13 (2019). <https://doi.org/10.1111/jam.14057>
  144. De Gregorio, P.R., Parolin, C., Abruzzo, A., Luppi, B., Protti, M., Mercolini, L., Silva, J.A., Giordani, B., Marangoni, A., Nader-Macías, M.E.F., Vitali, B.: Biosurfactant from vaginal *Lactobacillus crispatus* BC1 as a promising agent to interfere with *Candida* adhesion. *Microb Cell Fact*. 19, 133 (2020). <https://doi.org/10.1186/s12934-020-01390-5>
  145. Yap, P.G., Lai, Z.W., Tan, J.S.: Bacteriocins from lactic acid bacteria: purification strategies and applications in food and medical industries: a review. *Beni-Suef Univ J Basic Appl Sci*. 11, 51 (2022). <https://doi.org/10.1186/s43088-022-00227-x>
  146. Vasilchenko, A.S., Valyshev, A.V.: Pore-forming bacteriocins: structural–functional relationships. *Arch Microbiol*. 201, 147–154 (2019). <https://doi.org/10.1007/s00203-018-1610-3>
  147. Hefzy, E.M., Khalil, M.A.F., Amin, A.A.I., Ashour, H.M., Abdelaliem, Y.F.: Bacteriocin-Like Inhibitory Substances from Probiotics as Therapeutic Agents for *Candida Vulvovaginitis*. *Antibiotics*. 10, 306 (2021). <https://doi.org/10.3390/antibiotics10030306>
  148. Scillato, M., Spitale, A., Mongelli, G., Privitera, G.F., Mangano, K., Cianci, A., Stefani, S., Santagati, M.: Antimicrobial properties of *Lactobacillus* cell-free supernatants against multidrug-resistant urogenital pathogens. *MicrobiologyOpen*. 10, e1173 (2021). <https://doi.org/10.1002/mbo3.1173>
  149. Stevenson, K., McVey, A.F., Clark, I.B.N., Swain, P.S., Pilizota, T.: General calibration of microbial growth in microplate readers. *Sci Rep*. 6, 38828 (2016). <https://doi.org/10.1038/srep38828>
  150. Behera, B., Anil Vishnu, G.K., Chatterjee, S., Sitaramgupta V, V.S.N., Sreekumar, N., Nagabhushan, A., Rajendran, N., Prathik, B.H., Pandya, H.J.: Emerging technologies for antibiotic susceptibility testing. *Biosensors and Bioelectronics*. 142, 111552 (2019). <https://doi.org/10.1016/j.bios.2019.111552>
  151. Mira, P., Yeh, P., Hall, B.G.: Estimating microbial population data from optical density. *PLoS ONE*. 17, e0276040 (2022). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0276040>
  152. Mehta, J.P., Ayakar, S., Singhal, R.S.: The potential of paraprobiotics and postbiotics to modulate the immune system: A Review. *Microbiological Research*. 275, 127449 (2023). <https://doi.org/10.1016/j.micres.2023.127449>
  153. Siciliano, R.A., Reale, A., Mazzeo, M.F., Morandi, S., Silveti, T., Brasca, M.:

- Paraprobiotics: A New Perspective for Functional Foods and Nutraceuticals. *Nutrients*. 13, 1225 (2021). <https://doi.org/10.3390/nu13041225>
154. Shori, A.B., Baba, A.S., Muniandy, P.: Potential Health-Promoting Effects of Probiotics in Dairy Beverages. In: *Value-Added Ingredients and Enrichments of Beverages*. pp. 173–204. Elsevier (2019)
  155. Cottier, F., Hall, R.A.: Face/Off: The Interchangeable Side of *Candida Albicans*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 9, 471 (2020). <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00471>
  156. Mailänder-Sánchez, D., Braunsdorf, C., Grumaz, C., Müller, C., Lorenz, S., Stevens, P., Wagener, J., Hebecker, B., Hube, B., Bracher, F., Sohn, K., Schaller, M.: Antifungal defense of probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG is mediated by blocking adhesion and nutrient depletion. *PLoS ONE*. 12, e0184438 (2017). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184438>
  157. Vazquez-Munoz, R., Thompson, A., Russell, J.T., Sobue, T., Zhou, Y., Dongari-Bagtzoglou, A.: Insights From the *Lactobacillus johnsonii* Genome Suggest the Production of Metabolites With Antibiofilm Activity Against the Pathobiont *Candida albicans*. *Front. Microbiol.* 13, 853762 (2022). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.853762>
  158. Meng, J., Zhang, Q.-X., Lu, R.-R.: Identification and analysis of the function of surface layer proteins from three *Lactobacillus* strains. *Ann Microbiol.* 68, 207–216 (2018). <https://doi.org/10.1007/s13213-018-1335-1>
  159. Palomino, M.M., Allievi, M.C., Gordillo, T.B., Bockor, S.S., Fina Martin, J., Ruzal, S.M.: Surface layer proteins in species of the family Lactobacillaceae. *Microbial Biotechnology*. 16, 1232–1249 (2023). <https://doi.org/10.1111/1751-7915.14230>
  160. Sagmeister, T., Gubensäk, N., Buhlheller, C., Grininger, C., Eder, M., Đorđić, A., Millán, C., Medina, A., Murcia, P.A.S., Berni, F., Hynönen, U., Vejzović, D., Damisch, E., Kulminskaya, N., Petrowitsch, L., Oberer, M., Palva, A., Malanović, N., Codée, J., Keller, W., Usón, I., Pavkov-Keller, T.: The molecular architecture of *Lactobacillus* S-layer: Assembly and attachment to teichoic acids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 121, e2401686121 (2024). <https://doi.org/10.1073/pnas.2401686121>
  161. Fina Martin, J., Palomino, M.M., Cutine, A.M., Modenutti, C.P., Fernández Do Porto, D.A., Allievi, M.C., Zanini, S.H., Mariño, K.V., Barquero, A.A., Ruzal, S.M.: Exploring lectin-like activity of the S-layer protein of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356. *Appl Microbiol Biotechnol.* 103, 4839–4857 (2019). <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09795-y>
  162. Alp, D.: Strain-dependent effectivity, and protective role against enzymes of S-layers in *Lactiplantibacillus plantarum* strains. *J Basic Microbiol.* 62, 555–567 (2022). <https://doi.org/10.1002/jobm.202100590>
  163. Angelescu, I.-R., Zamfir, M., Ionetic, E.-C., Grosu-Tudor, S.-S.: The Biological Role of the S-Layer Produced by *Lactobacillus helveticus* 34.9 in Cell Protection and Its Probiotic Properties. *Fermentation*. 10, 150 (2024). <https://doi.org/10.3390/fermentation10030150>
  164. Klotz, C., Goh, Y.J., O’Flaherty, S., Barrangou, R.: S-layer associated proteins contribute to the adhesive and immunomodulatory properties of *Lactobacillus acidophilus* NCFM. *BMC Microbiol.* 20, 248 (2020). <https://doi.org/10.1186/s12866-020-01908-2>
  165. Do Carmo, F.L.R., Rabah, H., De Oliveira Carvalho, R.D., Gaucher, F., Cordeiro, B.F., Da Silva, S.H., Le Loir, Y., Azevedo, V., Jan, G.: Extractable Bacterial Surface Proteins in Probiotic–Host Interaction. *Front. Microbiol.* 9, 645 (2018). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00645>
  166. Gordillo, T.B., Palumbo, M.C., Allievi, M.C., Fernández Do Porto, D.A., Ruzal, S.M., Palomino, M.M.: Strategies to display heterologous proteins on the cell surface of lactic acid bacteria using as anchor the C-terminal domain of *Lactobacillus acidophilus* SlpA. *World J Microbiol Biotechnol.* 36, 169 (2020). <https://doi.org/10.1007/s11274-020-02945->

167. Martorano-Fernandes, L., Goodwine, J., Ricomini-Filho, A., Nobile, C., Del Bel Cury, A.: *Candida albicans* Adhesins Als1 and Hwp1 Modulate Interactions with *Streptococcus mutans*. *Microorganisms*. 11, 1391 (2023). <https://doi.org/10.3390/microorganisms11061391>
168. Du, Q., Ren, B., Zhou, X., Zhang, L., Xu, X.: Cross-kingdom interaction between *Candida albicans* and oral bacteria. *Front. Microbiol.* 13, 911623 (2022). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.911623>

## RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO

**Ing. María Andrea Vega Vásquez** Candidato para el grado de  
**Maestro en Ciencias** con orientación en **Microbiología Aplicada**

**Tesis:** Estudio de competencia microbiana entre *Lactiplantibacillus plantarum* 299 V (DSM 9843), *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ATCC 11842, *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 y *Candida albicans*

**Edad:** 31 años

**Campo de estudio:** Procesos Microbiológicos

### **Biografía:**

Datos Personales: Nacida en Quito, Pichincha, Ecuador, el 24 de septiembre de 1993, hija de Luis Alberto Vega Delgado y Ángela María Vega Vásquez.

Educación: Egresado de la Escuela Agrícola Panamericana, en Agroindustria Alimentaria en el 2015.