

Aislamiento e identificación de levadura autóctona del cultivo de Mora del sistema acuapónico del Centro de Biotecnología Agropecuaria del SENA, municipio de Mosquera.

Isolation and identification of autochthonous yeast from the Gulupa and Mora culture of the aquaponic system of the Center for Agricultural Biotechnology of SENA, Mosquera municipality.

Resumen:

En este proyecto se realizó el aislamiento e identificación de levaduras asociadas a los cultivos limpios y acuapónicos en el Centro de Biotecnología Agropecuaria de Mosquera del Servicio Nacional de Aprendizaje SENA. Se destaca la importancia que tiene el proceso de aislamiento e identificación a nivel de género y especie por medio de técnicas genómicas que permite enriquecer, de manera más precisa, los datos sobre los procesos ecológicos que se desarrollan alrededor de los cultivos que no utilizan plagui-

cidas. También se señalan diversas técnicas y medios de cultivos, descritos en la literatura, para llevar a cabo los ensayos de identificación, los cuales podrían ser aplicables a muchos laboratorios de rutina y de especialización.

Palabras clave

Levaduras, identificación, secuenciación, SENA.

Mario Andrés Colorado

Biólogo Marino. MBA. Instructor SENNOVA. Líder grupo de investigación CIBA CBA E-mail: mcolorado@sena.edu.co. Autor corresponsal: Mario A. Colorado Gómez.

Sandra Liliana Lerma Bocanegra

Bióloga. Esp. Biotecnología Vegetal. Instructora Centro de Biotecnología Agropecuaria SENA. E-mail: slerma@sena.edu.co.

Sandra Ximena Toro Meléndez

Administradora de empresas agropecuarias. Msc Sistemas Integrados de Gestión. Dinamizadora SENNOVA Centro de Biotecnología Agropecuaria SENA E-mail: storom@sena.edu.co.

Abstract

In this project, the isolation and identification of yeasts associated with clean and aquaponic cultures was carried out at the Mosquera Agricultural Biotechnology Center of the SENA National Learning Service. The importance of the isolation and identification process at the genus and species level through genomic techniques is highlighted, which allows to enrich, in a more precise way, the data on the ecological processes that take place around crops that do not use pesticides. Various techniques and culture media

are also indicated, described in the literature, to carry out identification tests, which could be applicable to many routine and specialized laboratories.

Keywords

Yeasts, identification, sequencing, SENA.

Introducción

La fermentación alcohólica espontánea es un proceso complejo que se caracteriza por la presencia de un gran número de géneros y especies de levaduras (Heard y Fleet, 1988). La presencia y el número de especies puede variar de acuerdo con las condiciones climáticas, variedad de materia prima, prácticas de proceso, etc. (Querol et al., 1990). Existen diferentes metodologías para la identificación de microorganismos basadas en la PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa), que son útiles para diferenciar las especies, el gen 18S permite discriminar entre especies de levaduras (Capace et al., 2003).

El objetivo del presente estudio fue aislar e identificar, por secuenciación del gen 18S, las levaduras predominantes presentes en los cultivos acuapónicos de mora en el Centro de Biotecnología Agropecuaria del Servicio Nacional de Aprendizaje SENA Regional Cundinamarca.

Metodología

Los muestreos de frutos de mora fueron realizados en los invernaderos del Centro de Biotecnología Agropecuaria SENA ubicado en el km 7 vía Bogotá-Mosquera. Para la recolección del material de estudio se empleó el método de muestreo al azar con un tamaño de muestra de 20 frutos por árbol. Los muestreos se realizaron durante el segundo semestre del año del 2022. Las muestras (frutos en estado apropiado de maduración) fueron empacadas y trans-

portadas bajo condiciones asépticas en bolsas plásticas tipo ziploc para ser procesadas inmediatamente en el laboratorio.

El procesamiento de muestras se realizó según el protocolo adaptado del Manual de Técnicas Básicas de Microbiología de Alimentos de la Universidad Nacional Autónoma de México (2013). Este consistió en homogeneizar en licuadora los frutos en 90 ml de agua peptonada estéril y, a partir de ella, transferir 1 ml a un tubo que contenía 9 ml del mismo diluyente. De cada una de las diluciones se sembraron por duplicado, en agar, papa dextrosa (PDA) con gentamicina y se incubaron a temperatura ambiente de 3 a 5 días.

La identificación morfológica de las colonias de levaduras se realizó mediante tinción de Gram.

A partir de la identificación de la colonia de levaduras se realizó el aislamiento de la colonia para su purificación en medio PDA. Se tomaron muestras para enviar a laboratorio para su secuenciación.

Se llevó a cabo la extracción de ADN y se amplificó el gen 18S empleando los oligonucleótidos NP3 (CCG TTG GTG AAC CAG CGG AGG GAT C) y NP10 (TCC GCT TAT TGA TAT GCT TAA G). Al producto de amplificación se le realizó una gestión con endonucleasas. Posteriormente se llevó a cabo la secuenciación del gen 18S. Las secuencias fueron comparadas con los bancos de genes especializados.

Resultados

Las colectas de frutos fueron realizadas por los aprendices del programa "Tecnólogo en Agrobiotecnología" (Figura 1, 2, 3 y 4). La dilución en agua peptonada permitió la suspensión de los microorganismos asocia-

asociado a las frutas, las cuales fueron inoculadas en cajas de Petri con medio PDA (Figura 5).



Figura 1. Muestra de fruta de mora recolectas en campo y listas para ser procesadas en laboratorio.
Fuente: Autores de la investigación



Figura 2. Proceso de licuado de las muestras.
Fuente: Autores de la investigación

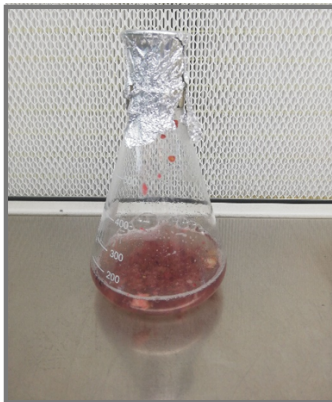


Figura 3. Suspensión de la muestra en agua pectonada para realizar las diluciones.
Fuente: Autores de la investigación

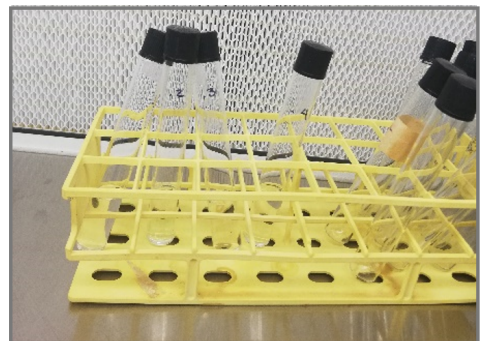


Figura 4. Diluciones de las muestras de mora.
Fuente: Autores de la investigación



Figura 5. Cajas Inoculadas con las diluciones en medio con PDA.

Fuente: Autores de la investigación

Posterior al período de incubación se observó el crecimiento de los microorganismos (Figura 6), se determinaron los morfotipos característicos de las levaduras y se

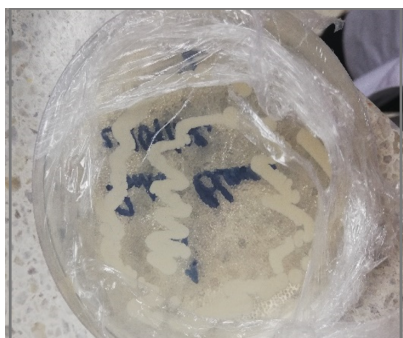


Figura 6. Cultivo de levaduras en PDA obtenidas a partir de los frutos de mora.

Fuente: Autores de la investigación

efectuaron siembras de esos morfotipos en cajas de Petri con medio PDA, logrando así cultivos puros (Figura 7), de los cuales se tomó el material para su posterior extracción del ADN y secuenciación del genoma (Figura 8).

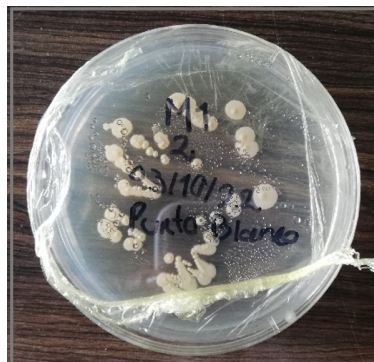


Figura 7. Cultivo de levaduras en PDA obtenidas a partir de los frutos de mora.

Fuente: Autores de la investigación



Figura 8. Muestra de la colonia aislada para enviar a secuenciación.

Fuente: Autores de la investigación

Conclusiones

El proyecto pretende generar, a lo largo de dos años, estilos propios del SENA con las levaduras obtenidas mediante un trabajo conjunto entre la

ciencia y el sector.

La levadura representa un recurso biológico de Mosquera y su transferencia al sector productivo es el resultado del aprovechamiento de la diversidad microbiana. Con la información obtenida en la secuenciación se establece la identificación a nivel de género y especie con un porcentaje de identidad superior al 95%.

Referencias y bibliografía

Capace A., Salzano G., Romano P. (2003). Molecular typing techniques as a tool to differentiate non-Saccharomyces wine species. *J Food Microbiol* 84, 33–39.

Heard G.M., Fleet G.H. (1988). The effects

of temperatura and pH on the growth of yeast species during the fermentation of grape juice. *J Applied Bacteriol* 65, 23–28. *Bacteriol* 65, 23–28.

Lappe-Oliveras P., Moreno -Terrazas R., Arrizón-Gaviñón J., Herrera-Suárez T., García-Mendoza A. and Gschae-dler Mathis A. (2008). Yeasts associated with the production of Mexican alcoholic nondistilled and distilled Agave beverages. *FEMS Yeast Res* 8. 1037-1052.

Querol A., Jiménez M., Huerta T. (1990). A study on microbiological and oenological parameters during fermentation of must from poor and normal grapes harvest in the region of Alicante (Spain). *J Food Science* 55, 1603–1606.

Prado, A., Gabriela, B., Serrano, R., Figueroa González, I., & Matsumoto, K. S. (2013). *Microbiología de los Alimentos*. UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA UNIDAD IZTAPALAPA Av. San Rafael Atlixco No. 186, Col. Vicentina, Del. Iztapalapa, C.P 09340, México D.F. Tel.: 5804 4600
Impreso y hecho en México/Printed in Mexico