

**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA
SEDE QUITO**

**CARRERA:
INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES**

**Trabajo de titulación previo a la obtención del título de
INGENIERAS EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES**

**TEMA:
IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE CEPAS DE LEVADURAS CON
CAPACIDAD FERMENTATIVA Y RESISTENCIA ALCOHÓLICA
AISLADAS DE PITAHAYA (*Stenocereus queretaroensis* f.a.c Weber)**

**AUTORAS:
MARÍA FERNANDA PAREDES MORALES
IRENE ELIZABETH YUGSI VARGAS**

**TUTORA:
GERMANIA MARGARITA KAROLYS GUTIÉRREZ**

Quito, marzo del 2016

Cesión de derechos de autor

Nosotras, María Fernanda Paredes Morales, con documento de identificación N° 1715283535, e Irene Elizabeth Yugsi Vargas, con documento de identificación N° 1721756169, manifestamos nuestra voluntad y cedemos a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud somos autoras del trabajo de titulación intitulado: “Identificación molecular de cepas de levaduras con capacidad fermentativa y resistencia alcohólica aisladas de pitahaya (*Stenocereus queretaroensis* f.a.c Weber)”, mismo que ha sido desarrollado para optar por el título de: Ingenieras en Biotecnología de los Recursos Naturales, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En aplicación a lo determinado en la Ley de Propiedad Intelectual, en nuestra condición de autoras nos reservamos los derechos morales de la obra antes citada. En concordancia, suscribimos este documento en el momento que hacemos entrega del trabajo final en formato impreso y digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.



Nombre: María Fernanda Paredes Morales

Cédula: 171528353-5

Fecha: Marzo 2016



Nombre: Irene Elizabeth Yugsi Vargas

Cédula: 172175616-9

Fecha: Marzo 2016

Declaratoria de coautoría de la docente tutora

Yo declaro que bajo mi dirección y asesoría fue desarrollado el trabajo de titulación:
“Identificación molecular de cepas de levaduras con capacidad fermentativa y resistencia alcohólica aisladas de pitahaya (*Stenocereus queretaroensis* f.a.c Weber)”, realizado por María Fernanda Paredes Morales e Irene Elizabeth Yugsi Vargas, obteniendo un producto que cumple con todos los requisitos estipulados por la Universidad Politécnica Salesiana para ser considerados como trabajo final de titulación.

Quito, marzo 2016


Germania Margarita Karolys Gutiérrez

CI.170849249-9

Dedicatoria

A Dios por darnos la oportunidad de ser pacientes y perseverantes.

A nuestros padres Marco, Marisol y Elvita por el apoyo incondicional y el sacrificio que hicieron para darnos esta oportunidad de desarrollarnos como profesionales.

A nuestros hermanos Freddy, Verónica, Anita y Doris por su comprensión y apoyo a lo largo de toda nuestra vida.

A nuestros sobrinos Erick, Said, Naomi y Emilia que son nuestra inspiración.

A nuestros Amigos por su apoyo y compañía a lo largo de este proceso.

Con cariño

Mafer & Ely

Agradecimientos

Agradecemos a la Universidad Politécnica Salesiana por su calidad de docentes, a quienes debemos los conocimientos adquiridos, a las instalaciones del laboratorio CIVABI por su apertura para el desarrollo de este trabajo de investigación a todos sus colaboradores y en especial al Ing. Marco Ibarra por su predisposición y colaboración oportuna.

A nuestra estimada Tutora Germania Karolys, por su entereza, apoyo y guía prestada en cada una de las fases de este proyecto y sobre todo su calidad de gente para una motivación continua, a Ma. Fernanda Guevara y Alfonso Molina por el respaldo y colaboración en el desarrollo de los procesos bioinformáticos.

A Pablo Coba, Laura Huachi, Marco Cerna, por su ayuda incondicional y valiosa colaboración en las distintas fases de este proyecto de investigación.

Índice

Introducción	1
1. Marco conceptual.....	4
1.1. Importancia de los microorganismos en la industria	4
1.1.1. Consorcios microbianos.....	5
1.2. Aplicaciones biotecnológicas de levaduras	6
1.3. Fermentación	6
1.3.1. Resistencia alcohólica y capacidad fermentativa.....	7
1.4. Levaduras.....	8
1.4.1. Características de la reproducción vegetativa.....	9
1.5. Identificación de levaduras	9
1.5.1. Métodos morfológicos de identificación.....	10
1.5.2. Métodos bioquímicos de identificación.....	11
1.5.3. Métodos moleculares de identificación.....	12
1.5.3.1. Genes ribosomales.....	12
1.5.3.1.1. Espaciadores internos transcritos (ITS).....	13
1.6. Secuenciación	15
1.6.1. Secuencias Sanger.....	15
1.6.2. NGS (Secuenciación de la Nueva Generación).....	16
1.6.3. Tecnología de secuenciación.....	17
1.6.4. Análisis bioinformático de la secuencia.....	18
2. Metodología.....	22

2.1. Selección de muestras	22
2.2. Revitalización.....	23
2.3. Ensayos microscópicos	23
2.4. Re aislamiento de cepas.....	24
2.5. Extracción de ADN.....	24
2.6. Amplificación región ITS.	26
2.7. Secuenciación	27
2.7.1. Secuenciación de cepas puras.	27
2.7.2. Secuenciación de consorcios.....	28
2.8. Análisis de las secuencias	29
2.9. Conservación.....	30
3. Resultados y discusión.....	31
3.1. Ensayos macro - microscópicos.....	31
3.2. Extracción de ADN y cuantificación.....	33
3.3. Amplificación de la región ITS	34
3.4. Secuenciación Sanger.	36
3.5. NGS (Secuenciación de Nueva Generación) metagenoma	38
3.6. Análisis de secuencias	41
Conclusiones	44
Recomendaciones.....	45
Referencias.....	46

Índice de tablas

Tabla 1. Cepas aisladas del fruto de pitahaya, previo del trabajo de investigación Bqf. Pablo Coba.	22
Tabla 2. Componentes de la mezcla para amplificación en PCR de región ITS.	27
Tabla 3. Descripción macro y microscópica de la cepas aisladas del fruto de pitahaya (Stenocereus queretaroensis f.a.c Weber).	32
Tabla 4. Resultados de la cuantificación por medio del equipo NanoDrop.....	34
Tabla 5. Resultados generados por MacroGen (Corea), secuenciación estándar simple.	36
Tabla 6. Datos generados proceso NGS, MacroGen - Corea.....	40
Tabla 7. Datos generados en BLAST, muestra N010/3/D.....	41
Tabla 8. Datos generados en BLAST, muestra N019/3/D.....	42

Índice de figuras

Figura 1. Diagrama de ubicación región ITS y primers empleados en la amplificación.	13
Figura 2. Resultados electroforesis de la extracción de ADN de las cepas seleccionadas.....	33
Figura 3. Electroforesis en gel de agarosa, amplificación de la región ITS en la reacción de PCR con temperatura de annealing 55°C.....	35
Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa, amplificación de la región ITS en la reacción de PCR con temperatura de annealing 60°C.....	35
Figura 5. Descripción secuencia de <i>Pichia kudriavzevii</i> . Descripción secuencia <i>Fungal sp.</i>	37
Figura 6. Comparación morfológica de cepas de levaduras de la investigación de Coba P. con referencia bibliográfica.	38
Figura 7. Número de lecturas por muestra analizada. Tomado del reporte FLX Raw Data generado por MacroGen, 2015.	39
Figura 8. Tamaño de las lecturas de las muestras N010 y N019. Tomado del reporte FLX Raw Data generado por MacroGen, 2015.	39
Figura 9. Cuantificación Librerías N010 y N019, NGS. Tomado del reporte FLX Raw Data generado por MacroGen, 2015.	40
Figura 10. Resultado de análisis de BLAST en función de la secuencia consenso A y resultado de análisis de BLAST en función de la secuencia consenso B de la muestra N010.....	41
Figura 11. Resultado de análisis de BLAST en función de la secuencia consenso A y resultado de análisis de BLAST en función de la secuencia consenso B de la muestra N019.....	42

Índice de anexos

Anexo 1. Composición para 10 ml de la solución amortiguadora de extracción.....	57
Anexo 2. Reporte FLX Raw Data NGS metagenómica.....	58
Anexo 3. Ejemplo de agrupación de secuencias de trabajo para muestra N010 y N019 y posterior análisis.....	61
Anexo 4. Alineamiento de bandas consenso de nucleótidos por grupo de la muestra N010.....	62
Anexo 5. Comparación bandas consenso y secuencias BLAST de los consorcios N010/3/D.....	63
Anexo 6. Comparación bandas consenso y secuencias BLAST de los consorcios N019/3/D.....	64

Resumen

El presente trabajo se basó en el uso de seis levaduras aisladas del fruto de pitahaya (*Stenocereus queretaroensis* f.a.c Weber) del Proyecto de Coba P. (2013-2014) CIVABI - UPS, mismas que presentaron resistencia alcohólica entre 10 - 12 % y capacidad fermentativa media – alta, para su identificación molecular; ya que los ensayos bioquímicos previos RapID Yeast Plus System no presentaron especificidad en su identificación debido a los diferentes estados anamorfos verificados posterior a los ensayos microscópicos. Para la identificación molecular de las levaduras se amplificó la región ITS por medio de PCR empleando los primers ITS 1 e ITS 4; las cepas puras fueron secuenciadas por Sanger, los consorcios a través de técnicas de secuenciación de nueva generación. En el análisis de las secuencias se pudo identificar en cepas puras la especie *Pichia kudriavzevii* con análisis BLAST QC de 100% e Ident 100% y *Fungal sp.* con QC de 100% e Ident 100%. Para la interpretación de la secuencias de los consorcios se empleó el software Geneious R8 (Biomatter Ltd) que permite obtener secuencias consenso para posterior análisis en BLAST. Los consorcios N010/3/D y N019/3/D estuvieron conformados por el orden *Saccharomycetales* con QC 99% e Ident 92%; individuos del género *Pichia sp.* con QC 99% e Ident 91%, y la especie *Pichia kluyveii* con QC 100% e Ident 97%. A pesar de los resultados obtenidos no se puede asegurar el número total de especies que conforman cada consorcio.

Palabras clave: Levaduras, ITS (Espaciador Interno Transcrito), NGS (Secuenciación de Nueva Generación).

Abstract

This work was based on the use of six isolated yeasts from the pitahaya's fruit (*Stenocereus queretaroensis* f.a.c Weber) of Coba P. (2013-2014) project CIVABI - UPS, they presented alcohol resistance between 10-12% and medium - high fermentative capacity, for molecular identification; since previous biochemical tests RapID Yeast Plus System had not specificity over their identification due the different anamorphs states verified later on their subsequent microscopic assays. For the yeast's molecular identification, the region ITS was amplified by PCR using primers ITS 1 and ITS 4; the pure strains were sequenced by Sanger, the consortia pass over new generation sequencing techniques. In the sequences analysis was identified of pure strains the *Pichia kudriavzevii* specie with BLAST analysis QC 100% and 100% Ident and *Fungal sp.* with 100% QC and 100% Ident. For the interpretation of the consortia sequences was employed software Geneious R8 (Biomatter Ltd) that allows to obtain consensus sequences for further BLAST analysis. N010/3/D and N019/3/D consortia were formed by *Saccharomycetales* order with QC 99% and Ident 92%; individuals the *Pichia sp.* genus with QC 99% and Ident 91%, and *Pichia kluyveii* specie with QC 100% and Ident 97%. Despite the results obtained, the total number of species that conform each consortium cannot be assured.

Keywords: Yeasts, ITS (Internal Transcript Sequence), NGS (Next Generation Sequencing).

Introducción

Ecuador cuenta con diversos recursos endémicos, que se han empleado en el último siglo con la finalidad de mejorar la calidad de vida y la optimización de procesos industriales. Ciertas especies vegetales son utilizadas en diversas industrias y en especial las frutas son consideradas como medios propicios para el desarrollo de microorganismos, al estar formadas de diversos elementos que influyen en sus procesos metabólicos; la pitahaya es una cactácea cuyo fruto presenta un alto contenido de azúcares, ácidos orgánicos fuente indispensable para el desarrollo de microorganismos como las levaduras.

Existen microorganismos de interés industrial, en procesos de fermentación por ejemplo la especie *Saccharomyces cerevisiae* es la más requerida por las características que aporta a las bebidas fermentadas, sin embargo existen otras levaduras no pertenecientes al género *Saccharomyces*, que pueden mejorar las características organolépticas en las primeras etapas de fermentación y permiten optimizar estos procesos.

Actualmente la caracterización de los microorganismos es empleada en los campos de la biotecnología, farmacología, medio ambiente, industria alimenticia y salud pública. Son consideradas un punto crítico, ya que la identificación de estos permite establecer un proceso de uso, manejo y control, dentro de los procesos empleados con este fin se encuentran las técnicas clásicas de identificación macro – microscópicas y bioquímicas siendo estos en muchos casos inespecíficos para ciertos microorganismos; dejando así en algunos casos resultados poco confiables.

Las tecnologías actuales han permitido el desarrollo de técnicas moleculares, que resultan una óptima herramienta para la identificación de los microorganismos; el estudio del material genético permite un análisis comparativo entre diferentes cepas; con el fin de establecer diferencias o similitudes dentro de un género y logrando a profundidad la identificación de una especie microbiana, sin embargo existen un sin número de microorganismos que constituyen la denominada “materia oscura microbiana” este concepto hace referencia a todos aquellos microorganismos que pese a ser desconocidos intervienen en los diferentes procesos relacionados a la vida (Molina, 2016).

Este estudio busca identificar molecularmente 6 de las 23 cepas de levaduras que fueron aisladas a partir de pitahaya en el proyecto de investigación previo, realizado por el Bqf. Pablo Coba Santamaría (2013 – 2014) titulado “Aislamiento y caracterización de taxa de levaduras presentes en el fruto de mortiño *Vaccinium floribundum* y pitahaya *Hylocereus sp*, *Selenicereus sp* capaces de fermentar en condiciones similares al mosto de uva” CIVABI – UPS. Estas fueron seleccionadas, considerando que en el estudio antes mencionado presentaron alta resistencia alcohólica, capacidad fermentativa y características organolépticas destacadas; Coba P. aplicó ensayos bioquímicos a través del micro-método RapID Yeast Plus System para determinar su identificación. Este micro-método fue desarrollado principalmente para la identificación de levaduras de importancia médica o que formen parte de muestras químicas humanas es por ello que solo tienen la capacidad de identificar aproximadamente 40 levaduras de esta índole, dejando de lado todas las levaduras que se presentan en otros entornos (Thermo SCIENTIFIC, 2015). Los resultados generados por este micro-método lograron identificar las especies *Cryptic albidus* y *Candida krusei* con un 86 % de probabilidad, poniendo en duda la exactitud de los

resultados; por lo tanto el objetivo del presente estudio es identificar molecularmente las cepas de levadura a través de la amplificación y secuenciación de las regiones ITS 1 y 2 (espaciador interno transcrito); estas regiones muestran una alta variabilidad por la gran cantidad de cambios nucleotídicos o polimorfismos, que presentan esto permite una identificación más precisa, debido a que se puede realizar una comparación inter e intraespecífica, análisis de las relaciones evolutivas y permiten establecer relaciones filogenéticas entre las especies de estudio (Becerra, M., Rojo, & France, 2006, págs. 115-116).

1. Marco conceptual

1.1. Importancia de los microorganismos en la industria

El equilibrio natural no podría llevarse a cabo sin la presencia de bacterias, hongos, virus, algas que por sus diferentes formas, tamaños y requerimientos metabólicos contribuyen en los diferentes procesos naturales, algunos se consideran patógenos y otros son aprovechados en diferentes campos.

Hongos, bacterias y virus son muy estudiados tras confirmar su participación en muchos procesos que son de gran utilidad para el hombre. Las bacterias y los hongos son microorganismos destacados por su actividad quimiorganotrófica, como la habilidad de degradar materia orgánica compleja, compuestos orgánicos simples y moléculas inorgánicas. Según la ruta metabólica que presentan, se generan diferentes aislados microbianos, el éxito en los diferentes procesos en los que se los utiliza depende de la selección de la fuente donde realiza procesos metabólicos, por ejemplo de fermentaciones naturales, animales y plantas enfermas, también de suelo o colecciones ya establecidas (Mateos, 2014, págs. 1-3).

Cabe recalcar que el estudio de los microorganismos ha permitido mejorar los diferentes campos de la industria farmacéutica, alimenticia, industrial, agrícola, ambiental y otros; conocer y entender el metabolismo de éstos, genera interés por parte de quienes requerimos de ellos para su intervención en los diferentes procesos que emplea la industria ya sea con la finalidad de frenar su patogenicidad o realzar su papel como agentes de interés (Tomasini., 2010, págs. 1-6).

La micología es la ciencia que estudia los hongos, este tipo de organismos eucarióticos pueden adaptarse a vivir tanto en bosques como en ciudades, se reproducen por esporas que son transportadas por medio de agua o del viento a diversos lugares (INBio, 2014).

Los hongos se encuentran colonizando numerosos entornos esto debido a su distribución geográfica irregular pero se encuentran de forma más abundante en los trópicos, dadas las condiciones climáticas favorables de temperatura y humedad que presentan estas regiones. Según Guzmán (1995, págs. 53,56) se calcula que existen más de 1 500 000 especies de hongos en el mundo de los cuales solo se conoce el 4.5% , es decir se han descrito alrededor de 80 000 especies y ~172 000 secuencias de hongos estan depositadas en el GeneBank.

Algunos hongos como los basidiomicetes forman cuerpos fructíferos y son estudiados por su capacidad enzimática como la acción generada por las peroxidasas y lacasas que degradan la lignina, otros como los ascomicetes tienen una importancia ecológica por su adaptabilidad además que su presencia es primordial en procesos industriales y médicos; en particular las levaduras intervienen en procesos de fermentación, en la producción de ácidos orgánicos y ciertos fármacos.

1.1.1. Consorcios microbianos.

Teniendo en cuenta que no todos los procesos se llevan a cabo por una sola especie de microorganismos, es relevante el estudio de complejos microbianos o también llamados consorcios cuya finalidad es transformar en diferentes pasos los compuestos orgánicos de un determinado sustrato. Un consorcio microbiano se define como una asociación natural de dos o más poblaciones microbianas, de diferentes especies, que actúan conjuntamente como una comunidad en un sistema complejo (Ochoa & Montoya, 2010, págs. 6-7). La formación de consorcios microbianos está en función a la ecología tras la asociación de los microorganismos para maximizar un sustrato y a la vez puedan resistir los cambios físico químicos que se puedan dar durante las reacciones, de esta manera se genera un equilibrio de las partes por las diferentes

retroalimentaciones que no pueden darse por reacciones sintéticas o de forma individual (Hoffner & Barton, 2014, pág. 66).

1.2. Aplicaciones biotecnológicas de levaduras

Las bebidas fermentadas son consideradas antiguas en la historia, se producen de forma natural (Berruecos, 2007, pág. 8), la fermentación se define como los cambios bioquímicos que tienen lugar en sustancias orgánicas a consecuencia de la actividad de enzimas microbianas; en particular las levaduras son seres unicelulares que ejercen un papel importante en los procesos fermentativos; constituyen uno de los grupos más importantes de organismos biotecnológicos presentando una variedad de microorganismos especializados en áreas como la panificación, vinificación, nutrición, usos farmacéuticos (Lezcano, 2012, págs. 1-5), producción de combustibles, etanol, obtención de proteína, producción de enzimas (Johnson & Echavarri, 2011, págs. 21-25). Por estas razones también se las conoce como sistemas eucarióticos unicelulares complejos debido a que se pueden cultivar en diferentes medios y además son considerados organismos adecuados para estudios de fenómenos genéticos (Madigan, Martinko, & Parker, 1999, págs. 349-351).

1.3. Fermentación

Los microorganismos como bacterias y levaduras tienen tres tipos de metabolismo en relación a la ausencia o presencia de oxígeno molecular, la respiración aeróbica que consiste en oxidar la glucosa y formar dióxido de carbono, agua y energía. Por otro lado en la respiración anaeróbica se presentan enzimas transportadoras de electrones hasta que los hidrogeniones se transfieren a una sustancia receptora que pueden ser

nitratos, sulfatos y dióxido de carbono para formar productos inorgánicos como el NH_3 , N_2 , S_2 ; finalmente la fermentación parte del piruvato y se da en condiciones de anaerobiosis para formar productos como etanol, ácido láctico, ácido málico, metanol (Puerta, 2010, págs. 1-12). Las bebidas alcohólicas se producen de materia prima vegetal con altos contenidos de hidratos de carbono y cuyo proceso consiste en descarboxilar el piruvato que proviene la glucosa y obtener etanal por acción de la enzima piruvato descarboxilasa y posteriormente el etanal que es reducido a etanol por acción de la enzima alcohol deshidrogenasa, los responsables de que se lleve a cabo este proceso son hongos unicelulares eucarióticos llamados levaduras (Koolman.J. & Rohm.K., 2003, pág. 148).

1.3.1. Resistencia alcohólica y capacidad fermentativa.

La resistencia alcohólica hace referencia a la tolerancia que presenta una levadura y específicamente su membrana celular, para desarrollarse en altas concentraciones de etanol, este tiende a difundirse rápidamente en la membrana alterando los parámetros citoplasmáticos normales como pH y transporte de solutos (Panaretou & Piper, 1990, pág. 1769). Sin embargo ciertas especies de la familia *Saccharomycetaceae* han desarrollado niveles elevados de osmotolerancia, soportando concentraciones de etanol que van desde el 5% hasta el 21 % dependiendo de la cepa y las condiciones ambientales (YoBrew, 2014). La acumulación de etanol tiende a disminuir la tasa de fermentación, ya que este es considerado un inhibidor de la glucólisis en las levaduras, alterando su crecimiento, metabolismo y viabilidad (Caelsen, Degh, & Lloyd, 1991, pág. 2879).

La capacidad fermentativa de las levaduras se ve afectada directamente por la resistencia alcohólica, mientras sus células presenten mayor viabilidad, sus procesos metabólicos se desarrollan de forma correcta permitiendo metabolizar los azúcares del sustrato, optimizando los recursos del medio y con ello incrementando la producción de etanol que es uno de los parámetros más importantes en la industria de la fermentación. Con el objetivo de encontrar levaduras con mayor capacidad de fermentación se han desarrollado estudios con levaduras de carácter salvaje que tienden a mejorar el perfil de fermentación cuando presentan limitación de nutrientes por mitofagia y desarrollando mutantes en base a parentales salvajes que permitan optimizar la fermentación (Shiroma, Niroshan, Horie, Okamoto, & Kitagakia, 2014, pág. 1002).

1.4. Levaduras

Las levaduras son definidas como un tipo de hongos unicelulares que se reproducen de forma asexual, según sus características macroscópicas y microscópicas se ha determinado tres clases los ascomicetos, basidiomicetos y deuteromicetos (Leveau & Bouix, 2000, págs. 3-9). Estos microorganismos se han relacionado durante siglos en procesos de fermentación generando productos como la cerveza y el pan.

Según Uribe (2007, págs. 34-37) las levaduras crecen en lugares con altos contenidos de azúcares como cortezas de frutos, en simbiosis con animales e insectos a temperaturas comprendidas entre 5- 47 °C, además de soportar variaciones de pH entre 2.8 - 8.5. Las dimensiones de las levaduras están entre los 1-9 μm de ancho y de 2-20 μm de longitud según la especie, nutrición y edad (Carrillo.L. & Audisio.C., 2007, págs. 40-42).

La taxonomía de estas se ha desarrollado en dos periodos el primero se basó en el estudio morfológico, fisiológico y genética convencional; en la segunda etapa se emplearon técnicas de ultramicroscopio, bioquímicas y estudios de biología molecular. Esta segunda etapa ha permitido lograr la caracterización e identificación mucho más precisa a nivel de género y especie (Orberá, 2004, págs. 15-19).

1.4.1. Características de la reproducción vegetativa.

La reproducción vegetativa de estos microorganismos se presenta por gemación o escisión binaria o una combinación de ambas. La gemación puede ser polar, bipolar o multipolar; la formación de la yema comienza con una evaginación de las células, después la yema aumenta de tamaño y finalmente se separa de la célula madre. Dado su tipo de reproducción son un buen modelo eucariótico de estudio (Herrero & Gallego, 1997, págs. 115-116).

1.5. Identificación de levaduras

La identificación es un proceso que permite caracterizar taxonómicamente las diferentes cepas de levaduras estudiadas alrededor del mundo. Estos criterios se basan en el tipo de reproducción vegetativa, características sexuales, bioquímicas y fisiológicas. En la actualidad una prueba de identificación más específica hace referencia a la identificación molecular cuyos parámetros permiten determinar género y especie de un determinado microorganismo (Leveau & Bouix, Taxonomía, 2000, págs. 5-9).

Existen dos subdisciplinas de la genética que usando las técnicas de biología molecular permiten el estudio de genomas completos. La genómica se ocupa del mapeo, secuenciación y análisis de un genoma, aporta información acerca de las secuencias y

su función ante las diferentes condiciones de desarrollo, así como de los mecanismos implicados en la regulación de la expresión e interacción génica (Echenique, Selva, Meier, Roncallo, & Schrauf, 2010, págs. 100-103); el objetivo de la genómica es explicar de forma completa y exacta la secuencia de ADN de un genoma haploide representativo de una especie y los mecanismos que intervienen en la regulación de la expresión (Riquelme & Pinto, 2005, pág. 1).

Otra subdisciplina más compleja que permite la secuenciación del genoma de uno o varios microorganismos al mismo tiempo, es la metagenómica; su fundamento refiere a la amplificación de genes ribosomales que codifican para la subunidad 16S o 18S, esta subunidad es muy importante porque su secuencia es altamente conservada y se utiliza para clasificaciones filogenéticas de organismos eucarióticos. Por medio de la PCR (Polymerase Chain Reaction ó Reacción en Cadena de la Polimerasa) se amplifican las secuencias ARNr 18S empleando primers específicos u oligonucleótidos, que posteriormente se clonarán en vectores o plásmidos generando secuencias que permitan un análisis en diversas bases de datos (Escalante, Gosset, Martinez, & Bolivar, 2004, págs. 583-594).

1.5.1. Métodos morfológicos de identificación.

Dentro de la investigación convencional existen métodos de tipo macro-microscópicos y bioquímicos, que se basan en el estudio de las características morfológicas y fisiológicas, esto conlleva un sin número de repeticiones hasta lograr un resultado fiable, es por ello que es un proceso complejo. Dentro de los criterios macroscópicos se analiza el aspecto de las colonias como su forma, elevación, margen, color, olor y otros; estos parámetros se evalúan en un determinado medio de cultivo (Linares & Solis, 2007, pág. 1).

Los parámetros microscópicos permiten analizar la formación del tubo germinativo, formación de cápsulas, presencia ausencia de hifas (Mendoza, 2005, págs. 5-6) y principalmente la morfología del estado sexual y asexual, resultados que conllevan a la identificación de género, la desventaja de este método radica en el estado sexual de reproducción de la fase levaduriforme de los ascomicetes y basidiomicetes lo que permite que una misma especie sea nombrada de una forma en el estado vegetativo (anamorfo) y la otra en el estado sexual (Teleomorfo). (Orberá, 2004, págs. 15-19).

Para la identificación microscópica se emplean tinciones con colorantes simples como el azul de metileno, lugol, azul de lactofenol que permiten aumentar el contraste de las células preservando sus estructuras o tinciones diferenciales, que permiten distinguir entre dos tipos de microorganismos como la tinción Gram, donde la mayoría de levaduras se comportan como Gram positivos dado que la presencia del peptidoglicano en su pared le otorga un color violeta a la célula (Garcia & Silva, 2006, pág. 333).

1.5.2. Métodos bioquímicos de identificación.

Los métodos bioquímicos se basan en pruebas fisiológicas de fermentación y asimilación de fuentes de carbono, compuestos nitrogenados y otros compuestos que intervienen en procesos metabólicos. La desventaja que presenta este método radica en su reproducibilidad ya que las fuentes de los compuestos se metabolizan por rutas comunes y estos son controlados por varios genes (Lara, 2006, pág. 23). El método bioquímico más empleado para identificación de hongos es el sistema automático denominado RapID Yeast Plus System (Remel), los resultados son interpretados en función de un software específico o un libro suministrado por su fabricante, permite identificar las levaduras a nivel de especie, teniendo en cuenta las más comunes que son alrededor de 43 especies de interés médico (Linares & Solis, 2007, pág. 16).

Los errores que generan las pruebas bioquímicas tienen relación a las características de las levaduras, al estar influenciadas por las condiciones de cultivo, la mayor desventaja que presenta este método radica en la escasa diversidad de cepas que puede identificar, puesto que el desarrollo principal de este método se dió en torno a la salud pública por medio de la caracterización de diversas enfermedades o agentes patógenos.

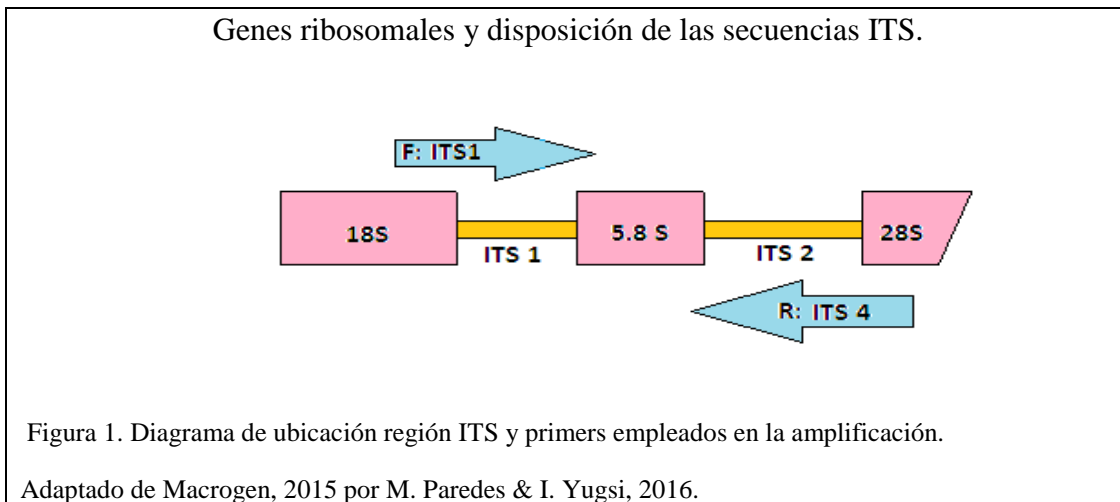
1.5.3. Métodos moleculares de identificación.

Los métodos moleculares son técnicas de biología molecular que ofrecen resultados rápidos, fiables y económicos; se basa en el análisis del ADN y las diferencias que se encuentran son conocidas como polimorfismo (Carro & Piña, 2005, págs. 1-5). Un polimorfismo representa el 0.1 % de las variaciones genotípicas de un individuo, “un polimorfismo es considerado como tal cuando la frecuencia de uno de sus alelos en la población es superior al 1%.” (Checa M. , 2007, pág. 214), son empleados en investigaciones biológicas y evolutivas; las variaciones fenotípicas de un individuo se deben en mayor proporción a la presencia de polimorfismos y en menor medida a inserciones, deleciones, arreglos cromosómicos, mutaciones entre otros. La herramienta más empleada para este fin es la PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa), permite la amplificación de secuencias altamente conservadas de ADNr como son 5.8S, 18S y 26S, para su posterior comparación con un amplio rango de microorganismos a través del GeneBank (Verdugo, 2007, pág. 30).

1.5.3.1. Genes ribosomales.

Los genes ribosomales en organismos eucarióticos como las levaduras corresponden a las unidades 5.8S, 18S y 26S; las comparaciones que se generan entre estas permiten establecer relaciones filogenéticas. La información de estos genes ribosomales permite seleccionar oligonucleótidos específicos que amplifiquen determinadas regiones del DNA por medio de PCR (Fernández, 2003, pág. 12). En hongos el ADN que codifica

para el ARN ribosomal está distribuido en unidades a lo largo del genoma, cada unidad formada por tres genes 5.8S, 18S y 26S que son secuencias codificantes y dentro de estos de forma intercalada se encuentran los espaciadores internos transcritos ITS1 y ITS2; según Esteve, Belloch, Uruburu, & Querol (1999, pág. 330) son de gran importancia en la identificación taxonómica precisa, al ser secuencias no codificantes y variables permiten establecer relaciones genealógicas entre hongos por las diferencias interespecíficas que presentan, permitiendo distinguir los microorganismos entre especies y géneros. Los genes ribosomales presentan un bajo polimorfismo intraespecífico y una alta variabilidad interespecífica atribuidos a los ITS 1 – ITS 2.



1.5.3.1.1. Espaciadores internos transcritos (ITS).

Entre los genes ribosomales se encuentran los ITS, esta región es parte de la unidad transcripcional del ADN, pero este segmento no es incorporado en los ribosomas maduros sin embargo intervienen en menor proporción en la maduración del ARN, las deleciones que se presentan en algunas regiones ITS 1 pueden inhibir la maduración de una pequeña parte de la subunidad larga del RNA mientras que algunas deleciones o mutaciones puntuales en el ITS 2 favorecen el procesamiento de la unidad larga de

RNA (Musters, Boon, Van der Sande, Heerikhuizen, & Planta, 1990, págs. 3990-3992).

Además la región ITS es considerado un código universal para el estudio de organismos del reino fungi, presenta una longitud comprendida entre los 500 y 800 pb por lo tanto es sitios diana para la detección molecular y de estudios filogenéticos, estas secuencias son cortadas y degradadas durante la maduración ADNr. Presentan una alta probabilidad de identificación, contiene un código de barras muy bien definido; la región ITS en relación a la región 5.8S que codifica para el ARNr de la subunidad pequeña presenta mayor exactitud al momento de identificar especies de hongos, por lo tanto se pretende establecer estas secuencias como el código de barras de la vida del reino fungi a partir de la cual se pueden desarrollar diversos grupos taxonómicos (Schoch, y otros, 2012, págs. 6241-6242). Estas regiones son amplificados por medio de PCR con primers universales, para el caso de las levaduras tenemos ITS 1 (CCGTAGGTGAACCTGCGG), ITS 3 (GCATCGATGAAGAACGCAAGC) e ITS 4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC).

Los ITS muestran diferencias evolutivas y proporcionan información taxonómica de los microorganismos, al presentar una evolución lenta su variabilidad permite un análisis entre órdenes, géneros y especies relacionadas; estas regiones son relativamente pequeñas (350-880 pb) por lo tanto fácil de amplificar y alinear; las variaciones que se presentan en los ITS son mutaciones puntuales y en menor proporción deleciones es por ello que entre las secuencias altamente similares se encuentra pequeñas variaciones que permiten desarrollar el análisis filogenético (Baldwin, y otros, 1995, págs. 248-249). Se consideran piezas de ARN no funcional que presentan una presión evolutiva relativamente baja en secuencias de tipo no funcionales.

1.6. Secuenciación

La secuenciación es uno de los métodos más efectivos para determinar la diversidad genética de un organismo, puesto que permite realizar una comparación y análisis entre la variación de las secuencias de diversos taxones (Boysen, Borja, del Moral, Salazar, & Rubio, 1996, págs. 174-175). Existen diferentes métodos para el análisis de secuencias sin embargo la utilización de cada una de ellos influye en la complejidad del género a estudiar.

1.6.1. Secuencias Sanger.

Uno de los más utilizados es el método de terminación de cadena planteado por Fred Sanger en 1974 y que con el transcurso de los años se ha impuesto como una herramienta útil; consiste en la replicación de una cadena de ADN incorporando un nucleótido sintético modificado llamado didesoxinucleotido (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP) que se caracteriza por la falta de un grupo hidroxilo en su carbono 3' y de esta manera el nucleótido termina la elongación durante la replicación de ADN. La reacción se lleva a cabo por cuatro diferentes mezclas, cada una contiene varias copias de una cadena de ADN que será secuenciada, también ADN polimerasa y cebadores apropiados que han sido marcados radiactivamente. Dependiendo del didesoxinucleótido incorporado, el sitio donde se encuentre la adenina, guanina, citosina, timina se detiene la elongación para que en la reacción se formen fragmentos de ADN de diferentes longitudes, la lectura la realiza una computadora que utiliza un láser para leer la fluorescencia de los marcadores conforme a las bases que emergen de un carril de electroforesis (Solomon, Berg, & Martin, 2013, págs. 331-336).

1.6.2. NGS (Secuenciación de la Nueva Generación).

Los métodos moleculares de detección no son lo suficientemente sensibles para una sola molécula por tal motivo NGS en algunos casos emplea clonación in vitro o PCR de emulsión, esto convierte a este tipo de tecnología en una poderosa herramienta para estudios de genómica estructural y funcional, permitiendo desarrollar procesos como la secuenciación metagenómica para el análisis del ADN extraído directamente de las comunidades microbianas sin la necesidad de realizar cultivos en entornos controlados permitiendo identificar la diversidad presente en ambientes naturales (GenomaMayor, 2014).

La NGS se ha convertido en una herramienta valiosa en la investigación científica, la cual puede generar millones de pequeñas secuencias de nucleótidos considerados la base de los estudios biológicos contemporáneos ya que estudia la naturaleza y dinámica de los ácidos nucleicos, el problema de esta tecnología hace referencia a la dificultad del análisis de los datos generados, falta de información para el ensamblaje del genomas y al uso de la variedad de recursos computacionales dada la complejidad del manejo de los k-mer (todas las posibles subsecuencias a partir de una lectura obtenida mediante secuenciación de ADN) (Fabbro, Scalabrin, Morgante, & Giorgi, 2013, pág. 5).

Los estudios de metagenómica involucran el desarrollo de librerías de ADN, “una librería es una colección de clones de vectores que contienen fragmentos de DNA diseñada de tal manera que, mediante un determinado sistema de selección, se pueden llegar a separar los clones de interés.” (Riquelme & Pinto, 2005, págs. 6,8). Estas librerías permiten secuenciar un gen completo o una región de un determinado cromosoma. Teniendo en cuenta que en estudios de diversidad microbiana solo el 1% de los microorganismos se pueden aislar con los medios actuales de cultivo se

desarrolla el estudio de la actividad microbiana que permite analizar la diversidad biológica de los microorganismos en su hábitat y así los consorcios microbianos se benefician de esta tecnología, al lograr una secuenciación simultánea de todo el material genético contenido en una muestra de ADN (Universidad Autónoma de Madrid, 2005, págs. 1-2).

1.6.3. Tecnología de secuenciación.

Illumina es considerada una tecnología masiva de secuenciación salió al mercado en 2006, tiene la capacidad de proporcionar alrededor de un millón de secuencias en una sola corrida de 48 horas, estas secuencias tienen una longitud media de lectura entre 35 - 75 pb en condiciones de bibliotecas genómicas esto hace más fácil su cartografía (Guilles, y otros, 2011, págs. 1-2); presentan una alta precisión de datos, aplicaciones en genómica, transcriptómica y epigenética.

Está constituida de los siguientes procesos: incorporación de adaptadores en los extremos de la muestra de ADN, adaptación de la muestra a la superficie de la célula de trabajo, formación del puente de amplificación, formación de doble conjunto de moléculas en la parte solida del sustrato, desnaturalización del doble conjunto de moléculas, amplificación completa de las muestras en función de una parte específica de la placa según el nucleótido (generación de clústeres), determinación de la primera base por excitación con láser de los nucleótidos y reconocimiento del mismo, determinación de la segunda base, determinación de la secuencia de bases del fragmento, alineación de datos y comparación en función de una referencia de bases (ILLUMINA Inc, 2014).

454 GS-FLX Titanium esta tecnología cuenta con una combinación de lectura larga (250-400 pb), alta precisión y rendimiento, tiempo de lectura 10 horas. Los pasos que lleva a cabo esta tecnología parten del uso de ADN purificado del cual se obtiene

fragmentos de ADN, con adaptadores específicos en cada extremo para su posterior adición a una nanoesfera (contiene agua, aceite y los reactivos necesarios de PCR) que permite la secuenciación y amplificación del fragmento. La amplificación se genera después de transcurridos algunos ciclos de PCR al final se obtienen los amplicones de cada secuencia con su librería repetida muchas veces. La secuenciación emplea los amplicones previamente generados a los cuales se les adiciona la enzima sulfúrilasa y luciferasa, estos son dispuestos sobre los pocillos de las placas para ser introducidas en el secuenciador, en éste se genera una determinada fluorescencia en función de una base, ésta es identificada por un software, que genera un pirograma de la secuencia en cada pocillo, este proceso se realiza de forma cíclica hasta obtener toda la lectura de la muestra (Medicina Molecular, 2009). Una vez determinadas las secuencias se realiza un análisis de datos por medio de herramientas bioinformáticas.

1.6.4. Análisis bioinformático de la secuencia.

La comparación de las secuencias se desarrolla por medio de procesos bioinformáticos, que permiten el análisis estructural y funcional de las nuevas secuencias obtenidas, la comparación se la realiza por medio de Bases de Datos (BD), se basa en un proceso fundamental que consiste en el alineamiento simple o múltiple de las secuencias y comparación en función de patrones presentes en BD esta comparación permite identificar la conservación (muestra las relaciones evolutivas de secuencias diferentes) y la variación de patrones (refleja los cambios ocurridos durante la evolución como sustituciones, inserciones y eliminaciones). El alineamiento de las secuencias sirve para cuantificar la similitud (%), se expresa el porcentaje de residuos alineados que son similares en cuanto a propiedades fisicoquímicas tales como el tamaño, carga, e hidrofobicidad. Es un resultado directo de la observación de un alineamiento de secuencias y la homología hace referencia a un origen evolutivo para un determinado

organismo basado en un ancestro común, además en la alineación es importante tener en cuenta el tamaño de las secuencias ya que mientras más larga sean éstas, las alineaciones al azar son poco probables (Rodríguez E. , 2013, págs. 4-21).

Con el fin de analizar los datos biológicos generados, se emplean tecnologías computacionales, que están relacionadas con el almacenamiento y procesamiento de datos dentro de estas tenemos: bases de datos biológicas, bodegas de datos, minería de datos en bioinformática y además de ello es importante el uso de herramientas de software como herramientas de recuperación de datos desarrolladas por la NCBI (National Center for Biotechnology Information) que permite el acceso integrado a un conjunto de dominio de datos, comparación de secuencias . La herramientas de alineación más conocida es BLAST (Basic Local Alingment Search Tool o algoritmo de comparación de secuencias), ésta permite realizar un alineamiento de secuencias y determina la similitud que existe entre ellas (Echenique, Selva, Meier, Roncallo, & Schrauf, 2010).

Este algoritmo presenta tres etapas: la primera ensemillado o seeding que consiste en buscar palabras claves dentro de los alineamientos significativos cuya puntuación sea mayor a T (parámetro de modificación); la segunda corresponde a la extensión emplea las palabras claves que son extendidas hacia los extremos del alineamiento empleando el algoritmo de Smith –Waterman, hasta descender a la puntuación de X; la tercera corresponde a la evaluación de los alineamientos generados estos son evaluados y se determinan las inconsistencias de los alineamientos resultantes, a los cuales se les da una puntuación (High score pairs) para el cálculo de la puntuación final, de forma paralela se determina el grado de significancia, E-Value, este parámetro representa la significancia estadística del alineamiento que se desea obtener, por lo tanto mientras más bajo sea este valor, su alineamiento es significativo (Cañizares & Blanca, 2015).

Además existen herramientas de descubrimiento de patrones para el análisis de clusters, herramientas de visualización de datos genómicos, entre otros, este tipo de software se los puede encontrar de diversos precios o de forma gratuita en el internet (Meneses & Rozo, 2011, págs. 118-120).

Se debe tener en cuenta algunos parámetros de información posterior al análisis de la secuencia como Query Coverage (QC) que indica el porcentaje de la longitud de la secuencia que hemos introducido y que ha conseguido encontrarse en la base de datos (valor óptimo es 100%), con este valor se logra establecer el género al que pertenece un microorganismo, Máxima Identidad (Ident) muestra el porcentaje de identidad (número de coincidencias cada cien posiciones) que posee la secuencia que hemos introducido con la secuencia de la base de datos, dentro de la longitud que ha encontrado (valor óptimo > 98%) este valor nos indica la especie y E-value representa un dato estadístico que indica cuánto se parece nuestra secuencia con la que ha encontrado el software, cuando más se acerque a cero más se parecerán ambas secuencias (Universidad Autónoma de Madrid, 2009, págs. 5-6).

El análisis metagenómico es considerado muy complejo porque estudia de forma integral un conjunto de genomas, sin la necesidad de que los microorganismos hayan sido previamente aislados, englobando de esta forma la diversidad microbiana de una determinada muestra; los datos que generan las plataformas de secuenciación asociadas a estos métodos proporcionan archivos de tamaños que van desde megas hasta terabytes (Izard & Rivera, 2015, págs. 16-17).

El proceso de análisis metagenómico está basado en los siguientes pasos: extracción del material genético, cuantificación de ADN, fragmentación, preparación de la biblioteca genómica, secuenciación nucleotídica, análisis de resultados (Macrogen Inc, 2015).

Para el análisis de resultados existen diferentes tipos de software que permiten la interpretación de los datos en crudo, en primera instancia se precede a eliminar secuencias redundantes, para eliminar las secuencias que son repetidas y tienden a aparecer varias veces a lo largo de los datos generados, estas se agrupan en altamente repetitivas que representan las secuencias de menor tamaño y medianamente repetitivas con un mayor tamaño, estas secuencias presentan un grado de homología variable (IIBCE, 2010). Con el fin de maximizar la homología de las secuencias se establece una secuencia consenso, en ésta cada base debe ser predominante en una posición; y entre ellas deben diferir en pocas posiciones, por ejemplo no más de 1 ó 2 nucleótidos (Lewin, 1996, pág. 289).

Finalmente se realiza un alineamiento de las secuencias consensos (anexos 3 y 4) a través del programa bioinformático, este proceso permite establecer el nivel máximo de identidad, determinar el grado de similitud y la posibilidad de homología entre estas. En este punto se llevan a cabo procesos de filtración que eliminan secuencias que pueden ser falsas y los gap que son espacios introducidos para compensar las deleciones o inserciones en una secuencia con respecto a otra, esto permite deducir una puntuación adecuada de un alineamiento. Los valores generados en BLAST tienden a interpretarse en función de los siguientes parámetros: QC (100%), Ident (100%), E-Value ($< = 0$), los valores adecuados de estos parámetros permiten encasillar un determinado individuo dentro de una especie (NCBI, 1988).

2. Metodología

El presente trabajo de titulación empleó técnicas de Biología Molecular y Bioinformática para lograr identificar las cepas de estudio.

2.1. Selección de muestras

Se seleccionó 6 cepas de levaduras (tabla 1) que según la investigación “Aislamiento y caracterización de taxa de levaduras presentes en el fruto de mortiño *Vaccinium floribundum* y pitahaya *Hylocereus sp*, *Selenicereus sp* capaces de fermentar en condiciones similares al mosto de uva” realizado por Coba P. (DIPA, 2013) presentaron las mejores características organolépticas como: fuertes olores frutales y característicos de la fermentación, resistencia alcohólica entre 10 y 12 %, alta y mediana capacidad fermentativa, esto en comparación a las 23 cepas que fueron aisladas a partir del epicarpio escamoso del fruto de pitahaya.

Tabla 1.

Cepas aisladas del fruto de pitahaya, previo del trabajo de investigación Bqf. Pablo Coba.

Levaduras		Descripción	
Códigos	Resistencia Alcohólica	Capacidad Fermentativa	Características organolépticas
N003/2/F	10%	SI (medio)	olores frutales
N002/3/D	10%	SI (medio)	Olor propio de la fermentación
N009/3/D	10%	SI (medio)	Olor propio de la fermentación
N010/3/D	12%	SI (alto)	olores frutales
N011/3/D	10%	SI (bajo)	Olor propio de la fermentación
N019/3/D	12%	SI (alto)	olores frutales

Nota: Adaptado del trabajo de investigación realizado en UPS (2013-2014) a cargo del Bqf. Pablo Coba Santamaría por M, Paredes & I, Yugsi, 2016.

2.2. Revitalización

La revitalización consistió en tomar las 6 cepas seleccionadas, que se encuentran conservadas en los cryobank de los laboratorios de Ciencias de la Vida (CIVABI). Con ayuda de un punzón estéril se tomó una perla del cryobank y se depositó en 10 ml de caldo YPD, se incubó la muestra por 72 horas a temperatura de $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$.

Se verificó la morfología de las cepas empleadas a través de ensayos microscópicos; las cepas del caldo YPD fueron sembradas en agar sabouraud para formación de las colonias; y su uso en posteriores ensayos microscópicos y procesos de extracción de ADN.

2.3. Ensayos microscópicos

Según la investigación realizada por Coba P. (DIPA, 2013) las cepas aisladas constituían cultivos puros de levaduras, con el fin de verificar este parámetro se empleó tinciones con azul de metileno y tinción Gram, además se evaluó parámetros macroscópicos como forma, margen, color y elevación.

- Tinción Gram

Se tomó una UFC (Unidades Formadoras de Colonias) con un asa de microbiología previamente estéril, se depositó la muestra sobre el portaobjeto, con la ayuda de un cubreobjetos se hizo un frotis y se procedió a fijar la muestra cerca del mechero procurando que ésta se seque completamente. Se adicionó 3 gotas de cristal violeta sobre la muestra o hasta que esté totalmente cubierta, dejar reposar un minuto, escurrir y enjuagar; cubrir con lugol esperar 1 minuto, escurrir y enjuagar; cubrir con alcohol cetona por 5 segundos, escurrir y enjuagar; finalmente cubrir con safranina esperar 1 minuto escurrir y enjuagar, dejar secar y observar al microscopio.

- Tinción azul de metileno

Se tomó una UFC con un asa de microbiología previamente estéril y se depositó a muestra sobre el portaobjeto, se procede a realizar un frotis y fijación de la muestra. Colocar 2 gotas del azul de metileno sobre la muestra, dejar reposar 2 min y enjuagar con agua destilada, dejar secar y observar al microscopio. La observación en microscopio primero se realizó con el objetivo de 40 x, para obtener una mejor resolución se coloca una gota de aceite de inmersión sobre el portaobjetos y se observa con el objetivo de 100 x.

2.4. Re aislamiento de cepas

Las 3 cepas de consorcios fueron re-aisladas de la siguiente forma: se cultivó las cepas en cajas petri con 25 ml agar YPD, se incubó por 48-72 horas; se tomó únicamente la UFC aislada con la ayuda de un punzón estéril y se la depositó sobre otra caja petri con medio agar YPD, teniendo en cuenta todas las consideraciones de asepsia necesarias, se las dejó incubar por 48-72 horas, las tinciones ayudan a evidenciar diferencias morfológicas si existieran.

2.5. Extracción de ADN.

Las 6 cepas de levaduras fueron inoculadas en matraces de 100 ml con 25 ml de medio YPD Broth, incubadas por un lapso de 3 días a temperatura de $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$ hasta obtener una concentración 4 en la escala de Mc Farland. Se tomó 2000 ul de cada muestra y se depositó en microtubos de 2.5 ml, se colocó los tubos en la microcentrifuga a 15000 rpm por 10 min, se descartó los sobrenadantes y se llevó los tubos que contenían los

pellets a estufa a una temperatura de $45 \pm 5^\circ \text{C}$ por 3 días hasta obtener el pellet deshidratado (Salas, 2007).

Se utilizó el protocolo de extracción propuesto por Raeder & Broda (2008, págs. 17-20) con las modificaciones realizadas por De la Torre (2010): en microtubos de 2.5 ml se colocó 45 mg de material celular seco de cada cepa, el cual fue sometido a congelación en nitrógeno líquido por 20 s y posterior maceración con un pistilo estéril por 5 segundos o hasta la obtención de un polvo fino; se agregó 500 μl de una solución amortiguadora de extracción (anexo 1) a temperatura ambiente y se incubó los tubos por 10 min, posteriormente se añadió 500 μl de fenol-cloroformo (50/50) a 4°C , se mezcló por 5 min y se realizó una posterior centrifugación a 13000 rpm por 30 min.

El sobrenadante obtenido se transfirió a un nuevo microtubo Eppendorf de 2.5 ml y se le añadió 400 μl de cloroformo frío (-20°C), se mezcló por inversión 1 min y luego se lo centrifugó a 13000 rpm por 5 min. El sobrenadante se transfirió a nuevo microtubo con 4 μl de RNAsa (10 mg/ml) y se incubó por 30 min a 37°C . Se añadió 500 μl de isopropanol frío a 4°C y se mezcló 3 min por inversión para incubar a -20°C por 15 min para una posterior centrifugación a 13000 rpm por 5 min. Se desechó el sobrenadante, al pellet obtenido se le añadió 500 μl de etanol al 70 % a -20°C , se lo mezcló por inversión y posteriormente se lo centrifugó a 13000 rpm por 5 min. Se desechó el sobrenadante y se dejó secar el pellet por 20 min para a continuación ser re-suspendido en 50 μl TE 1X y es almacenado a 4°C si su uso va a ser inmediato o a -20°C si se lo va a conservar por un largo tiempo.

Se determinó la calidad del ADN a través de una electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1.5 % con 10 μl de SYBR safe; en cada pocillo del gel se depositó 15 μl de

muestra (5 ul de ADN y 10 ul Blue Juice 8x). La electroforesis se efectuó a 90 V por 40 min; finalizado el proceso se visualizó el gel en el fotodocumentador y se generó fotografías de los resultados.

Las muestras de ADN obtenidas fueron cuantificadas por medio del espectrofotómetro NanoDrop, este equipo usa las longitudes de onda a 260 nm para calcular la concentración de ácidos nucleicos donde la Densidad Óptica (OD) 1 corresponde a ~ 50 ng/ul y la relación entre 260/280 nm generó valores entre 1.8 y 2, siendo este rango el óptimo (Rada & Taboada, 1998).

2.6. Amplificación región ITS.

Las 6 muestras de ADN fueron amplificadas por medio de PCR, se empleó los primers ITS 1 (5' CCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS 4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') y se probó dos protocolos de amplificación, el primero se basó en el siguiente programa de PCR, un ciclo inicial de desnaturalización a 95 °C por 5 minutos, 30 ciclos de desnaturalización cíclica a 95 °C por 3 minutos, 30 segundos de anillamiento (annealing) a 60°C, 1 min de elongación a 72 °C y una extensión final de a 72 °C por 10 minutos (Mambuscay, Lopez, Cuervo, Argote, & Osorio, 2013) esté en relación al protocolo expuesto por (Fujita, Senda, Nakaguachi, & Hashimoto, 2001) solo presenta una variación en la temperatura de annealing 55°C que en su estudio le permitió amplificar la región ITS.

Se probó diferentes volúmenes de ADN entre 1.5 y 7 ul, dado que no se ha estandarizado un protocolo para nuevas especies en estudio, además en la mezcla para PCR se empleó el reactivo PCR SuperMix de Invitrogen en conjunto con otros

componentes que se detallan en la tabla 2. Los productos de PCR fueron visualizados en gel de agarosa al 0.75 % con el fin de evidenciar la amplificación de las secuencias ITS.

Tabla 2.

Componentes de la mezcla para amplificación en PCR de región ITS.

Reactivo	Volumen (concentración final)
PCR SuperMix (Taq ADN polimerasa, Mg ²⁺ y dNTPs)	45 ul (1X)
Primer Forward (ITS 1)	1 ul (0.2 mM)
Primer Reverse (ITS 4)	1ul (0.2 mM)
ADN	Entre 1.5 ul y 7 ul (<500 ng)
Agua libre de RNAsa	c.s.p 50 ul

Nota: Componentes para mezcla de PCR.

Elaborado por M. Paredes & I. Yugsi, 2016.

2.7. Secuenciación

Este proceso permitió obtener varias copias de diversos fragmentos de ADN de una determinada muestra, para su posterior análisis.

2.7.1. Secuenciación de cepas puras.

Este proceso se llevó a cabo en la empresa Macrogen (Corea), que utilizó la secuenciación a gran escala desarrollada por “Applied Biosystems”, específicamente el modelo “3730XL”, este equipo trabaja utilizando el método Sanger y genera resultados a las 48 horas, consta de un apilador integrado a la placa, lector de código de barras interno y sistema de entrega de polímero a bordo. De las 6 muestras amplificadas en el laboratorio, se envió 30 ul del producto de PCR para la secuenciación; esta consistió en una síntesis enzimática de los amplicones de secuencia

complementaria al ADN molde, en el extremo 3' se añaden los dNTP's, por la acción de la ADN polimerasa se añaden de manera aleatoria los ddNTS's estos están marcados de forma fluorescente y difieren en la falta del grupo hidroxilo del carbono 3' evitando la formación del enlace fosfodiéster entre la cadena de crecimiento y el nuevo nucleótido. El resultado de la secuenciación fue analizada mediante el BLAST (nucleótidos) en la base de datos NCBI para la identificación de las especies.

2.7.2. Secuenciación de consorcios.

De los tres consorcios presentes solo se enviaron dos muestras a secuenciar, esto debido al alto costo de los procesos tecnológicos, las dos cepas fueron escogidas en función de sus propiedades organolépticas. En Macrogen, se empleó el equipo Roche de tecnología 454 GS-FLX; este equipo analiza todas las secuencias posibles generadas por rangos de lecturas, proporciona datos de hasta un millón de secuencias y además utiliza el método de la polimerización de ADN donde se incorpora un nucleótido marcado con fluorescencia que impide que la cadena siga creciendo. Tras detectar la señal fluorescente, se elimina el grupo protector.

Éste proceso tecnológico consiste en reducir las muestras a una librería de fragmentos de 300-800 pb de longitud, a estos se les añade adaptadores A y B en sus extremos, estos adaptadores presentan secuencias de hibridación para la posterior amplificación y secuenciación de los fragmentos; el adaptador B se encuentra biotinada esto permite la inmovilización de la librería en las nanoesferas por la afinidad que presenta la estreptoavidina hacia la biotina posteriormente la secuenciación se basa en la síntesis de la cadena complementaria gracias a la DNA polimerasa (Life sequencing, 2008). En la amplificación se emplean los primers ITS 1 e ITS 4, se realizan copias del mismo fragmento, la identificación de las secuencias se realiza por un sistema basado en la pirosecuenciación, es decir re-secuenciación de genomas completos.

2.8. Análisis de las secuencias

Para este proceso se emplearon herramientas Bioinformáticas disponibles en la web y de libre acceso.

La información obtenida del secuenciador automático de Sanger es guardada en ficheros binarios en formato abi. Estos ficheros pueden ser leídos en distintos programas de software libre, además también se pueden generar formatos de tipo scf. El análisis de estas secuencias se hace por medio de los electroferogramas generados a partir de estos archivos, que permiten obtener toda la secuencia completa de nucleótidos, este proceso se realiza de forma automática por medio de programas que leen este tipo de formatos. Una vez obtenida la secuencia de interés se procede a una comparación por medio de la alineación, esto permite identificar patrones de carácter común, todo esto en relación a las diferentes bases de datos disponible como NCBI, y con el uso de distintos algoritmos de búsqueda como BLAST; una vez establecidos los patrones de similitud se puede inferir en la identificación de un determinado organismo, establecer relaciones evolutivas y comparación de genomas (Meneses & Rozo, 2011, pág. 117).

Los datos generados a través de NGS son de tipo sff , para su análisis fue necesario realizar una conversión previa de los archivos a formato FastaQ , esto se realizó por medio del software bioinformático Geneious R8 (Biommatter Ltd. 2005-2012), en este proceso además se eliminan secuencias redundantes que interfieren en los resultados finales, el alineamiento se genera de forma subsecuente para establecer secuencias consensos que al ser alineadas permitan realizar una comparación entre las diferentes bases de datos. Una vez realizadas las comparaciones en relación a las bases de datos

se evaluaron a través de BLAST los parámetros de QC, E-Value e Ident, para establecer si un organismo pertenece o no a una determinada especie.

2.9. Conservación

Las levaduras identificadas fueron sometidas a un proceso de congelación en Cryobanks a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, que permite tener un material celular disponible y de calidad por varios años; una vez que se logró la identificación de las cepas se conservaron en Cryobank y se encuentran almacenadas en los laboratorios de Ciencia de la Vida de la Universidad Politécnica Salesiana (CIVABI). Este proceso se llevó a cabo de la siguiente manera, con un asa de siembra estéril y cerca del mechero se tomó una UFC del cultivo seleccionado y se depositó la muestra dentro del tubo Cryobank que contiene la sustancia de crio conservación y las perlas, se procede a homogenizar la muestra permitiendo de esta forma que el microorganismo se adhiera a las perlas y posteriormente con la ayuda de una micro pipeta de 1000 ul se procede a retirar, tanto fluido de crio conservación como sea posible finalmente se los traslado al congelador ($-80\text{ }^{\circ}\text{C}$) hasta su posterior uso.

3. Resultados y discusión

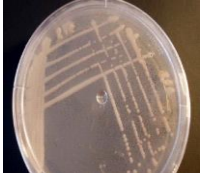
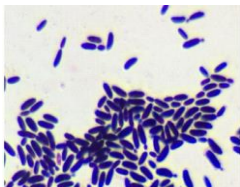



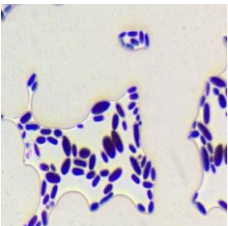

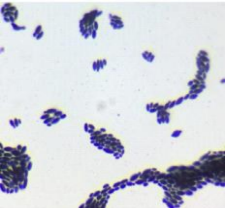

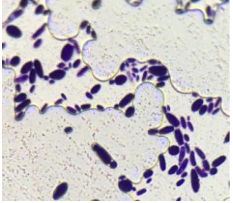

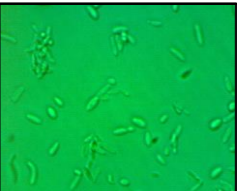
3.1. Ensayos macro - microscópicos

La observación macroscópica de las 6 cepas mostró que en su mayoría presentaron características como forma circular, margen irregular y coloración crema – blanca. Por otro lado las microscopias mostraron que las cepas se comportan como gran positivas, y su morfología presenta una forma elíptica – circular. Como mencionan Kurtzman, Fell, J., & Boekhout (2011, págs. 3-4), se debe tener en cuenta que las características macroscópicas no muestra todas las características genotípicas que puede presentar una cadena simple y cuya variabilidad constituye una descripción más acertada de una determinada especie.

Las cepas N002/3/D, N009/3/D y N003/2/F corresponden a cultivos puros de levaduras, mientras que las cepas N010/3/D, N011/3/D y N019/3/D corresponden a consorcios microbianos que no pudieron ser aislados en el proceso de re-siembra (tabla 3). Por lo que se supone una retroalimentación entre los individuos de las cepas (Hoffner & Barton, 2014). Las características macroscópicas presentan similitud entre las diferentes muestras, mientras que las características microscópicas son altamente variables. En función de su morfología los consorcios tienen una cinética de crecimiento, que una vez transcurrido el tiempo del ensayo estas se encuentran en la fase estacionaria en la cual el crecimiento es nulo y al no multiplicarse su morfología se mantiene constante, de tal forma al evidenciarse dos morfologías marcadas se puede hablar de consorcios esto acorde a lo mencionado por Hidalgo (2011, pág. 586).

Tabla 3.

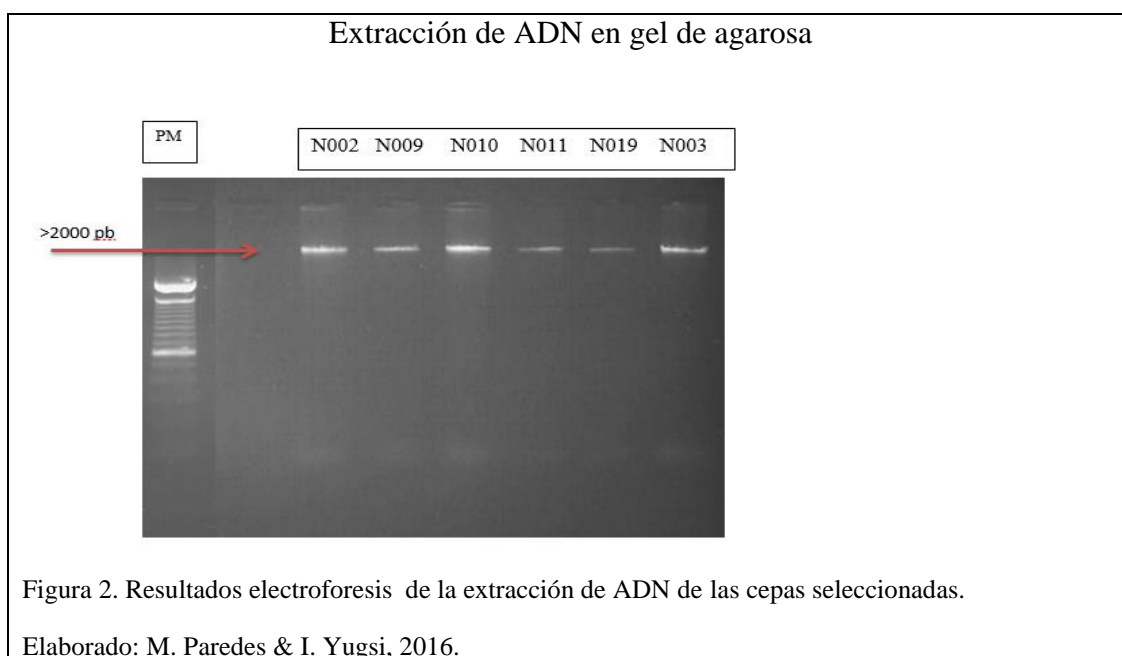
Descripción macro y microscópica de la cepas aisladas del fruto de pitahaya (*Stenocereus queretaroensis* f.a.c Weber).

CÓDIGO		DESCRIPCIÓN MACROSCÓPICA		DESCRIPCIÓN MICROSCÓPICA
N002/3/D		ELEVACIÓN: Convexa		Tinción Gram (+) Violeta
		FORMA: Circular		CAMPO: 100 X
		MARGEN: Irregular		ESTIMADO: elíptica
		COLOR: Crema		Resistencia Alcohólica : 10%
		TAMAÑO: 3 mm		Características organolépticas: Olor frutal
N009/3/D		ELEVACIÓN: Elevada		FIJACIÓN: Azul de metileno
		FORMA: Circular		CAMPO: 40 X
		MARGEN: Irregular		ESTIMADO: Elíptica
		COLOR: Crema		Resistencia Alcohólica : 10%
		TAMAÑO: 3 -4 mm		Características organolépticas: Olor propio de la fermentación
N010/3/D		ELEVACIÓN: Convexa		Tinción Gram (+) Violeta
		FORMA: Circular		CAMPO: 100 X
		MARGEN: Irregular		ESTIMADO: Consorcio
		COLOR: Crema		Resistencia Alcohólica : 12%
		TAMAÑO: 3 mm		Características organolépticas: Olor propio de la fermentación
N011/3/D		ELEVACIÓN: Plana		Tinción Gram (+) Violeta
		FORMA: Circular		CAMPO: 100 X
		MARGEN: Irregular		ESTIMADO: Consorcio
		COLOR: Crema		Resistencia Alcohólica : 10%
		TAMAÑO: 2 mm		Características organolépticas: Olor propio de la fermentación
N019/3/D		ELEVACIÓN: Umbilicada		Tinción Gram (+) Violeta
		FORMA: Circular		CAMPO: 100 X
		MARGEN: Irregular		ESTIMADO: Consorcio
		COLOR: Crema		Resistencia Alcohólica : 12%
		TAMAÑO: 4 mm		Características organolépticas: Olor propio de la fermentación
N003/2/F		ELEVACION: Convexo		FIJACION: Azul de metileno
		FORMA: Circular		CAMPO: 40 X
		MARGEN: Irregular		ESTIMADO: Elíptica
		COLOR: Blanco		Resistencia Alcohólica : 10%
		TAMAÑO: 4 mm		Características organolépticas: Olor frutal

Elaborado por M, Paredes & I, Yugsi, 2016.

3.2. Extracción de ADN y cuantificación

El protocolo de extracción fue exitoso en las 6 muestras seleccionadas, tomando en cuenta que el gel de agarosa presenta bandas con una adecuada calidad de ADN al no evidenciar degradación del mismo (figura 2) es decir alto peso molecular libre de proteínas, fenoles entre otros. (Rada & Taboada, 1998, pág. 63). Según FERMENTANS Life Sciences (2010) la calidad del ADN extraído está en relación a la intensidad entre las bandas de ADN y la ausencia de smear principalmente.



A través de espectrofotometría se logró cuantificar las moléculas de ADN genómico, se midió la absorbancia de la muestra a 260 nm ya que éste representa el espectro de absorción de la molécula de ADN y 280 nm que muestra el espectro de una proteína; se presentó concentraciones entre 295 y 715 ng/ul (tabla 4) la relación 260/280 mostró un valor promedio de 1.87, el rango 1.8 - 2 representa el ratio específico para ADN y ARN; parámetro que mostró una óptima calidad de ADN, en consecuencia estos

valores están dentro de los límites establecidos, según lo expuesto por Guevara y otros (2009, págs. 26-27).

Tabla 4.

Resultados de la cuantificación por medio del equipo NanoDrop.

Sample ID	User ID	Date	Time	ng/ul	A260	A280	260/280
N009	Default	10/12/2015	9:50	715,39	14,308	7,42	1,93
N010	Default	10/12/2015	9:51	533,03	10,661	5,901	1,81
N011	Default	10/12/2015	9:51	633,97	12,679	6,682	1,9
N019	Default	10/12/2015	9:52	295,69	5,914	3,253	1,82

Nota: Datos obtenidos en el equipo NanoDrop, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, 2015.

Elaborado por M. Paredes & I. Yugsi, 2016.

3.3. Amplificación de la región ITS

Se empleó el primer forward ITS 1 y reverse ITS 4, estos tienen la capacidad de amplificar las regiones internas transcritas 1 y 2 y con ello la codificación de la secuencia 5.8 S de un gran grupo de hongos. De acuerdo a los estudios realizados por Kendall & Rygiewicz (2005, págs. 2,4) la región ITS es lo suficientemente variable por lo cual es empleada para una identificación taxonómica precisa entre microorganismos.

La temperatura de annealing se fijó a 60°C, ésta mostró una amplificación clara de las regiones ITS en relación a la temperatura de 55 °C como se muestra (figura 3 y 4); esta región presentó un tamaño aproximado de 350 pb esto hace relación a los estudios realizados por Fujita, Senda, Nakaguachi, & Hashimoto (2001, pág. 3619) donde menciona que los rangos establecidos para la región ITS van desde 350 hasta 880 pb.

Tamay de Dios, Ibarra, & Velasquillo, (2013, pág. 71) indica que una concentración adecuada de ADN es de gran importancia puesto que este es el elemento principal en la PCR y permite una adecuada interacción de los demás componentes como Taq ADN polimerasa, primers, dNTPs, Mg⁺, buffer y agua y es por ello que el volumen de ADN empleado tuvo una variación entre 1.5 ul - 7 ul hasta la obtención de bandas con una intensidad adecuada, valores superiores a estos o inferiores no mostraron amplificación.

Amplificación de las muestras, basado en el protocolo de Fujita, Senda, Nakaguachi, & Hashimoto (2001).

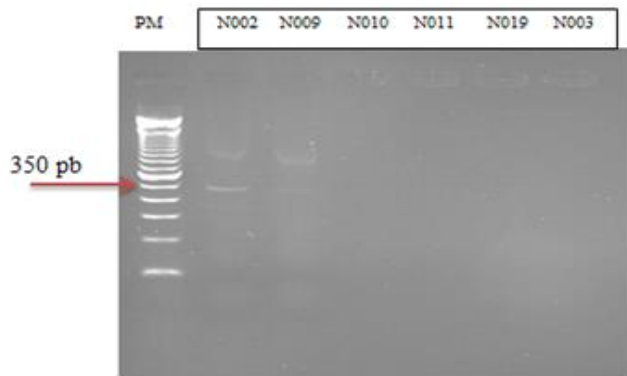


Figura 3. Electroforesis en gel de agarosa, amplificación de la región ITS en la reacción de PCR con temperatura de annealing 55°C.
Elaborado por M. Paredes & I. Yugsi, 2016.

Amplificación de las muestras, basados en el protocolo de Palmerin, Guevara, Villaseñor, & Perez (2001).

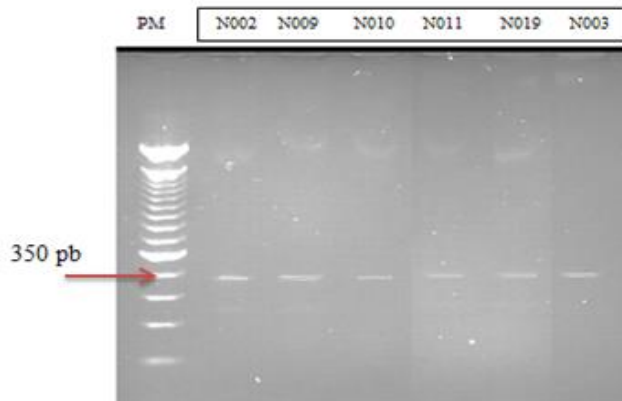


Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa, amplificación de la región ITS en la reacción de PCR con temperatura de annealing 60°C.
Elaborado por M. Paredes & I. Yugsi, 2016.

3.4. Secuenciación Sanger.

Los resultados de secuenciación Sanger de las seis cepas enviadas a Macrogen – Corea (tabla 5) permitieron identificar como *Pichia kudriavzevii* a las muestras N003/2/F y N009/3/D, tras análisis BLAST presentaron Ident 100% y QC 100% (figura 5). En relación a los estudios expuestos por Chang, Ming, Lie, & Abdul (2012, pág. 10) la especie *Pichia kudriavzevii*, es conocida como un anamorfo (fase imperfecta asexual de un ascomycete) de la especie *Candida krusei*, presentando alta capacidad fermentativa y aporta bouquet a las bebidas fermentadas. Se identificó la muestra N002/3/D como *Fungal sp.* con Ident 100% y QC 100%, según Pratic, Rastogi, Sharma, Kumar, & Prasad (2014, págs. 21-22) tienen la capacidad de transformar diversos sustratos, sus productos metabólicos son empleados como agentes de biocontrol, este individuo corresponde al reino fungi.

Tabla 5.

Resultados generados por Macrogen (Corea), secuenciación estándar simple.

Query	Subject					
	Name	AC	Gene	Ref.	Length	Start
N002/3/D	KF057556	<i>Fungal sp.</i>	http://www.ncbi.nlm.nih.gov	438	111	366
N003/2/F	FJ231421	<i>Pichia kudriavzevii</i>	http://www.ncbi.nlm.nih.gov	440	80	242
N010/3/D	-	-	-	-	-	-
N009/3/D	FJ231424	<i>Pichia kudriavzevii</i>	http://www.ncbi.nlm.nih.gov	440	75	251
N011/3/D	-	-	-	-	-	-
N012/3/D	-	-	-	-	-	-

Nota: Adaptado de Macrogen, 2015 por M. Paredes & I. Yugsi, 2016.

Alineamiento en BLAST

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Pichia kudriavzevii aureobasidin A gene, complete cds	3733	3733	100%	0.0	100%	KP729614.1
Issatchenkia orientalis inositolphosphorylceramide synthase (IPC1) gene, complete cds	3611	3611	98%	0.0	99%	AF126177.1

Secuencia:

```
ggcgtgagcggaaacaaaacaacacctaaaatgtggaatatagcatatagtcgacaagagaatctacgaaaaccaacaaaacttccacc
acggatccttggttctcgcacatcatgaagagcgcagcgaatgggatacctagtggaattggagcctcgtgaatcatccagttcttgaacgcac
attgcgccctcggcattccggggggcgcctggtgagcgtccttccctcttgcgcgtgcgcagagttgggggagcggaaacggaccacctgta
aagagcgtccgaactccactccctgaaaggagcgaactggcgaaactagactagacttttttcaggagccttggcggccgaaagcagat
gtgctgagaccacaaaagctcgacctcaatcaaggaggaatacccgtgaactaa
```

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Fungal sp. OTU4_JBL-2013 strain LL11_065 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence, and intern	809	809	100%	0.0	100%	KF057556.1
Fungal sp. OTU4_JBL-2013 strain LL11_063 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence, and intern	634	634	81%	4e-178	99%	KF057554.1
Pichia kluyveri strain LL11_074 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence, and internal transcribe	520	520	83%	1e-143	92%	KF057565.1
Pichia kluyveri isolate 34 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence	518	518	84%	5e-143	92%	KT175195.1

Secuencia:

```
gtgaacctcgggaagatcattactgtgattttaatttaacacatgcgtgagcgcactaaacacctaaaattgtaatacacaccagtcaacaaagttt
aacaaaaaaaactttcaacaacggatctcttggttctcgcacatcatgaagagcgcagcgaatgcgatacctaatgtgaattgcagccatcgtgaat
catcgagttcttgaacgcacattgcggcccccgtattccgaggggcgcctgctgagcgtcgttcttcttgcgcaagcagagttgaggactttg
cggagctttgaaacggaacgctgtggacgaagtgaactaaacattagagcgtttggccgccgaactatttccggagtttggtttttttctttgg
gaaagagagaccggctctgaaaactaagctcgactc
```

Figura 5. Descripción secuencia de *Pichia kudriavzevii*. Descripción secuencia *Fungal sp.*

Elaborado por M. Paredes & I. Yugsi, 2016.

Según la investigación realizada por Coba P. la muestra N003/2/F corresponde a la especie *Cr. albidus* con 86 % de probabilidad y *C. tropicalis* 14% y la muestra N009/3/D corresponde a una especie no identificada posterior a la aplicación de la prueba RapID Yeast Plus System; sin embargo posterior a la secuenciación Sanger estas corresponden al individuo *Pichia kudriavzevii*. La revisión bibliográfica de las microscopías corroboró el resultado Sanger debido a la fase imperfecta asexual de la especie esta presenta características similares a *Candida krusei* según lo descrito por Fleishman & Sripuntanagoon (2011, pág. 6) como se observa en la figura 6 .

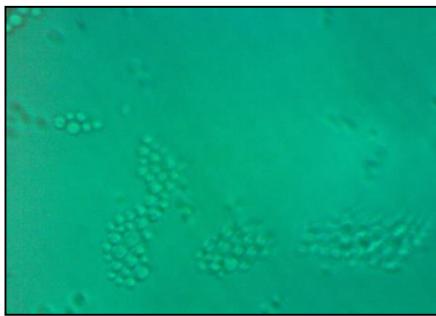
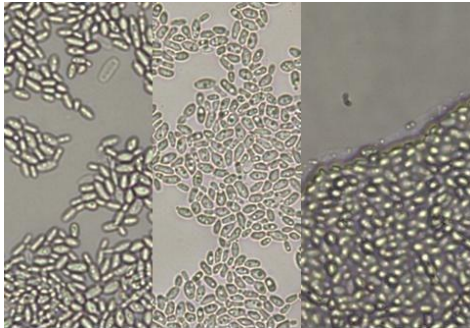
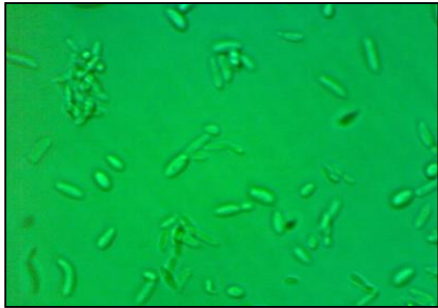
Microscopia	
Fotografía investigación	Fotografía referencia bibliográfica
	
<p>N009/3/D: <i>Pichia kudriavzevii</i></p>	<p><i>Candida krusei</i>, Visualización de células 400x. Tomada por Fleishman & Sripuntanagoon (2011, pág. 3).</p>
	
<p>N003/2/F: <i>Pichia kudriavzevii</i></p>	

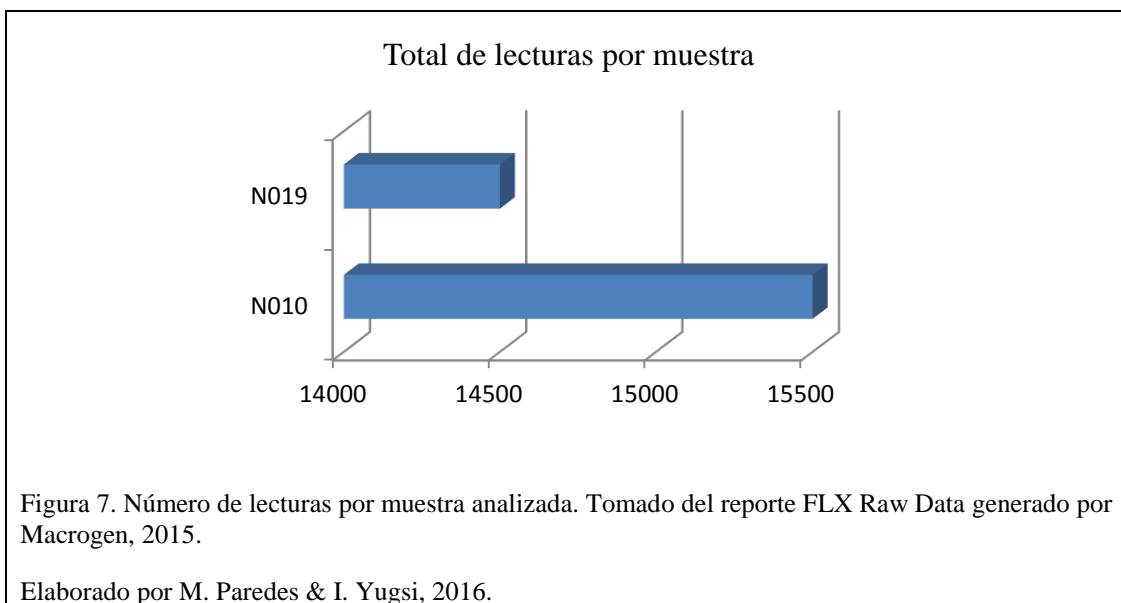
Figura 6. Comparación morfológica de cepas de levaduras de la investigación de Coba P. con referencia bibliográfica.

Elaborado por M. Paredes & I. Yugsi, 2016

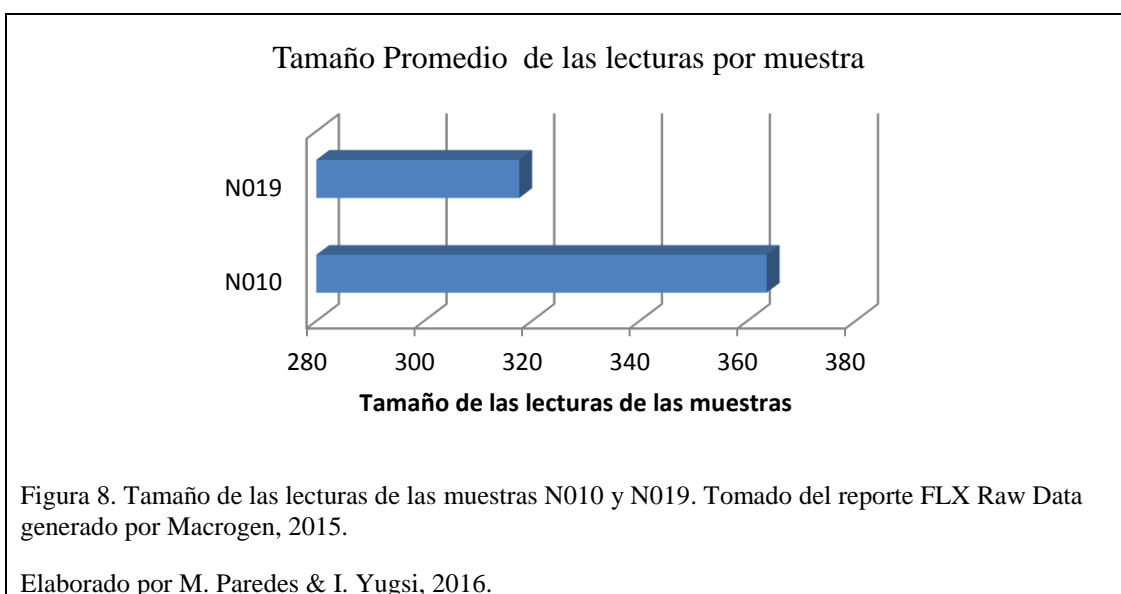
3.5. NGS (Secuenciación de Nueva Generación) metagenoma

Las muestras N019/3/D y N010/3/D (anexo 2) generaron un total de lecturas entre 14500-15500 respectivamente (figura 7), el número de secuencias generadas hace relación al proceso de clonación que se generó en función de los fragmentos de ADN molde. La clonación empieza con un número bajo de clones generados al azar hasta llegar a un punto de saturación que representa las copias necesarias para establecer una biblioteca genómica que puede inferir en la n repetición de un mismo fragmento. Por tal motivo, mientras más grandes sean las bibliotecas hay mayor certeza de que el

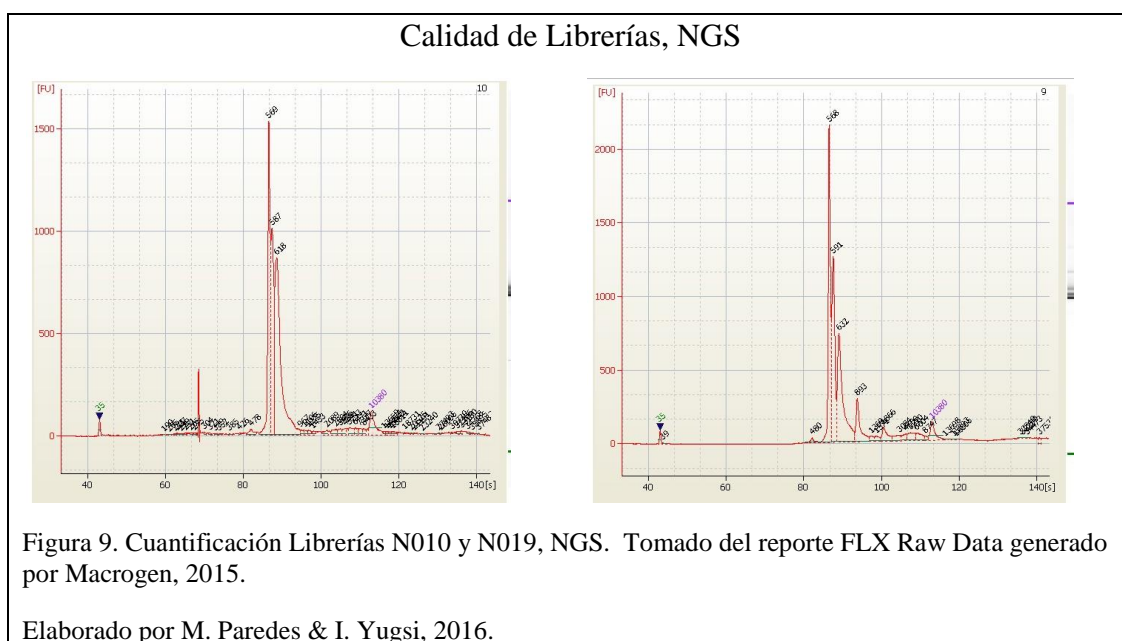
genoma de interés este representado y hay una probabilidad del 99% de encontrar el fragmento de interés (Departamento de química biológica, 2009, págs. 2-3).



El tamaño promedio de la muestra N010/3/D corresponde 363.5 pb y para la muestra N019/3/D 317.7 pb (figura 8), estos valores se encuentran comprendidos entre el rango de 350-880 pb que representa el tamaño de la región ITS de acuerdo al estudio realizado por Baldwin, y otros (1995, págs. 248-249) y Guilles, y otros (2011, págs. 1-2).



El tamaño esperado de la librería N010/3/D es 569 y de la N019/3/D es 568, estos valores se encuentran dentro del tamaño esperado a la formación de la librería que corresponde a 560 pb generada por MacroGen (figura 9). Según Agilent technologies, Inc. (2013, págs. 21-22) la calidad de una librería esta en función de: la definición de todos los picos, una línea de base plana, identificación de ambos marcadores; por lo tanto la variación de uno de estos parametros tiende a afectar la calidad de la librería.



Los parámetros que a continuación se describen (tabla 6), están dentro de las medidas establecidos por MacroGen, por lo tanto se procedió a generar las secuencias de nucleótidos para su posterior análisis de identidad.

Tabla 6.

Datos generados proceso NGS, MacroGen - Corea.

Muestras	Calidad del ADN ng/ul	Calidad Librería (NGS)	
		moléculas/ul	tamaño (bp)
N010/3/D	57,169	$1,34 \times 10^{11}$	560
N019/3/D	46,446	$1,53 \times 10^{11}$	560

Nota: Adaptado de 1512KFT-0020 - MacroGen, 2015 por M. Paredes & I. Yugsi, 2016.

3.6. Análisis de secuencias

En el consorcio N010/3/D (anexo 5), se identificó que puede estar formado por individuos probablemente del orden *Saccharomycetales* con QC 99% e Ident 92% y el género *Pichia sp.* con QC 99% e Ident 91% posterior al análisis de las secuencias en BLAST (figura 10) como muestra la siguiente tabla.

Tabla 7.

Datos generados en BLAST, muestra N010/3/D.

Individuos	Consorcio N010		
	QC (%)	E-value	Ident (%)
<i>Saccharomycetales</i>	99	0.0	92
<i>Pichia sp.</i>	99	3E-159	91

Elaborado por M. Paredes & I. Yugsi, 2016

Resultados análisis BLAST de secuencias consenso.

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Saccharomycetales sp. LM359 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	662	662	99%	0.0	92%	EF060676.1
Pichia kluyveri strain PMM10-1742L isolate ISHAM-ITS ID MITS2782 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal	658	658	99%	0.0	92%	KP132503.1

Secuencia :
 gttctgggccgcacgcgctacactgacggagccagcaagtatactctgtgcgagaggcccggtaatctcgtgaaactccgctgctgctgggg
 atagagcattgtaattttgctctcaacgaggaattcctagtaagcgaagtcacgcttgcgttgattacgctccctgacctgtacacaccgccgt
 cgctactaccgattgaatggcttagtgaggctcaagattggcgccgaggaggcaacttcccatggcgctgaaattcagcaaaacttggtca
 tttagaggctgtaaaagtcgtaacaagtttccgtaggtgaacctgcggaaggatcattactgtgatttatacttatacacatgcgtgagcgc

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Pichia fermentans strain E224 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence, and internal transcribed spacer 2	571	571	99%	3e-159	91%	KF468218.1
Saccharomycetales sp. LM359 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	571	571	99%	3e-159	91%	EF060676.1

Secuencia:
 cttggtcatttagaggaagtaaaagtcgtatttaggtttccgtaggtgaaaagcggaggatcattactgtgatttatacttatacacatgcgtg
 agcgaccaaacacctaataattgtaactaattgtcagtaagttcaacaaacaaagctttttcaacggattttctggttctcgttggatagc
 gagcgcagcgaagtgcgatacctagtgtaattgcagccatcgtgaatcagcgagtctgaatttagcttgcgcaaatggattccatgagcc
 atgcctgagcgagcgtcttcttcttgcgcaagcagagttgagaacaggctatgccttttgcgagcaggaacgtcgtggacgaagtgaactaa
 gcatttagcacgcttagga

Figura 10. Resultado de análisis de BLAST en función de la secuencia consenso A y resultado de análisis de BLAST en función de la secuencia consenso B de la muestra N010.

Elaborado por M. Paredes & I. Yugsi, 2016.

Para el consorcio N019/3/D (anexo 6) identificó que puede estar formado por individuos del orden *Saccharomycetales* con QC 100%, Ident 99% y la especie *Pichia kluyveii* con QC 100%, Ident 97% (tabla 8), posterior al análisis de BLAST (figura 11).

Tabla 8.

Datos generados en BLAST, muestra N019/3/D.

Individuos	Consortio N019		
	QC (%)	E-value	Ident (%)
<i>Saccharomycetales</i>	100	0.0	99
<i>Pichia kluyveii</i>	100	0.0	97

Elaborado por M. Paredes & I. Yugsi, 2016



Según lo expuesto por Rodríguez E. (2013, págs. 4-21) un valor adecuado para la identificación de un determinado microorganismo en un orden o género debe presentar valores de QC 99-100% e Ident 98-100%; sin embargo los estudios realizados en la Universidad Autónoma de Madrid (2009, págs. 5-6) indican que los parametros aceptables para la identificación de un microorganismo pueden estar entre los siguientes parametros QC 99-100 % e Ident 97-100 %. Cuando los valores de QC e Ident estan dentro de los parametros establecidos se puede llegar hasta la identificación de especie de un microorganismo, caso contrario si el valor de Ident esta fuera del parametro solo se puede llegar a inferir en el género del microorganismo.

No se logró identificar el total de las especies que conformaban cada consorcio debido a la baja variación de la región estudiada (ITS 1 – 5.8s – ITS 4).

Conclusiones

El método de extracción planteado por Raeder y Broda y modificado por Javier de la Torre fue adecuado para la extracción de ADN de levaduras, dado que generó altas concentraciones de ADN entre 295.69 – 715.39 ng/ul libre de proteínas y fenoles que permitió la amplificación y secuenciamiento de las cepas de levadura.

La temperatura de annealing de 60°C fue la adecuada para la amplificación de la región ITS de las muestras puesto que presentó una banda clara y bien definida en el gel de agarosa.

La técnica de Sanger permitió identificar las muestras N003/2/F y N009/3/D como *Pichia kudriavzevii* sin embargo las diferencias microscópicas entre estas hacen referencia a que esta especie es considerada como la fase anamorfa de *Candida krusei*.

La técnica NGS metagenómica permitió identificar que los consorcios N010/3/D y N019/3/D están conformados por *Saccharomycetales*, individuos del género *Pichia sp.* y la especie *Pichia kluyveii*; sin embargo no se puede estimar todos los individuos que conforman estos consorcios.

Las técnicas moleculares mostraron mayor especificidad en la identificación de las cepas de levaduras, en relación a la aplicación de la prueba bioquímica RapID Yeast Plus System previa realizada por Coba P. (2013-2014) CIBAVI – UPS.

Los cryobanks son instrumentos adecuados para la conservación de microorganismos a corto, mediano y largo plazo, dándoles viabilidad a las células para posteriores análisis.

Recomendaciones

Para investigaciones futuras se recomienda analizar la pureza de las cepas de estudio, teniendo en cuenta las características morfológicas, metabólicas, dinámica sobre el sustrato y estado sexual; características que están relacionadas a la obtención de cultivos puros.

En cuanto a la amplificación en PCR se sugiere revisar en lo posible todos los protocolos empleados, definiendo todas las variables aplicables en función de la variabilidad de los organismos, con la finalidad de optimizar recursos y el tiempo destinado a este tipo de ensayos.

Se sugiere para posteriores estudios realizar un análisis con los primers ITS 3 e ITS 4, con el objetivo de identificar los polimorfismos en la region ITS 2.

Se debe tener en cuenta el acceso a las nuevas tecnologías moleculares y los tipos de software relacionadas a estas, por lo que se sugiere destinar los recursos económicos necesarios para llevar a cabo estos análisis.

Se recomienda realizar futuras investigaciones, tanto en el campo molecular como el bioinformático dentro del país, con el fin de establecer lazos tecnológicos que permitan un análisis adecuado en los diferentes parámetros de estudio.

Referencias

- Agilent technologies, Inc. (2013). *Agilent High Sensitivity DNA*. Recuperado el 08 de Marzo de 2016. Obtenido de http://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/Public/G2938-90321_SensitivityDNA_KG_EN.pdf
- Baldwin, B., Sanderson, M., Porter, J., Wojciechowski, M., Campbell, C., & M., D. (1995). *The ITS Region of Nuclear Ribosomal DNA: A Valuable Source of Evidence on Angiosperm Phylogeny*. Missouri Botanical Garden Press, 249.
- Becerra, V., M., P., Rojo, C., & France, A. (2006). *RAPD e ITS detectan variación molecular en poblaciones chilenas de Beauveria bassiana*. Agricultura Técnica, 115-116.
- Berruecos, L. (2007). *Las bebidas indígenas fermentadas y los patrones de consumo de alcohol de los grupos étnicos*. El Cotidiano, 1-11.
- Boysen, M., Borja, M., del Moral, C., Salazar, O., & Rubio, V. (1996). *Identification at strain level of Rhizoctonia solani AG4 isolates by direct sequence of asymmetric PCR products of the ITS regions*. Curr Genet, 174-175.
- Caelsen, H., Degh, H., & Lloyd, D. (1991). *Effects of alcohols on the respiration and fermentation of aerated suspensions of baker's yeast*. Journal of General Microbiology, 2879.
- Cañizares, J., & Blanca, J. (2015). *Bioinformática. Grado de Biotecnología*. Recuperado el 8 de Marzo de 2016, de Búsqueda de secuencias en base de datos. Obtenido de <http://personales.upv.es/jcanizar/bioinformatica/BLAST.html>

- Carrillo.L., & Audisio.C. (2007). *Manual de microbiología de los alimentos*. Recuperado 03 de Febrero del 2016. Obtenido de <http://www.unsa.edu.ar/biblio/repositorio/malim2007/>
- Carro, D., & Piña, B. (2005). *Identificación de cepas de levadura de interés enológico*. Ciencia y Tecnología , 1-5.
- Chang, G., Ming, H., Lie, H., & Abdul, N. (2012). *Genome secuencie of Pichia kudriavzevii M12, a pontential producer of bioetanol and Phytase*. Eukaryotic Cell, 10.
- Checa, M. (2007). *Polimorfismos genéticos: Importancia y aplicaciones*. Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas, 214.
- De la Torre, F. (2010). *Caracterización cinético molecular de microorganismos en mostos de mezcal. Tamaulipas*. Instituto Politécnico Nacional de Tamaulipas. Departamento de química biológica. (16 de Abril de 2009). *Facultad de Ciencias Exactas y naturales*. Recuperado el 2 de Mrazo de 2016, de Biblioteca Genómica. Obtenido de [http://www.qb.fcen.uba.ar/bm/2009%20\(ir%20a%20materias.qb.fcen.uba.ar\)/TE%D3RICOPR%C1CTICO/Clase%204/Clase%20biblio%20genomica%202009.pdf](http://www.qb.fcen.uba.ar/bm/2009%20(ir%20a%20materias.qb.fcen.uba.ar)/TE%D3RICOPR%C1CTICO/Clase%204/Clase%20biblio%20genomica%202009.pdf)
- DIPA. (2013). *Red de proyectos de investigación Universidades del Ecuador*. Recuperado el 2016, de Dirección de Investigación y Proyectos académicos. Obtenido de <http://redes.dipa-ug.ec/index.php/ups/178-proyectos-en-ejecucion-ups>

- Echenique, V., Selva, J., Meier, M., Roncallo, P., & Schrauf, G. (2010). *Genómica, Biotecnología y mejoramiento vegetal II*. Argentina: ArgenBio.
- Escalante, A., Gosset, G., Martinez, A., & Bolivar, F. (2004). *Diversidad bacteriana del suelo: métodos de estudio no dependientes del cultivo microbiano e implicaciones biotecnológicas*. *Agrociencia*, 583-594.
- Esteve, B., Belloch, C., Uruburu, F., & Querol, A. (1999). *Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 330.
- Fabbro, C., Scalabrin, S., Morgante, M., & Giorgi, F. (2013). *An extensive evaluation of read trimming effects on illumina NGS data analysis*. *Plos One*, 5.
- FERMENTANS Life Sciences. (2010). *Troubleshooting guide for DNA electrophoresis*. Obtenido de http://res.hmu.edu.iq/Portals/0/Users/Bazhdar/DNA_Troubleshooting.pdf
- Fernández, M. (2003). *Caracterización genética y estudio de actividades enzimáticas de levaduras vínicas*. Real, España: Departamento de Química Analítica y Tecnología de Alimentos. Obtenido de <https://ruidera.uclm.es/xmlui/bitstream/handle/10578/914/180%20Caracterizaci%C3%B3n%20gen%C3%A9tica%20y%20estudio%20de%20actividades%20encim%C3%A1ticas%20de%20levaduras%20v%C3%ADnicas.pdf?sequence=1>
- Fleishman, J., & Sripuntanagoon, E. (2011). *Pellicle associated adherence film above incubation broth surface - an inexpensive adjunct to recognizing Candida krusei in the laboratory*. *BMC Research Notes*, 1-3.

- Fujita, S., Senda, Y., Nakaguachi, S., & Hashimoto, T. (2001). *Multiplex PCR using internal transcribed spacer 1 and 2 regions for rapid detection and identification of yeast strains*. *Journal of Clinical Microbiology*, 3619.
- Garcia, J., & Silva, M. (2006). *Técnico especialista en Laboratorio. Volumen II*. Sevilla: MAD.
- Genoma Mayor. (2014). *Secuenciación NGS*. Recuperado el 29 de Enero de 2016. Obtenido de <http://www.genomamayor.com/servicios/secuenciacion-ngs/>
- Guevara, P., Campelo, R., Clark, R., Guariglia, V., Moronta, F., & Rizzolo, K. (2009). *Fundamentos de Genética Molecular: Manual de laboratorio*. Departamento de biología celular., 26-27.
- Guilles, a., Megleesz, E., Pech, N., Ferreira, S., Malausa, T., & Martin, J. (2011). *Accuracy and quality assesment of 454 GSFL Titanium pyrosenquencing*. *BMC Genomics*, 1-2.
- Guzman, G. (1995). *La diversidad de hongos en México*. *Ciencias*, 53,56.
- Herrero, E., & Gallego, C. (1997). *El ciclo celular de las levaduras*. III Simposio científico en biología celular y molecular. España: Universidad de Lleida, 115-116.
- Hidalgo, J. (2011). *Tratado de Enología*. México: Ediciones Mundi-Prensa.
- Hoffner, k., & Barton, P. (2014). *Design of Microbial Consortia for Industrial*. Department of Chemical Engineering, Massachusetts Institute of Technology, 65-74.

- IIBCE. (2010). *Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable*. Recuperado el 5 de Marzo de 2016, de Secuencias repetidas. Obtenido de <http://www.iibce.edu.uy/uas/biomolec/secrepet.htm>
- ILLUMINA ,Inc. (2014). *Find the right Sequencer for your lab*. Recuperado el 10 de Febrero del 2016. Obtenido de www.illumina.com
- INBio. (2014). *Instituto Nacional de Biodiversidad*. Recuperado el 5 de Marzo de 2016, de Hongos de Costa Rica. Obtenido de <http://www.inbio.ac.cr/papers/hongos/intro.htm>
- Izard, J., & Rivera, M. (2015). *Metagenomic for microbiology*. USA: Elsevier.
- Johnson, E., & Echavarri, C. (2011). *Yeast Biotechnology*, The Yeast a taxonomic study USA: Elsevier, 21-25.
- Kendall, M., & Rygiewicz, P. (2005). *Fungal-specific PCR primers developed for analysis of the ITS region of environmental DNA extracts*. BMC Microbiology, 2-4.
- Koolman, J., & Rohm, K. (2003). *Fermentaciones*. En Bioquímica. Madrid: Panamericana, 148-150.
- Kurtzman, P., Fell, J., & Boekhout, T. (2011). *The Yeasts*. Londres: Elsevier.
- Lara, E. (Febrero de 2006). *Aislamiento y caracterización de levaduras antagonistas de hongos fitopatógenos post-cosecha de cítricos*. Centro de Biotecnología Genómica. Reynosa, México: IPN.
- Leveau, J., & Bouix, M. (2000). *Taxonomía*. En J. Leveau, & M. Bouix, Microbiología Industrial. España : Acribia, 10.

- Leveau, J., & Bouix, M. (2000). *Taxonomía*. En J. Leveau, & M. Bouix, Microbiología Industrial. España : Acribia, 5-9.
- Lewin. (1996). *Genes*. España: Reverté.
- Lezcano, E. (2012). *Cadena de la levadura*. Alimentos Argentinos, 1-5.
- Life sequencing. (2008). *Preparación de una librería de ADN*. Obtenido de <http://www.lifesequencing.com/pages/protocolo-de-secuenciacion>
- Linares, M., & Solis, F. (2007). Identificación de levaduras. *Revista iberoamericana de micología*, 1-16.
- Macrogen Inc. (2015). *Humanising Genomics Macrogen*. Recuperado el 6 de Marzo de 2016, de Next Generation Sequencing(NGS). Obtenido de http://www.macrogen.com/eng/business/ngs_service_capabilities_technology.htm
- Madigan, M., Martinko, J., & Parker, J. (1999). *Biología de los Microorganismos*. España: Prentice Hall.
- Mambuscay, L., Lopez, W., Cuervo, R., Argote, F., & Osorio, E. (2013). *Identificación de las levaduras nativas presentes en zumos de piña, mora y uva*. Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial, 139.
- Mateos, P. (2014). *Aislamiento y selección de microorganismos industriales*. España: Universidad de Salamanca.
- Medicina Molecular. (3 de Marzo de 2009). *Técnicas*. Recuperado el 3 de Marzo de 2016, de Pirosecuenciación. Obtenido de http://medmol.es/imprimir_pdf.cfm
- Mendoza, M. (2005). *Importancia de la identificación de levaduras*. Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología, 5-6.

- Meneses, C., & Rozo, L. J. (2011). *Tecnologías bioinformáticas para el análisis de secuencias de ADN*. Scientia et Technica, 118-120.
- Molina, A. (26 de Febrero de 2016). *Técnicas moleculares aplicadas a la Microbiología*. (M. Paredes, & I. Yugsi, Entrevistadores) Quito, Ecuador.
- Musters, W., Boon, K., Van der Sande, C., Heerikhuizen, H., & Planta, R. (1990). *Functional analysis of transcribed spacers of yeast ribosomal DNA*. The Embo Journal, 3990-3992.
- NCBI. (4 de Noviembre de 1988). *Programs & Activities*. Recuperado el 19 de Enero. Obtenido de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/home/about/programs.shtml>
- Ochoa, D., & Montoya, A. (2010). *Consortios microbianos metáfora biológica aplicada a la asociatividad empresarial en cadenas productivas agropecuarias*. Revista Facultad Ciencias Económicas de la Universidad Nacional de Colombia, 6-7.
- Orberá, T. (2004). *Métodos moleculares de identificación de levaduras de interés biotecnológico*. Rev Iberoam Micol, 15-19.
- Palmerin, D., Guevara, R., Villaseñor, F., & Perez, C. (2001). *Identificación de una levadura para producción de una proteína unicelular para consumo humano y determinación de los parametros cinéticos a nivel de matraces agitados*. Ciencia, 38.
- Panaretou, B., & Piper, W. (1990). *Plasma-membrane ATPase action affects several stress tolerances of Saccharomyces cerevisiae and Schizosaccharomyces pombe as well as the extent and duration of the heat shock response*. Journal of General Microbiology, 1769.

- Puerta, G. (2010). *Fundamentos del proceso de fermentación en el beneficio del café*. Cenicafe, 3-5.
- Pratic, P., Rastogi, N., Sharma, S., Kumar, J., & Prasad, B. (2014). *Nematicidal activity of fungal sp. US14 and Aspergillus terreus extracts on C. elegans*. The Worm Breeder'S Gazette, 21-22.
- Rada, T., & Taboada, L. (1998). *Métodos de obtención y purificación de ADN, para su aplicación en Genética Molecular*. Biofarbo, 65.
- Raeder, J., & Broda, P. (2008). *Rapid preparation of DNA from filamentous fungi*. Letters in applied microbiology, 17-20.
- Riquelme, A., & Pinto, M. (2005). *Introducción a la genómica en Vid*. Santiago: Universidad de Chile.
- Rodríguez, E. (2013). *Alineamiento de pares de secuencias*. Cinvestav, 4-21.
- Rodríguez, G. (2014). *Cuantificación de ácidos nucleicos*. Servicio De Genomica Del IIBm (SQP), 1.
- Salas, M. (03 de Diciembre de 2007). *Estudio del proceso de secado de la levadura cervecera*. Oruro, Bolivia: Universidad Técnica de Oruro. Obtenido de <http://postgrado.uto.edu.bo/tesis/facultad-nacional-de-ingenieria/carrera-de-ingenieria-quimica/346-estudio-del-proceso-de-secado-de-la-levadura-cervejera.html>
- Schoch, C., Seifert, K., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J., Levesque, A., Consortium, F. B. (2012). *Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi*. PNAS, 6241-6242.

- Shiroma, S., Niroshan, L., Horie, K., Okamoto, K., & Kitagakia, H. (2014). *Enhancement of ethanol fermentation in Saccharomyces cerevisiae Sake yeast by disrupting mitophagy function*. Applied and Environmental Microbiology, 1002.
- Solomon, E., Berg, L., & Martin, D. (2013). *Biología*. México: Cengage.
- Tamay de Dios, L., Ibarra, C., & Velasquillo, C. (2013). *Fundamentos de la reacción en cadena de la polimeraza (PCR) y de la PCR en tiempo real*. Investigación en Discapacidad, 71-72.
- Thermo SCIENTIFIC. (2015). *Thermo Scientific*. Recuperado el 4 de Marzo de 2016. Obtenido de <http://www.thermoscientific.com/content/tfs/en/product/rapid-yeast-plus-system.html>
- Tomasini., A. (2010). *Los hongos filamentosos, su importancia de estudio y aplicación industrial*.
- Universidad Autónoma de Madrid. (2005). *Técnicas Moleculares*. Recuperado el 29 de Enero de 2016, de Técnicas moleculares técnicas moleculares aplicadas a la ecología microbiana. Obtenido de https://www.uam.es/personal_pdi/ciencias/alarchil/MASTER%20ECO/pPRESENTACIONES%20pdf/Tecnicas_moleculares.pdf
- Universidad Autónoma de Madrid. (2009). *Bases de datos de interés en bioquímica*. Recuperado el 20 de Enero de 2015. Obtenido de <http://www.uam.es/departamentos/ciencias/quimica/estruct/alcami/herramientas/guiones/guion-bio.pdf>

Uribe, L. (2007). *Caracterización Fisiológica de levaduras aisladas de la filósfera de mora*. Bogotá, Colombia: Universidad Javeriana.

Verdugo, A. (2007). *Dinámica de levaduras mediante técnicas microbiológicas y moleculares*. Lacandonta, 30.

YoBrew. (2014). *Brewing magazine*. Recuperado el 4 de Marzo de 2016, de Alcoholic fermentation by yeast cells. Obtenido de <http://www.yobrew.co.uk/fermentation.php>

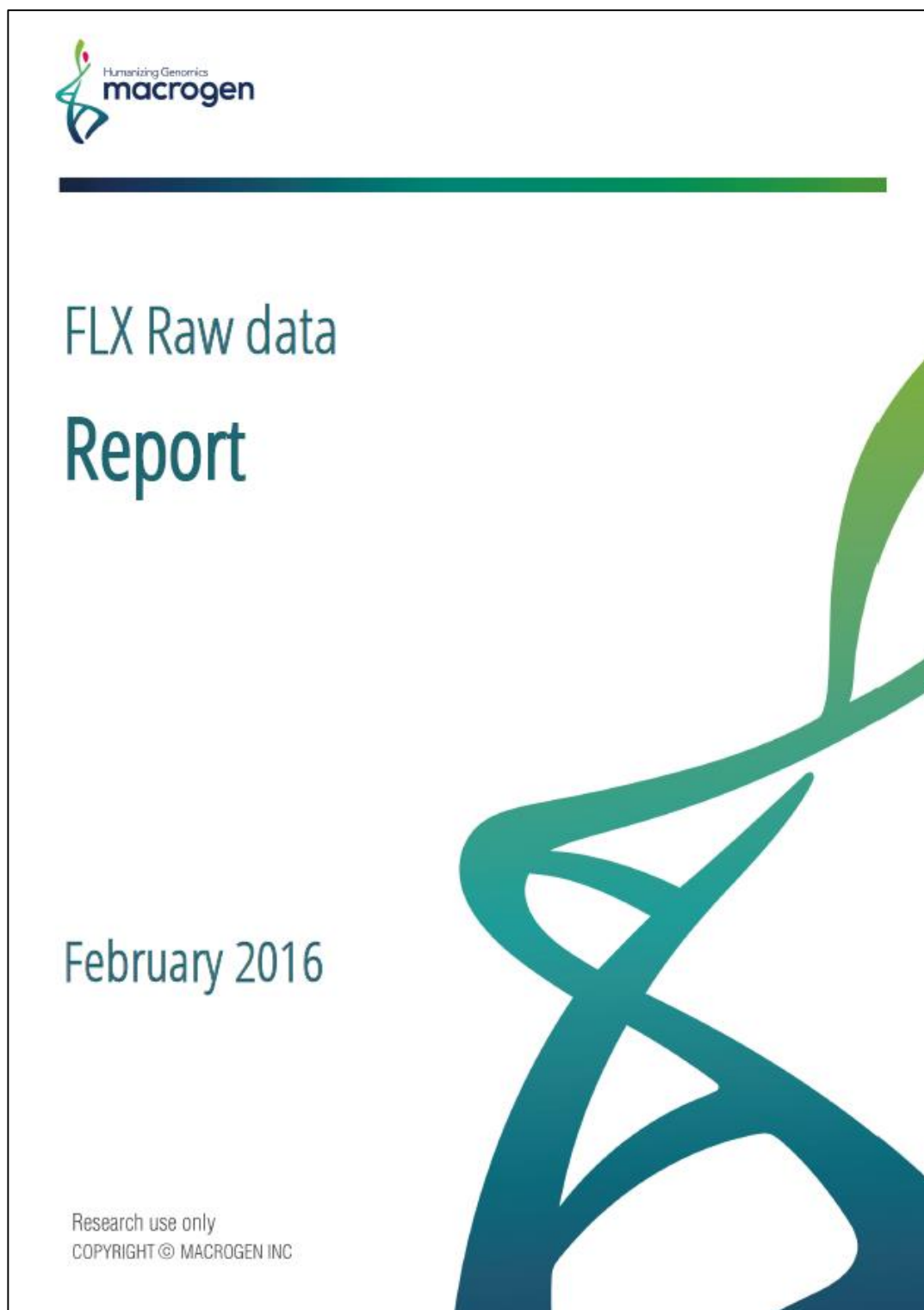
Anexos

Anexo 1. Composición para 10 ml de la solución amortiguadora de extracción.

0.5% de SDS (Dodecilsulfatosódico)	0.05g
200 mM de Tris HCl pH 8.5	2ml
250 mM de NaCl	2.5 ml
25 mM de EDTA	250 ul
Agua libre de RNAsa	c.s.p 10 ml

Elaborado por M. Paredes & I. Yugsi, 2016.

Anexo 2. Reporte FLX Raw Data NGS metagenómica. Reporte disponible en :
http://lims.macrogen.com/NGS_DATA/1602/2016_02_04_FernandaParedes_9Samples.pdf





NGS Library QC

General Information

Order Number	1512KJT-0020	Name of Customer	Friends Period	Date of Order	2015-12-29
--------------	--------------	------------------	----------------	---------------	------------

Final QC Result of DNA sample(s)					
Arrival Date	Experiment Date	Sample count	Pass	Fail	Hold
2015-12-29	2016-01-15 16:14	2	2	0	0

Final QC Result of RNA sample(s)					
Arrival Date	Experiment Date	Sample count	Pass	Fail	Hold
N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A

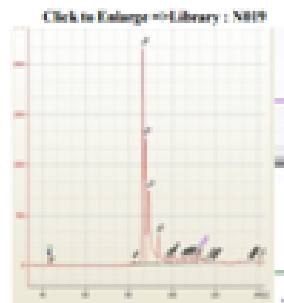
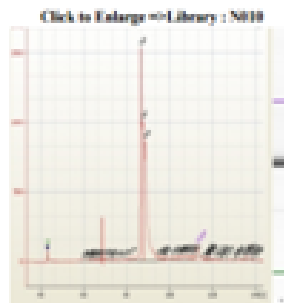
- Pass** : Passed with the library construction.
 - Fail** : Further processes are on hold until the replacement samples received.
We do not recommend to proceeding further steps until a specific instruction was given from the client.
 - Hold** : A specific instruction should be given by the client for further processing as the QC pattern may be triggered by the sample nature.
Macrogen does not proceed the next step until we have received your permission.
- As 1ul was taken from the sample for sample library QC purposes, the indicated volume represents 1ul less than the total volume received.*

Library QC Result of DNA

Arrival Date	2015-12-29	Experiment Date	2016-01-15 16:14	Tested by	
Comment					

#	Library Name	Library Type	Conc. (molecules/ul)	Size (bp)	Result*
1	N810	Amplicon library(Lib-L)	1.34 X 10 ⁸ * 11	500	Pass
2	N819	Amplicon library(Lib-L)	1.53 X 10 ⁸ * 11	500	Pass

Experiment Condition	Bioscience DNA High Sensitivity chip
----------------------	--------------------------------------



3. 1. 2. Total Read per Sample



Figure 5. Total Read per Sample

3. 1. 3. Average read length per Sample



Figure 6. Average read length per Sample

4. Data Download Information

4. 1. Raw Data

Download link	File size	MD5SUM
Region 1 (9Samples)	241.4M	e553e5c69da65334715d5b7dbfabb63

4. 2. Analysis results

Download link	File size	MD5SUM
Analysis results	24.2M	7eb0bc709651b6664b1392955c788093

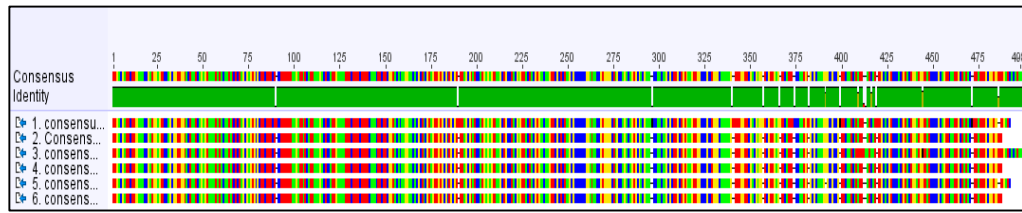
- [Analysis Report Handbook\(In Korean\)](#)
- [Analysis Report Handbook\(In English\)](#)

Anexo 3. Ejemplo de agrupación de secuencias de trabajo para muestra N010 y N019 y posterior análisis.

Name ▲	Description
101-150	50 nucleotide sequences
151-200	50 nucleotide sequences
201-250	50 nucleotide sequences
201-250	50 nucleotide sequences
251-300	50 nucleotide sequences
301-350	50 nucleotide sequences
351-400	50 nucleotide sequences
401-450	50 nucleotide sequences
451-500	50 nucleotide sequences
501-550	50 nucleotide sequences
551-600	50 nucleotide sequences
601-650	50 nucleotide sequences
651-700	50 nucleotide sequences
701-750	50 nucleotide sequences
751-800	50 nucleotide sequences
801-850	50 nucleotide sequences
851-900	50 nucleotide sequences
901-950	50 nucleotide sequences
951-1000	50 nucleotide sequences
1001-1050	50 nucleotide sequences
1051-1100	50 nucleotide sequences
1101-1150	50 nucleotide sequences
1151-1200	50 nucleotide sequences
1251-1300	50 nucleotide sequences
1301-1350	50 nucleotide sequences
1351-1400	50 nucleotide sequences
1401-1450	50 nucleotide sequences
1451-1500	50 nucleotide sequences
1501-1550	50 nucleotide sequences
1551-1600	50 nucleotide sequences
1601-1650	50 nucleotide sequences
1651-1700	50 nucleotide sequences
1701-1750	50 nucleotide sequences
1751-1800	50 nucleotide sequences
1800-1850	50 nucleotide sequences
1851-1900	50 nucleotide sequences
1901-1950	50 nucleotide sequences
1951-2000	50 nucleotide sequences

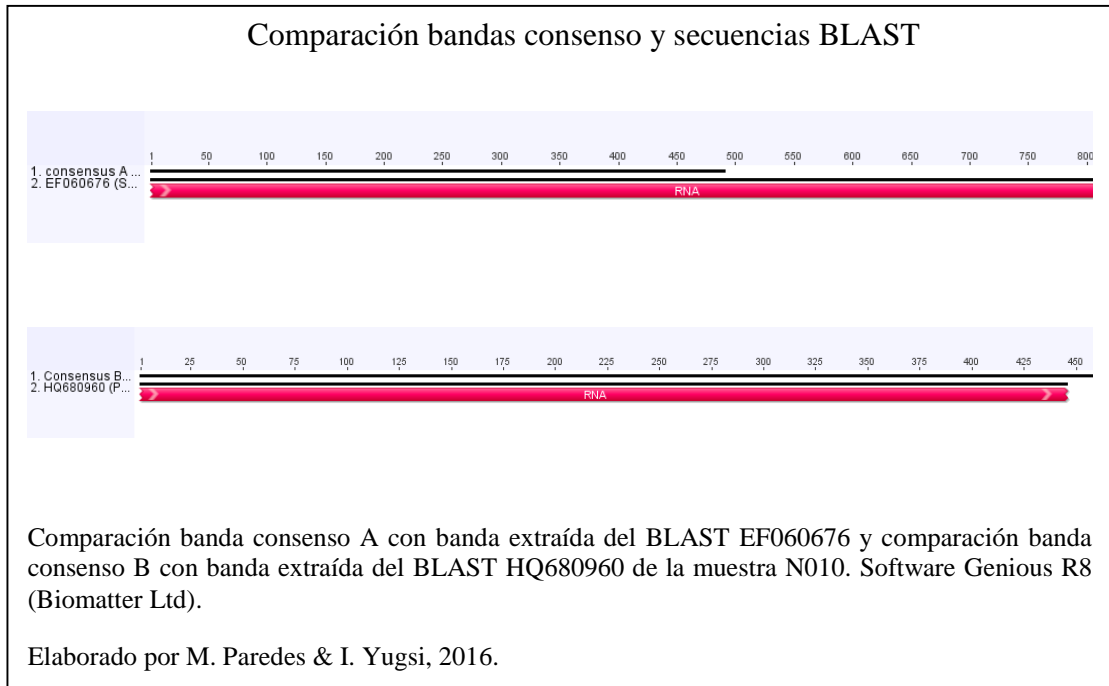
Elaborado por M.Paredes & I.Yugsi, 2016, por medio del software Genius R8 (Biomatter Ltd)

Anexo 4. Alineamiento de bandas consenso de nucleótidos por grupo de la muestra N010.



Elaborado por M. Paredes & I. Yugsi, 2016 por medio del software Genious R8 (Biomatter Ltd).

Anexo 5. Comparación bandas consenso y secuencias BLAST de los consorcios N010/3/D.



Anexo 6. Comparación bandas consenso y secuencias BLAST de los consorcios N019/3/D.

