



CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE
YUCATÁN A.C.

Posgrado en Ciencias en Energía Renovable

AISLAMIENTO DE LA MICROBIOTA DEL FRUTO DE
Brosimum alicastrum SWARTZ PARA SU USO EN LA
PRODUCCIÓN DE BIOETANOL

Tesis que presenta:

L. B. EMY GUADALUPE HUCHIN POOT

En opción al título de

MAESTRO EN CIENCIAS EN ENERGÍA RENOVABLE

Mérida, Yucatán, México

Diciembre de 2015

AGRADECIMIENTOS

A Dios por haberme dado la vida, sabiduría, fortaleza y paciencia; principalmente por mi familia que siempre me ha apoyado, por haber puesto en mi camino a amigos, compañeros y personas que me han brindado su apoyo, conocimiento y sobre todo su amistad, y la oportunidad de alcanzar una meta más en mi vida, por no haber soltado mi mano en los momentos más difíciles y por darle solución a los problemas que se me presentaron en este recorrido.

Al Centro de Investigación Científica de Yucatán A. C., por brindarme las facilidades para la realización de la tesis.

Al CONACYT, por la beca de manutención otorgada con el número de apoyo 369147, para la realización de este trabajo.

A la Unidad de Energía Renovable por haberme brindado los conocimientos necesarios para mi formación profesional y por el apoyo para realizar parte del trabajo experimental de la tesis.

A la Dra. Daisy Pérez Brito por la asesoría, apoyo, comentarios, sugerencias y observaciones para la realización de la tesis.

Al Dr. Raúl Tapia Tussell, por su co-asesoría en la elaboración de este trabajo, su apoyo, ayuda y comentarios para el desarrollo de este trabajo.

Al Dr. Alfonso Larqué Saavedra, por su apoyo, comentarios, observaciones acerca del trabajo y en la revisión de este documento.

A la Dra. Patricia Lappe Oliveras, por la ayuda, comentarios, consejos, revisión y facilidades brindadas para la realización de este trabajo.

Al Dr. Felipe Barahona Pérez por sus comentarios, tiempo y observaciones realizados al documento de este trabajo.

A la Dra. Sara Solís Pereira, por su tiempo, comentarios, observaciones en la revisión del documento de tesis.

Al Laboratorio de Micología, del Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), por las instalaciones, equipo y apoyo brindado que fueron fundamentales para poder culminar la estrategia experimental de la tesis.

Al Laboratorio GeMBio por proporcionarme las instalaciones y equipo necesario para la realización del trabajo de tesis, por formar parte de sus estudiantes y por sus conocimientos y apoyo brindado.

Al M.C. Andrés Quijano Ramayo por su valiosa ayuda y asesoría en la identificación de las bacterias aisladas en este trabajo y por sus comentarios en temas relacionados.

A los Ingenieros Ángel y Rodolfo, por su apoyo, amistad y consejos brindados en todo momento, principalmente en los momentos más difíciles, durante mi estancia en el laboratorio, que sin duda fueron de suma importancia para mi formación profesional y personal.

A mis compañeros de generación Rubí, Paty, Edgar, Marco, Silvano, Giovanni, Samantha y Harvey, por su amistad, consejos y ánimos durante estos años de formación.

A Rubí Chable y Edgar Olguín, quienes me han apoyado en todo momento, por su amistad, comentarios, ánimos brindados en esta etapa de mi vida.

A mis amigos y compañeros de laboratorio Abril, Alberto, Erik, Rubí, Jaqueline, Edgar, Gamaliel, Sandy, Nahum, Héctor, Erick, Isabel, Teresita, Anuar, Alberto, por su amistad,

consejos, su confianza, conocimientos compartidos, apoyo en todo momento y por el ambiente de trabajo creado.

A mi novio, que desde que lo conocí siempre me ha apoyado incondicionalmente, por su amor, cariño, paciencia, comprensión y por sus consejos en los momentos más difíciles, dándome ánimos para seguir adelante.

En general, muchas gracias a todos y a cada uno, por su tiempo, amistad, confianza, consejos, comentarios, por esos momentos inolvidables y por lo que cada uno aportó para mi formación personal, profesional y para concluir este trabajo.....Muchas gracias.....

DEDICATORIA

A mi familia, principalmente a mis padres, Gustavo y Emiliana, que son mi motor, que a pesar de todas las circunstancias han estado conmigo, dándome consejos, cariño, amor, comprensión y porque con su ejemplo me han enseñado a luchar y demostrarme que a pesar de cualquier adversidad se puede seguir adelante.

ÍNDICE

LISTADO DE FIGURAS.....	viii
LISTADO DE TABLAS	x
RESUMEN.....	2
ABSTRACT	3
INTRODUCCIÓN.....	4
CAPÍTULO I.....	6
1. ANTECEDENTES	6
1.1. Origen y distribución del ramón	6
1.2. Taxonomía	8
1.3. Biología de la planta	8
1.3.1. Forma	8
1.3.2. Hojas.....	8
1.3.3. Flores.....	9
1.3.4. Frutos.....	9
1.3.5. Semillas	9
1.4. Fenología del ramón	9
1.5. Clima, topografía y suelos	10
1.6. Usos generales	10
1.7. Importancia del cultivo del ramón	11
1.7.1. Importancia de la semilla del ramón	11
1.8. Almidón	11
1.8.1. Estructura del almidón	12
1.8.2. Amilasas	13
1.9. Aplicación de microorganismos en la industria.....	14
1.9.1. Microorganismos amilolíticos	14
1.10. Identificación morfológica de microorganismos	15
1.11. Identificación molecular de microorganismos.....	16
1.12. Justificación	18

1.13. Hipótesis	19
1.14. Objetivo general.....	20
1.14.1. Objetivos específicos.....	20
CAPITULO II.....	21
MATERIALES Y METODOS.....	21
2.1. Estrategia experimental.....	21
2.2. Colecta de material	21
2.3. Aislamiento y purificación de la microbiota.....	21
2.4. Identificación y caracterización	23
2.4.1. Identificación morfológica de hongos filamentosos	23
2.4.2. Caracterización morfo-fisiológica de levaduras.....	23
2.4.3. Caracterización morfo-fisiológica de bacterias.....	24
2.4.3.1 Tinción de Gram.....	24
2.4.3.2 Producción de pigmentos en medio KB	25
2.4.3.3. Coloración de las colonias (YDC).....	25
2.4.3.4. Hidrólisis de ureasa	25
2.4.3.5. Prueba de oxidasa	25
2.4.3.6 Metabolismo oxidativo y/o fermentativo de la glucosa (Hugh-Leifson)	25
2.4.3.7 Crecimiento a 30 y 40 °C	26
2.5. Hidrólisis de almidón.....	26
2.6. Identificación molecular	27
2.6.1. Aislamiento de ADN.....	27
2.6.2. Calidad, integridad y cuantificación del ADN	28
2.6.3. Amplificación de las regiones génicas	28
2.6.3.1. Amplificación de la región ITS-5.8S para identificación de hongos filamentosos.....	28
2.6.3.2. Amplificación del dominio D1/D2 de la subunidad larga del gen 26S ADNr para la identificación de levaduras	29
2.6.3.3. Amplificación de gen 16S del ADNr para identificación de bacterias.....	30
2.6.4. Secuenciación.....	31

CAPÍTULO III	32
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	32
3.1. Aislamiento y purificación.....	32
3.2. Identificación de hongos filamentosos	33
3.3. Identificación de bacterias	37
3.4. Identificación de levaduras	45
3.3. Hidrólisis de almidón.....	56
CONCLUSIONES	61
BIBLIOGRAFÍA	62
ANEXOS	74

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1. Distribución geográfica del ramón en México.	6
Figura 2. Distribución del ramón en la Península de Yucatán.	7
Figura 3. Estructura de la molécula de amilosa.	13
Figura 4. Estructura de la molécula de la amilopectina.	13
Figura 5. Estrategia experimental realizada para este estudio.	21
Figura 6. Separación de los tejidos: a) fruto; b) pericarpio; c) testa; d) semilla.	22
Figura 7. Representación esquemática de la región ITS-5.8S utilizada para la identificación de hongos.	29
Figura 8. Representación esquemática del dominio D1/D2 en la subunidad grande del gen ribosomal 26S.	30
Figura 9. Representación esquemática del gen 16S ribosomal.	30
Figura 10. Cantidad de microorganismos aislados en las dos colectas realizadas en los municipios de Mérida, Yucatán y Hopelchén, Campeche.	33
Figura 11. a) Colonias de los aislados de hongos obtenidos del fruto de ramón en medio PDA y b) estructura reproductiva de los géneros. 1 a y b) <i>P. citrinum</i> , 2 a y b) <i>Penicillium</i> sp., 3 a y b) <i>I. fumosorosea</i> , 4 a y b) <i>A. niger</i> , 5 a y b) <i>A. flavus</i> , 6 a y b) <i>A. niger</i> , 7 a y b) <i>A. ustus</i> , 8 a y b) <i>A. oryzae</i> .	35
Figura 12. Producto de la amplificación de la región ITS-5.8S del ADNr en hongos filamentosos.	36
Figura 13. Producto de la amplificación del gen 16S de los aislados de bacterias	42
Figura 14. Colonias de los aislados de levaduras obtenidas del fruto de en medio WL agar nutritivo por 4 días.	45
Figura 15. Producto de amplificación del dominio D1/D2 del gen 26S del ADNr de los aislados de levaduras.	51
Figura 16. Placas de medio extracto de levadura-agar-almidón inoculadas con los hongos aislados y adicionadas con lugol para detectar la actividad amilasa.	58
Figura 17. Aislamientos de <i>C. citrium</i> con reacción positiva a la prueba de lugol.	59

Figura 18. Asimilación de almidón en medio líquido por diferentes especies de levaduras.

60

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1. Contenido de macronutrientes de las semillas de ramón.	11
Tabla 2. Aislados de hongos filamentosos obtenidos del fruto del ramón.	34
Tabla 3. Identificación molecular de cada uno de aislados de hongos mediante comparación de su secuencia (ITS-5.8S) con las existentes en la base de datos del GenBank.	37
Tabla 4. Aislados de bacterias obtenidas del ramón.	38
Tabla 5. Identificación de los aislados de bacterias del municipio de Mérida mediante pruebas bioquímicas.	40
Tabla 6. Identificación de los aislados de bacterias del municipio de Hopelchén mediante pruebas bioquímicas.	41
Tabla 7. Especies identificadas del municipio de Mérida por comparación de sus secuencias (16S ADNr) con las existentes e la base de datos GenBank.	43
Tabla 8. Especies identificadas del municipio de Hopelchén por comparación de sus secuencias (16S ADNr) con las existentes e la base de datos GenBank.	44
Tabla 9. Aislados de levaduras obtenidos del fruto de ramon en los muestreos realizados en los municipios de Mérida, Yucatán y Hopelchén, Campeche.	46
Tabla 10. Resultados de las pruebas fisiologicas y bioquimicas realizadas a los aislados de levaduras obtenidos de frutos de ramón del municipio de Mérida.	47
Tabla 11. Resultados de las pruebas fisiologicas y bioquimicas realizadas a los aislados de levaduras obtenidos de frutos de ramón del municipio de Hopelchén, Campeche	49
Tabla 12. Identificacion de los aislados de levaduras colectados en Mérida, Yucatán por comparacion de sus secuencias del dominio D1/D2 del gen 26S del ADNr con la base de datos del GenBank.	52
Tabla 13. Identificacion de los aislados levaduras colectados en Holpechén, Campeche, por comparacion de sus secuencias del dominio D1/D2 del gen 26S del ADNr con la base de datos del GenBank.	53
Tabla 14. Especies de levaduras y numero de aislados obtenidos a partir de frutos de ramón colectados en los municipios de Mérida, Yucatán y Hopelchén, Campeche.	54

Tabla 15. Resultados de la tolerancia a etanol de los aislados de levaduras colectados en Mérida, Yucatán.	55
Tabla 16. Resultados de la tolerancia a etanol de los aislados de levaduras colectados en Hopelchén, Campeche.	56
Tabla 17. Especies de hongos filamentosos y bacterias con capacidad amilolítica.	57

RESUMEN

El ramón (*Brosimum allicastrum* Swartz) es un árbol nativo de América tropical, que ha mostrado su enorme potencial para distintos usos biotecnológicos. Dado el alto contenido de almidón de sus semillas, se ha considerado la producción de bioetanol a partir de estas. Para ello se requiere el uso de enzimas, como la α -amilasa, capaces de hidrolizar el almidón en azúcares simples fermentables. Estas enzimas son producidas por microorganismos como hongos y bacterias. Por lo que el objetivo de este trabajo fue aislar, identificar y caracterizar la microbiota presente en el fruto del ramón. Las identificaciones se hicieron mediante pruebas morfo-fisiológicas y moleculares y se evaluó la capacidad amilolítica de los microorganismos encontrados. Se obtuvieron en total 69 cepas, de las cuales 43 fueron hongos (35 levaduras y 8 filamentosos) y el resto fueron bacterias. Además, 13 cepas fueron positivas para la asimilación de almidón, seis especies de hongos filamentosos pertenecientes a los géneros *Aspergillus* (5 especies) y dos cepas de *Penicillium citrinum*, 4 especies de levaduras: *Candida tropicalis*, *Pichia kudriavzevi*, *Meyerozyma guilliermondii* y *Hanseniaspora guilliermondii* y dos aislamientos de la bacteria *Curtubacterium citrium*. Las cepas de *Aspergillus niger* y *Candida tropicalis* fueron los que presentaron mayor actividad amilolítica y fermentativa. Por lo que estos microorganismos son prometedores para futuros estudios de la obtención de bioetanol a partir de harina de ramón.

ABSTRACT

Brosimum allicastrum Swartz (bread nut) is a native tree from tropical America which had shown a good potential for different biotechnological uses. For the high starch content of its seeds, these had been considered for bioethanol production using enzymes as the α -amylase which is able to hydrolyze starch into simple fermentable sugars. These enzymes are produced by microorganisms as fungi and bacteria, so the objective of this work was the isolation, identification and characterization of the microbiota existing in the fruit of *B. allicastrum*. Identification were made by means of morpho-physiological and molecular tests, and it was evaluated the amilolytic capacity of the found microorganisms. It was obtained a total of 69 strains, form which, 43 were fungi, (35 yeast and 8 filamentous) and the rest consisted in bacteria. Besides, 13 strains showed to be positive for starch assimilation, six species of filamentous fungi from genera *Aspergillus* (5 species) and two isolates of *Penicillium citrinum*, four yeast species: *Candida tropicalis*, *Pichia kudriavzevi*, *Meyerozyma guilliermondii* and *Hanseniaspora guilliermondii*, and two isolates from the bacteria *Curtubacterium citrium*. Strains of *A. niger* were which presented the higher amilolytic and fermentative activity. These microorganisms could be useful for future studies on bioethanol production from bread nut flour.

INTRODUCCIÓN

La generación de energía depende en gran parte del uso de combustibles fósiles (carbón, petróleo y gas natural). Debido al incremento en la dependencia de estos combustibles, a su alto valor económico, a su agotamiento y a los problemas ambientales ocasionados por su uso excesivo, como las emisiones de gases de efecto invernadero (GEI), primordialmente el CO₂, que es uno de los principales gases de la combustión fósil, es que se están buscando nuevas fuentes de energía con base en materias primas renovables y amigables con el ambiente, para mitigar los efectos negativos ocasionados en el mismo por el uso de los combustibles fósiles [1, 2, 3].

Las energías renovables son consideradas como primarias, limpias, de bajo riesgo e inagotables, se distribuyen en amplias zonas, por lo que están disponibles en forma continua y se clasifican de acuerdo a los recursos naturales que se utilizan para generarlas: tal es el caso de las energías solar, eólica, hidráulica, geotérmica y bioenergía. El uso de estas energías contribuye a la conservación de las fuentes no renovables, a la disminución del consumo de combustibles fósiles y consecuentemente a la disminución de las emisiones de gases de efecto invernadero [4, 5, 6].

Actualmente a la bioenergía se le está dando una importancia considerable, debido a que se deriva de la conversión de biomasa (madera y sus residuos, residuos agrícolas y subproductos), que es utilizada directamente como combustible o transformada para la producción de gases o biocombustibles para diversos usos. La biomasa utilizada para la producción de bioetanol, debe contener una gran cantidad de azúcares simples, almidón o compuestos lignocelulósicos [5, 7, 8, 9].

El ramón (*Brosimum alicastrum* Swartz) es un árbol nativo de América tropical, dominante en las selvas de Centroamérica y tiene una amplia distribución en Yucatán, donde forma aparte de la selva baja subcaducifolia. Las investigaciones antropológicas señalan que fue cultivado intensamente por los mayas para diversos fines, como la alimentación y la

medicina tradicional [10, 11]. Este árbol posee semillas con un alto contenido de carbohidratos (76%) del cual el 61% es almidón [12]. Este carbohidrato es el principal compuesto de almacenamiento de las plantas. La cantidad de almidón presente en las semillas de ramón, es semejante a la contenida en otras materias primas empleadas para la producción de bioetanol como el maíz (72%) y la yuca (31%) entre otras [8], por lo que las semillas de ramón podrían ser utilizadas para la producción de bioetanol. Sin embargo, para la producción de bioetanol con base en una materia prima rica en almidón, se necesitan enzimas (amilosa y amilopectina) que puedan hidrolizarlo en azúcares simples fermentables. Por lo general dichas enzimas son producidas por diversos microorganismos, por lo que, en el presente trabajo se pretende obtener microorganismos con capacidad amilolítica aislados del fruto del ramón y evaluar su posible uso en la producción de bioetanol a partir de almidón contenido en la semilla de esta planta.

CAPÍTULO I

1. ANTECEDENTES

1.1. Origen y distribución del ramón

El ramón (*Brosimum alicastrum* Swartz) es un árbol nativo de América tropical y uno de los árboles dominantes de las selvas de México y Centroamérica. Se encuentra en México, Guatemala, Belice, Nicaragua, Colombia, Perú, Venezuela y al Oeste de India [10, 13]. Los hábitats de esta planta son bosques perennifolios húmedos y lluviosos. [10, 14, 15], selvas medianas subperennifolias, media subcaducifolia, alta perennifolia y alta subcaducifolia y palmar [16].

En México, el ramón se puede encontrar entre los 50 a 80 msnm y se distribuye desde Sinaloa a Chiapas en las costas del Pacífico, y de Tamaulipas hasta Quintana Roo, por las costas del Golfo de México y el Caribe; así como en la cuenca del río Balsas: que comprende los estados desde Michoacán hasta Morelos (Figura 1) [10, 17].

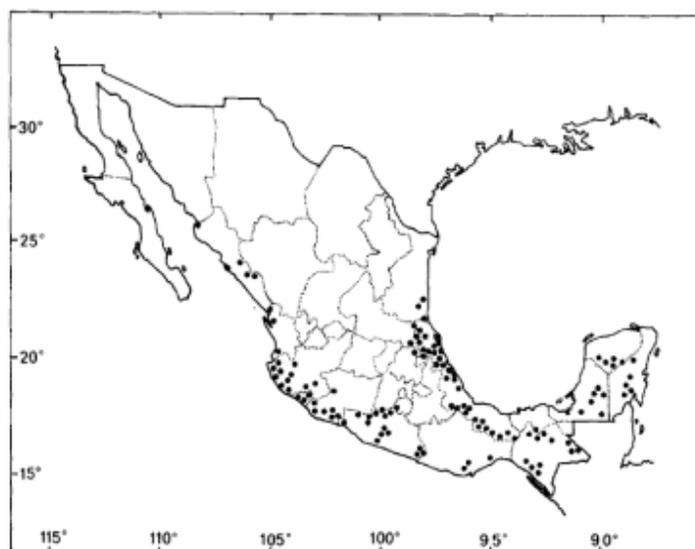


Figura 1. Distribución geográfica del ramón en México [18].

En el estado de Yucatán, este árbol habita en la parte central, sur y oriente (Figura 2) [19, 11], ya que forma parte de la comunidad vegetal de las selvas baja mediana subcaducifolias. No obstante, es posible observar ejemplares en casi todo el territorio del estado, ya que constituye una parte importante de los huertos familiares en comunidades rurales, y es muy aceptado como árbol de ornato en parques, jardines y áreas verdes en las ciudades, por su follaje perenne [11, 19, 20]. Debido a que permanece verde en la estación seca y al valor nutricional del follaje (pudiendo presentar entre un 8 y 30% de proteína cruda) es considerado como alimento para animales domésticos principalmente vacuno y caprino.

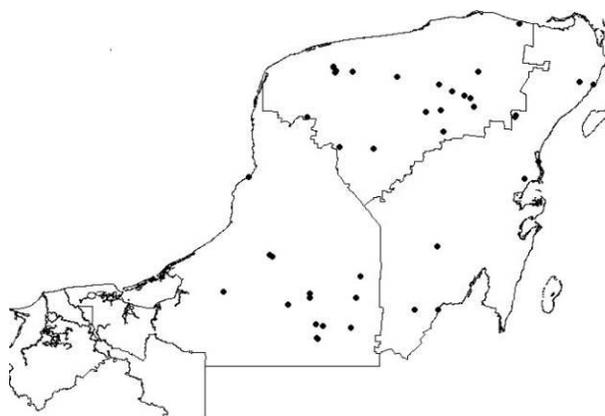


Figura 2. Distribución del ramón en la Península de Yucatán [18].

Al ramón, recibe, según la región, diversos nombres comunes como: ox, a-agl, jash, oxotzin, ramón blanco, ramón colorado, ramón de naranjillo, mojo, moju, osh, oxo, ramón de hoja ancha, capomo, ash, axltab, ojito, ojoche, juksapuo, jushapu, capacho, hairi, hairite, huje, jauri, samaritan, samaritano, tlatlacotic, nazareno, lan-fe-la, mojote, ojosh, oshte, oxitle, ramón de mico, tanumi-tajan, uji, oxotzzin, apomo [13].

1.2. Taxonomía

Según el Instituto Nacional de Biodiversidad [21] la clasificación botánica del ramón es la siguiente:

Reino Plantae

División Magnoliophyta

Clase Magnoliopsida

Orden Urticales

Familia Moraceae

Género *Brosimum*

Especie *Brosimum alicastrum* Sw

1.3. Biología de la planta

1.3.1. Forma

Árbol silvestre, ornamental, siempre verde, generalmente dioico que puede alcanzar alturas hasta de 30 a 45 m y tallos de 1.5 m de diámetro, copa redondeada, piramidal y densa, follaje verde oscuro y denso, con ramas ascendentes; fuste recto, cilíndrico, su corteza externa es lisa en árboles jóvenes y escamosa en árboles adultos, delgada y clara [22, 23], con tonos amarillentos, lenticelas redondeadas o más largas que anchas. La corteza interna es de color crema amarillento, fibrosa a granular con abundante exudado lechoso, ligeramente dulce y pegajoso [24, 23]. Posee de 6 a 10 contrafuertes de 1.5 a 4 m de alto, redondeados a ligeramente tubulares, aplanados [13]. Este árbol tiene una gran variabilidad en cuanto a la altura, el diámetro del tronco, fecha de floración, tamaño y apariencia de las semillas, hojas y corteza [13, 25].

1.3.2. Hojas

Las hojas tienen láminas de 7 a 14 cm de largo, son alternas y simples. Su consistencia es coriácea, de forma ovalada a oblonga, aunque pueden ser lanceoladas, con margen entero. El color es verde oscuro en el haz, y verde grisáceo blanquecino en el envés, debido a la

presencia de numerosas escamas blancas entre el tejido de las nervaduras. Son glabras en ambas superficies, con una nervadura submarginal a lo largo de los bordes, ápice agudo acuminado, especialmente en las hojas jóvenes, la base es obtusa, aguda o truncada. El pecíolo es corto, grueso, de 0.5 cm de largo, con estípulas puntiagudas, al caer, deja una cicatriz que no rodea todo el tallo [15, 18, 26]. En las axilas de cada pecíolo hay una yema florífera [26].

1.3.3. Flores

Las inflorescencias son globosas y se forman en cabezuelas axilares de 1 cm de diámetro. Tienen pedúnculos de 1-5 mm de largo, glabros [26]. El ramón es un árbol monoico, con flores hermafroditas, y dioicos solo con flores femeninas. Las flores se producen en pares por cada axila y en ocasiones de tres a varias flores por axila [27].

1.3.4. Frutos

Los frutos son drupas de sabor y olor dulce, casi redondas, de color verde amarillento a anaranjado en completa madurez, que se originan en las axilas de las hojas. Su diámetro varía de 2 a 3 cm. Constan de pericarpio y mesocarpio un poco carnosos, y presentan numerosas escamas blancas en la superficie de la cubierta. Apenas cae el fruto al suelo, se pudre y aparece una semilla [18, 26, 28, 19].

1.3.5. Semillas

Las semillas son esféricas y aplanadas en ambos extremos, llegando a medir hasta 13 mm de largo y 20 mm de ancho, están cubiertas por una testa papirácea amarillenta, los cotiledones están uno sobre el otro, son verdes, gruesos y feculentos. La semilla fresca tiene 45 a 55% de humedad [23, 19]. Su capacidad germinativa es de 84 a 97.7%, el periodo de germinación varía entre 8 hasta 24 días [29, 23].

1.4. Fenología del ramón

Según Berg [23], se le considera como un árbol perennifolio sin embargo también se le considera como caducifolio, la floración se da principalmente entre los meses de octubre a

febrero. La maduración de los frutos se lleva a cabo en los meses de marzo y mayo. Cuando los árboles se reproducen sexualmente (semillas) fructifican a los 5 años y cuando se reproducen asexualmente (estacas) en menos de 5 años. En el caso de la polinización se considera anemófila. Sin embargo en el estudio realizado por Huchin [27] el ramón en la Península de Yucatán florece casi todo el año, la fructificación se da entre marzo y septiembre, también menciona que el desarrollo de los frutos dura aproximadamente 91 días hasta la maduración y observó la presencia de abejas y avispas en la etapa de floración.

1.5. Clima, topografía y suelos

El ramón se encuentra en áreas muy húmedas de la zona tropical y subtropical, en sitios con un nivel de precipitación anual de 600 a 4000 mm y temperatura media anual de 18 a 25°C. Resiste la fuerza de los vientos tanto de huracanes fuertes como de vientos septentrionales fríos y a veces húmedos [25, 30, 31].

En la Península de Yucatán, la especie crece en suelos de tipo redzina, cuyos nombres locales son tzekel, kancab y bosh luum, en los cuales, el agua es el factor que determina el tipo de vegetación presente [32].

1.6. Usos generales

Desde el tiempo de los antiguos mayas hasta la actualidad todas las partes del ramón (frutos, semillas o “nuez”, madera, hoja y látex) han sido utilizadas con diversos fines. La semilla en particular, es ampliamente reconocida por su valor nutritivo y es utilizada como suplemento alimenticio y como sustituto de la papa, castañas y café. Además junto con el latex se han utilizado en la medicina popular. Con el fruto se preparan mermeladas y las hojas son usadas como alimento para animales [10, 15, 33].

Además el árbol es utilizado como cercas vivas, cortinas rompevientos, como sombra para el cultivo del café; y la madera se puede utilizar como combustible (leña), mangos de herramientas y muebles para el hogar [15, 28].

1.7. Importancia del cultivo del ramón

El ramón protege el suelo, los cuerpos de agua y la biodiversidad, también es una especie promisoría para la restauración ecológica. Por sus características fisiológicas se pueden establecer en selvas secundarias, donde las condiciones lumínicas son bajas, por lo que su crecimiento es lento. Constituye parte del dosel de la selva, en donde bajo el fuste de los arboles masculinos existe una diversidad de plantas, lo cual favorece la regeneración y coexistencia de otras especies, en el caso de los árboles femeninos se encuentra baja diversidad de plantas, esto debido a que predominan las plantas de esta especie [18]. También es importante en la composición florística de las selvas bajas y medianas ya que las hojas y frutos son alimentos para animales silvestres [15, 19, 34].

1.7.1. Importancia de la semilla del ramón

A pesar de sus múltiples propiedades, actualmente de este árbol solamente se aprovecha el follaje como alimento para animales de corral, desperdiciando los frutos y las semillas que contienen gran cantidad de carbohidratos como se observa en la tabla 1.

Tabla 1. Contenido de macronutrientes de las semillas de ramón.

Proteína (g) ⁺	Carbohidratos (g) ⁺	Fibra cruda (g) ⁺	Lípidos (g) ⁺	Energía (Kcal) ⁺⁺	% de humedad	Fuente
12.8	---	4.6	---	361	40-50	[11]
11.4	76.10	6.2	1.60	363	6.5	[35]
4.96	72.25	4.96	1.10	347.86	5.88	[12]
1.76	11.37	1.7	0.77	59	---	[36]

⁺g por 100 g de muestra

⁺⁺ Kcal por 100 g de muestra

1.8. Almidón

El almidón es el carbohidrato esencial de la reserva de las plantas vasculares y es utilizado por éstas en su crecimiento. Es una fuente importante de calorías en la dieta humana, y su abundancia como compuesto natural sólo es superada por la celulosa [37, 38].

El almidón se ha encontrado en bacterias, protozoarios y algas, pero principalmente en las plantas. Se puede encontrar en forma de gránulos insolubles en las células, tejidos vegetales y órganos de almacenamiento (tubérculos, rizomas y semillas). A pesar de la existencia de una gran cantidad de plantas que producen esta molécula, sólo unas pocas son consideradas para el procesamiento industrial del almidón como: maíz, yuca, papa y trigo [38]

Los gránulos del almidón son estructuras macromoleculares, semicristalino ordenadas en capas. La unión de la amilosa y la amilopectina dan origen al gránulo de almidón semicristalino [39]. Las variaciones de los gránulos en cuanto a tamaño, forma, distribución, y composición, dependen del origen botánico del que provienen [40, 41].

1.8.1. Estructura del almidón

Los dos componentes de los gránulos de almidón son la amilopectina y la amilosa, polímeros de unidades de α -D-glucosa [37, 39] que representan entre el 98-99% del peso seco del almidón, la relación de los dos componentes depende de su origen botánico [39].

La amilosa es un polímero lineal, largo formado por moléculas de D-glucosa unidas por enlaces α -(1, 4), que representan aproximadamente el 99% de la estructura y 1% de ramificaciones unidas por enlaces α -(1-6), y se encuentran de forma espaciada e infrecuente, permitiendo observar su comportamiento lineal [42, 43]. Cada cadena contiene de 200 a 700 moléculas de glucosa. Aunque la amilosa es el componente de menor importancia en los gránulos, su influencia es importante en las propiedades del almidón (Figura 3) [44].

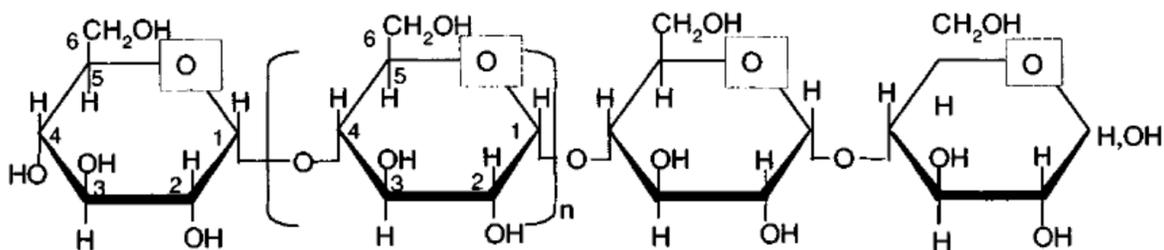


Figura 3. Estructura de la molécula de amilosa [39].

La amilopectina es mucho más larga que la amilosa, está fuertemente ramificada con aproximadamente 95% de enlaces α -(1-4) y 5% de enlaces α -(1-6). Es el principal componente de los almidones abarcando 70% de su contenido, tiene una distribución amplia y muchos enlaces ramificados (Figura 4) [44, 45, 39].

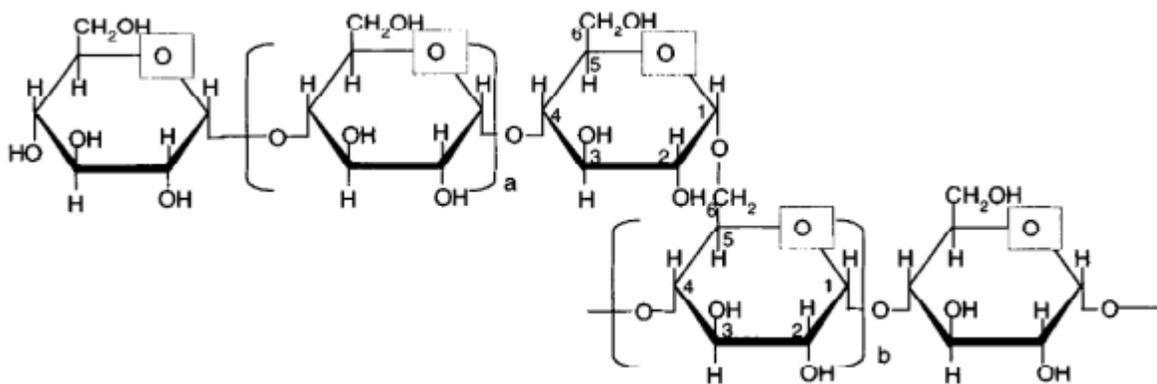


Figura 4. Estructura de la molécula de la amilopectina [39].

1.8.2. Amilasas

Las enzimas son proteínas producidas por los organismos vivos para realizar reacciones bioquímicas específicas, forman parte de los procesos metabólicos de la célula y son altamente específicas en su acción sobre los sustratos. El 65% de las enzimas en el mercado mundial son amilasas [38]. La α -amilasa es una enzima que degrada los poliglucósidos con enlaces α -(1, 4) glucosídicos, como el almidón y el glucógeno. Estas enzimas tienen varias aplicaciones en la industria del papel, así como en las de alimentos (industria cervecera, panadería) y farmacéutica [38, 46].

Las amilasas microbianas son de gran importancia, ya que han sustituido casi por completo la hidrólisis química del almidón en la industria. La importancia de su aplicación en diferentes áreas se debe a que son más estables que las que se aíslan de las plantas o animales. Las enzimas que han predominado en los sectores industriales son las aisladas de fuentes fúngicas y bacterianas [47, 46].

1.9. Aplicación de microorganismos en la industria

Existen microorganismos que tienen un papel importante en la industria alimenticia, debido a que la mayoría de los alimentos que consumimos son producidos o mejorados por la acción de estos microorganismos, como por ejemplo: el queso, pan, yogurt, los productos alcohólicos, etc., son producidos por fermentaciones microbianas [48].

Para la producción de energías renovables, los microorganismos son muy importantes en cuanto a la producción de energía “limpia”, como por ejemplo la producción de gas natural el cual es producido por la actividad de bacterias metanogénicas. Igualmente para la producción de biocombustibles los microorganismos juegan un papel importante tanto en el proceso fermentativo para la producción de etanol como en los procesos de pretratamientos de materias primas complejas con altos contenidos de almidón y celulosa [48].

1.9.1. Microorganismos amilolíticos

Existe una gran diversidad de microorganismos que producen enzimas amilolíticas con la capacidad de degradar moléculas de amilopectina y amilosa. Entre los microorganismos que poseen esta capacidad se encuentran las bacterias, las levaduras y algunos hongos filamentosos [49].

Los hongos y bacterias son la principal fuente de producción a nivel industrial de enzimas amilasas. Un ejemplo de esto, es la obtención de α -amilasa a partir de *Aspergillus niger*, la cual es muy utilizada en la licuefacción de almidón para la producción de bioetanol. Debido a la diversidad estructural de estas enzimas y al desarrollo en la ingeniería genética se han

podido manipular los microorganismos para sobre-exresar los genes involucrados en la producción de las enzimas [46, 50].

1.10. Identificación morfológica de microorganismos

Tradicionalmente, la aparición de microorganismos en un entorno determinado o en un proceso industrial, ha conllevado la necesidad de su identificación, que generalmente se realiza por métodos basados en su cultivo, mediante la observación de sus características morfo-fisiológicas, como por ejemplo, el crecimiento, tamaño, color, forma, entre otras, sin embargo, este tipo de identificación tiene limitantes, pues la expresión de estas características puede estar influida por las condiciones ambientales [51, 52, 53].

En el caso de levaduras existen diferentes pruebas para la identificación fenotípica como: fermentación de azúcares, crecimiento en diferentes fuentes de carbono y nitrógeno, crecimiento a diferentes temperaturas, asimilación de fuentes de carbono, requerimientos de vitaminas, resistencia a cicloheximida, actividad ureasa, producción de ácido acético, asimilación de almidón, tolerancia a etanol, etc. [54, 55]. Sin embargo estas pruebas son muy laboriosas y requieren de mucho tiempo, y experiencia en el área. Una alternativa para estas pruebas es el uso de microplacas, como el kit API 32C BioMerieux ((Marcy-1^o Etoile/France), que contienen 31 fuentes de carbono que hacen más rápido la identificación de levaduras, aunque una de las desventajas de estos kits es que son mucho más sensibles que las pruebas convencionales, por lo que se debe tener precaución al preparar el inóculo y al momento de inocular los pozos, ya que los falsos positivos son más frecuentes que en las pruebas convencionales, otra desventaja de estos kits es que la base de datos es restringida, por lo que la identificación debe realizarse en conjunto con las pruebas convencionales y utilizando las claves y las diagnosis de monografías especializadas de identificación como las de Barnnet, *et al.*, [55] y Kurtzman, *et al.*, [54]. Para una identificación más certera se realiza una identificación polifásica introduciendo los resultados de las pruebas tradicionales, del API y las moleculares (secuencia), en la base de datos de la Colección Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS).

Los métodos clásicos para la identificación de bacterias se basan en diferentes pruebas bioquímicas y morfológicas. Entre estas pruebas podemos mencionar algunas como: la tinción de Gram, formación de pigmentos, producción de catalasa y oxidasa, metabolismo oxidativo y/o fermentativo de la glucosa, fermentación y asimilación de diferentes fuentes de carbono, reducción de nitratos, y actividad enzimática, actividad ureasa, producción de gases, etc. [56, 57, 58, 59, 60].

Para la identificación de hongos los criterios que se toman en cuenta son: la observación microscópica de sus estructuras vegetativas y reproductivas (hifas, esporas sexuales, conidióforos, esporangios, estructuras especializadas, etc.) y macroscópica (textura, aspecto, crecimiento, coloración), estas características son suficientes para sugerir el género al que pertenece un determinado hongo, consultando claves morfométricas utilizadas para la identificación de hongos, en ocasiones se puede llegar hasta especie consultando las descripciones de la especie en monografías especializadas [56, 61].

Sin embargo, los métodos tradicionales en muchas ocasiones tienen limitaciones que se reflejan en su poder resolutivo a nivel de especie, además que son muy laboriosos, tardados y se requiere de mucha experiencia en cuanto al conocimiento taxonómico básico [62, 63], debido a esto es necesario la utilización de métodos rápidos, sensibles y precisos para la identificación exacta de los microorganismos.

1.11. Identificación molecular de microorganismos

Desde finales de la década de los 80 del siglo pasado, se han desarrollado técnicas de biología molecular que han revolucionado la taxonomía de los microorganismos permitiendo la reclasificación de muchas especies. Entre ellas están las basadas en el análisis de genes ribosomales como: 16S, del 5.8S, dominio D1/D2 de la subunidad grande ribosomal, β tubulina, etc, [53, 64, 65, 66]. Dichas técnicas tienen varias ventajas sobre las morfo-fisiológicas, entre las que se pueden mencionar, su reproducibilidad, no están influidas por el ambiente, alta resolución tanto intra como interespecífica, rapidez y confiabilidad.

Para una mayor certeza en la identificación de los microorganismos, en la actualidad se usa el análisis polifásico que se basa en la combinación de herramientas moleculares con las pruebas morfo-fisiológicas [67].

1.12. Justificación

La tendencia actual hacia el uso de los biocombustibles como alternativa energética ha llevado a la búsqueda de fuentes de materia prima que no estén involucradas directamente en la alimentación, en este marco destaca la especie *Brosimum alicastrum* Sw (ramón) que es un árbol diseminado en México y Centro América, con una alta producción de semillas (50-75 Kg de fruto/año) las cuales contienen un elevado porcentaje de almidón (61%), lo que hace un buen candidato para la producción de biocombustibles, específicamente de etanol a partir de su harina. De acuerdo a ello, la identificación de especies de microorganismos aislados de la microbiota nativa asociada al fruto del ramón podría favorecer la obtención de cepas con propiedades amilolíticas que puedan ser utilizadas en los procesos de licuefacción y sacarificación de materias primas ricas en almidón.

1.13. Hipótesis

Debido a que uno de los compuestos importantes de la semilla de ramón es el almidón es probable que en su microbiota nativa exista al menos una especie con propiedades amilolíticas y fermentativas.

1.14. Objetivo general

Aislar e identificar la microbiota presente en el fruto del ramón (*Brosimum alicastrum*) y evaluar su potencial para la producción de bioetanol.

1.14.1. Objetivos específicos

1. Aislar los microorganismos asociados al fruto del ramón.
2. Identificar morfológicamente los hongos filamentosos.
3. Caracterizar e identificar por pruebas morfológicas y bioquímicas los aislados de bacterias y levaduras obtenidos del fruto del ramón.
4. Corroborar mediante técnicas moleculares (secuenciación) la identidad, a nivel de especie, de los aislados de bacterias, hongos filamentosos y levaduras obtenidos del fruto de ramón.

CAPITULO II

MATERIALES Y METODOS

2.1. Estrategia experimental

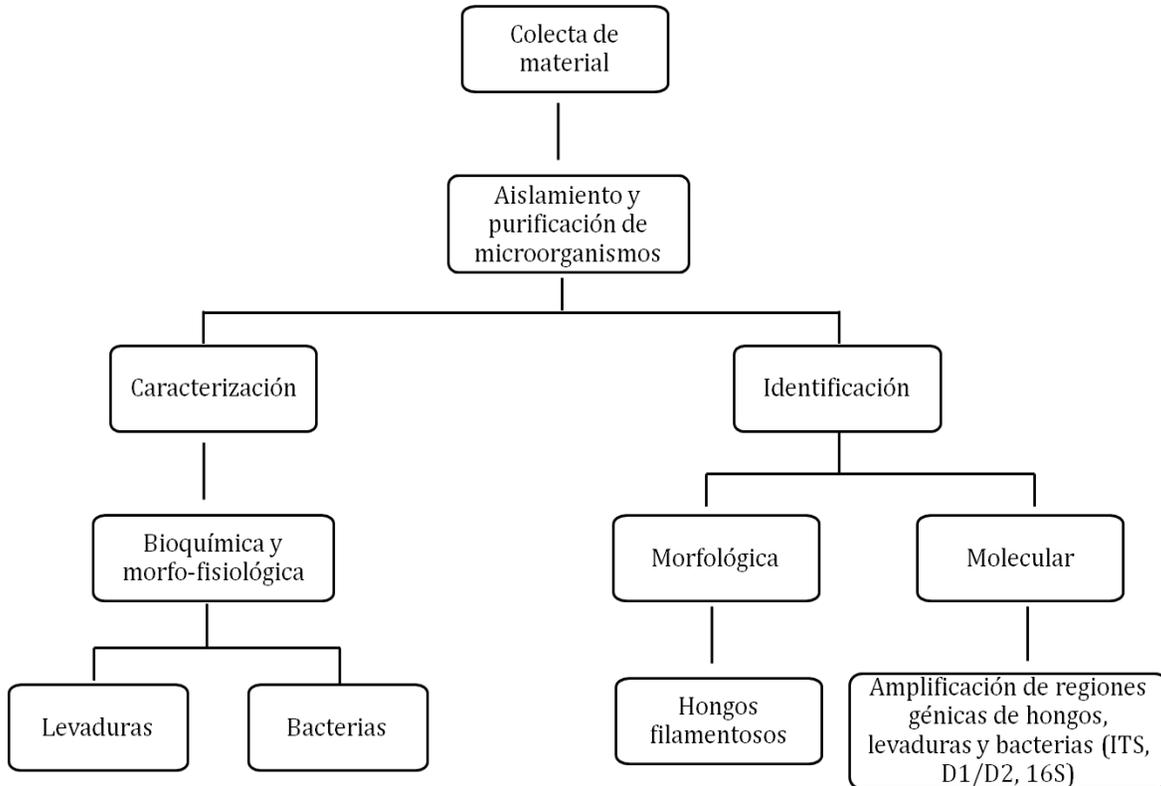


Figura 5. Estrategia experimental realizada para este estudio.

2.2. Colecta de material

La colecta de los frutos del ramón se realizó en el municipio de Mérida, Yucatán y en el municipio de Hopolchén, Campeche. Las muestras colectadas se depositaron en bolsas de plástico y se llevaron al laboratorio GeMBio para su análisis.

2.3. Aislamiento y purificación de la microbiota

Los frutos se enjuagaron con agua destilada para retirar los residuos de polvo y se secó el exceso de agua con toallas de papel estériles. Posteriormente se separó, con ayuda de una

pinza y un bisturí estéril, el pericarpio, la testa y la semilla (Figura 6). Los tejidos se desinfectaron superficialmente con una solución acuosa (2/1 v/v) de hipoclorito de sodio comercial al 2% y se enjuagaron dos veces con agua destilada estéril. Con ayuda de un bisturí estéril los diferentes tejidos se cortaron en pequeños pedazos, que se colocaron en magentas estériles a las cuales se les agregó 10 ml de agua peptonada (Peptona, Tween. Anexo 1) se dejaron incubar a 28 ± 2 °C durante 30 min., para posteriormente realizar el aislamiento de la microbiota.



Figura 6. Separación de los tejidos: a) fruto; b) pericarpio; c) testa; d) semilla.

El aislamiento de la microbiota se realizó mediante diluciones decimales seriadas, para ello se tomaron 500 μ l de la solución stock de las cámaras húmedas y se transfirieron a otro tubo que contenía 4.5 ml de agua destilada estéril, a partir de esta dilución (1/10) se hicieron diluciones decimales hasta una dilución de 10^{-6} . Se tomaron 100 μ l de las diluciones de 10^4 - 10^6 , para sembrar por extensión en placa, por triplicado, en diferentes medios de cultivo, según el microorganismo que se quisiera recuperar. Para hongos y bacterias se utilizó el medio PDA (Papa dextrosa agar, Bioxon, México; Anexo 1); para las levaduras el medio nutritivo WLA (Medio nutritivo de Wallenstein, Difco, EUA; Anexo 2) adicionado con cloranfenicol (0.1 gr.) (Sigma-Aldrich, EUA). Las placas se sellaron e incubaron a 28°C por varios días.

Las placas se observaron cada 24 horas, por tres días, con un microscopio estereoscopio, con el fin de aislar las colonias con morfología diferente en nuevas placas con medios de cultivo que varió en dependencia del microorganismo. Para bacterias se utilizó medio NBY

(Caldo nutritivo, Extracto de levadura, Agar; Anexo 3), para hongos PDA y para levaduras GELPA (Glucosa, extracto de levadura, peptona, agar; Anexo 2).

A los aislamientos se les puso una clave de acuerdo al tejido aislado y tipo de microorganismo, a los aislamientos del municipio de Mérida se les antepuso una R y a los del municipio de Hopelchén una C.

2.4. Identificación y caracterización

2.4.1. Identificación morfológica de hongos filamentosos

Para la observación de las estructuras reproductivas en el microscopio óptico se realizaron preparaciones semipermanentes con azul de lactofenol y preparaciones permanentes con glicerina y azul de lactofenol. Para la identificación hasta género se utilizaron las claves dicotómicas de Barnett y Hunter [68], Watanabe [69].

2.4.2. Caracterización morfo-fisiológica de levaduras

Para la caracterización morfológica de los diferentes aislados, los cultivos puros se sembraron en medio WLA, para observar las características macroscópicas de las colonias (borde, textura y color) y sus características microscópicas (forma y tamaño de las células). Esto se hizo con cada aislamiento, con el fin de agrupar los semejantes.

La caracterización fisiológica y bioquímica de los diferentes aislamientos se realizó de acuerdo con la metodología de Yarrow [70]:

- Fermentación de diferentes fuentes de carbono, se emplearon 7 fuentes de carbono (Glucosa, galactosa, sacarosa, maltosa, lactosa, rafinosa y almidón);
- Asimilación de compuestos de carbono utilizando las galerías API 32 C BioMérieux (Marcy-1' Etoile/France), siguiendo las instrucciones del fabricante; el resto de las pruebas requeridas en la metodología de Yarrow [70], se realizaron de forma manual.
- Tolerancia a diferentes temperaturas para determinar el crecimiento de los cultivos a 30, 36 y 40 °C en medio GELP (Anexo 3.4).

- Tolerancia a etanol: Se siguió la metodología de Lachance [71], utilizando el medio YMA (Extracto de Levadura-Extracto de Malta; Anexo 2) adicionado con 8% de glucosa y diferentes concentraciones de etanol absoluto con incrementos seriados del 1% (6, 7, 8, 9, 10 %), debido a que algunos aislamientos aún tenían crecimiento en las concentraciones de 10% se decidió incrementar la concentración a 11 y 12%.

2.4.3. Caracterización morfo-fisiológica de bacterias

Se evaluaron las características macroscópicas (color, tamaño, forma, borde, elevación, aspecto y consistencia) de la colonia y microscópicas (tamaño, forma y arreglo) de las estructuras de acuerdo a la metodología de Holt [60] y Schaad [72], para realizar una identificación hasta género.

2.4.3.1 Tinción de Gram

Esta técnica también llamada tinción diferencial, es usada para la determinación de la forma, tamaño y agrupación celular de las bacterias, es de considerable valor para la identificación y clasificación de bacterias ya que las separa en dos grandes grupos, Gram positivas y Gram negativas, por lo que esta prueba tiene un valor taxonómico importante [73, 72].

Se realizó un frotis de las colonias puras en un portaobjetos y se dejó secar para aplicar los colorantes. Primero se agregó el cristal violeta y se dejó actuar por un minuto, se escurrió el colorante y se enjuagó con agua destilada, se añadió una solución de Lugol, se dejó actuar por un minuto y se enjuagó con agua destilada, se decoloró con isopropanol, para quitar el exceso del colorante, se lavó con agua destilada para eliminar el isopropanol y por último se añadió la solución de safranina, se dejó actuar por un minuto, se lavó con agua destilada, se secó a temperatura ambiente (TA) y se observó en el microscopio. Las bacterias Gram positivas adquirieron un color azul-violeta y las Gram negativas un color rojo.

2.4.3.2 Producción de pigmentos en medio KB

El medio B de King (KB; Anexo 3) es un medio diferencial que permite distinguir a las bacterias fluorescentes como *Pseudomonas* del resto de las bacterias, en esta prueba se considera positivo si aparece un color verde o azul fluorescente en el medio KB y negativo si no se observa tal fluorescencia a los 6 días en observación [60, 72, 74]. Con un asa se tomó parte de un cultivo puro de 24 horas de crecimiento en medio NBY y se estrió en cajas de Petri con medio KB, se incubaron a 28 °C, a las 24 o 48 horas con una lámpara de luz ultravioleta se observaron las colonias y se registraron los resultados.

2.4.3.3. Coloración de las colonias (YDC)

Con un asa se tomó parte del cultivo bacteriano (24 horas en medio NBY), se estrió en el medio YDC (Anexo 3), se incubó a 28 ± 2 °C por 24 horas, al paso de este tiempo se evaluó la prueba observando la coloración que presentaban las colonias (amarillas o blancas).

2.4.3.4. Hidrólisis de ureasa

De un cultivo de 24 horas de crecimiento en medio NBY, se tomó una asada bien cargada, para inocular tubos con medio de Urea (Anexo 3). Se incubaron a 28 ± 2 °C, a las 24 o 48 horas el cambio de color del medio de amarillo a rojo indicó que la prueba era positiva, y si el medio permanecía de color rosa o amarillo la prueba se consideró negativa.

2.4.3.5. Prueba de oxidasa

Con un hisopo con N, N, dimetil p-fenilendiamina al 1%, se frotó el cultivo bacteriano de 24 horas de crecido en medio NGA (Anexo 3), se dejó actuar el reactivo por 10 segundos. El crecimiento bacteriano positivo adquiere una coloración púrpura, pero después de 60 segundos si no se observaba coloración, la prueba se consideró negativa.

2.4.3.6 Metabolismo oxidativo y/o fermentativo de la glucosa (Hugh-Leifson)

Esta prueba es para detectar el tipo de metabolismo de las bacterias, usando el indicador ácido-base (azul de bromotimol), cuando existe una oxidación de la glucosa, la bacteria en

condiciones aeróbicas produce ácido a partir de este carbohidrato, presentando un cambio de coloración en el medio de cultivo de azul a amarillo. En la fermentación la bacteria en condiciones anaeróbicas es capaz de metabolizar la glucosa y de la misma forma se presenta un cambio de coloración de azul a amarillo en el medio de cultivo [60, 73].

Se prepararon tubos con medio Hugh-Leifson (Anexo 3), a los cuales se les adicionó 0.5 ml de una solución acuosa de glucosa al 10%. Se inocularon dos tubos por aislamiento, un tubo se cubrió con aceite cristal, todos los tubos se incubaron a 28 ± 2 °C de 24 a 48 horas, transcurrido este tiempo se evaluaron los tubos y se registró el resultado.

2.4.3.7 Crecimiento a 30 y 40 °C

Se preparó el medio NBY líquido (Anexo 3), se dosificaron 10 mL del medio en tubos de 20 mL, con un asa se tomó parte del cultivo bacteriano y se inocularon dos tubos por aislamiento, un tubo se incubó a 30 °C y el otro tubo a 40 °C, la prueba se evaluó a las 24 y 48 horas, y se observó la turbidez en el medio.

2.5. Hidrólisis de almidón

A todos los microorganismos aislados (bacterias, hongos filamentosos y levaduras) se les realizó la prueba de hidrólisis de almidón en placa y en medio líquido.

Para la prueba en placa los aislados se sembraron por la técnica de punción en el centro de la placa de medio de ELAA (Extracto de levadura-almidón-agar; Anexo 4). Se incubaron a 28 °C por 3 días, al paso de este tiempo las placas se inundaron con Lugol. La prueba se consideró positiva si se observaba un halo hialino alrededor del cultivo [75, 76].

Para la prueba en líquido se preparó almidón al 0.5% (p/v), 4.5 ml de esta solución se dispensaron en tubos de ensayo de vidrio de 10 ml, y se esterilizaron en autoclave a 121 °C por 15 min., bajo condiciones asépticas a cada tubo se le adicionaron 0.5 ml de base nitrogenada (Difco). Cada uno de los tubos se inoculó con una asada de un cultivo de 24 hrs

y se incubaron a 28 °C por cuatro días, al cabo de este tiempo se evaluó la prueba adicionando dos gotas de Lugol (Sigma-Aldrich) en los tubos, agitándolo.

Aquellos tubos en los que se obtuvo una coloración violeta intensa al añadir el reactivo se consideró que el microorganismo utilizado para realizar la prueba no presentó actividad amilolítica, mientras que aquellos, en los que se observaron coloraciones violáceas, se consideró que los microorganismos evaluados sí presentaron cierta capacidad amilolítica, pero que no lograron hidrolizar por completo el almidón.

2.6. Identificación molecular

2.6.1. Aislamiento de ADN

Con ayuda de un asa se resuspendieron células de levaduras o bacterias o el micelio y esporas de los hongos, provenientes de cultivos puros de 3 días crecidos en medio GELPA, de NBY o PDA respectivamente, en 1000 µl de agua destilada estéril. Las suspensiones se colocaron en tubos Eppendorf de 2 ml para su lisis térmica y mecánica mediante tratamientos de congelación y descongelación sucesivas a -80°C, y 65 °C, respectivamente y agitación en vórtex de 3 a 5 minutos entre cada intervalo, esto se repitió 5 veces

La extracción del ADN genómico se realizó de acuerdo con el protocolo de Tapia-Tussell *et al.*, [77], el que se describe brevemente a continuación:

- 1.- Se transfirieron 300 µl de la suspensión obtenida a un tubo Eppendorf de 2 ml nuevo y estéril, se añadieron 800 µl de buffer de lisis SDS (Tris base 50 mM, NaCl 250 mM, EDTA 50 mM pH 8.0, SDS 0.3% (v/v)), 15 µl de RNAsa A (10 mg/ml, Invitrogen, EUA) y 15 µl de Proteinasa K (Invitrogen, EUA). Se mezcló vigorosamente en vórtex.
2. Se incubó a 65 °C durante 60 min, se agitó en vórtex por 5 min. y se enfrió a TA. Se añadieron 600 µl de cloroformo y se mezclaron suavemente por inversión durante 10 min.
3. Se centrifugó a 13000 rpm por 10 min a TA. Se transfirieron entre 500 a 700 µl de sobrenadante a un tubo nuevo de Eppendorf de 2 ml estéril y se adicionaron 700 µl de isopropanol frío.

4. La mezcla se agitó mediante inversión suave y se colocó a -80 °C por 10 min o a -20 °C por 15 min.

5. Se centrifugó a 13 000 rpm por 5 min a TA. Se decantó el sobrenadante y se lavó el precipitado con 500 µl de EtOH al 70% (v/v). El cual posteriormente se decantó y la pastilla se dejó secar a TA durante 20 min en campana de flujo laminar. Se resuspendió el ADN obtenido en 50 µl de buffer TE (Anexo 5) o H₂O dd estéril.

2.6.2. Calidad, integridad y cuantificación del ADN

La determinación de la integridad de ADN se realizó a través de electroforesis en geles de agarosa (Invitrogen) al 0.8% (p/v), teñido con bromuro de etidio (SIGMA-ALDRICH, EUA). Las muestras se corrieron en amortiguador TBE 1X (Tris-Borato-EDTA) a 90V por 30 minutos.

Los geles se visualizaron en un transiluminador UVP LabWorks 4.0 (Imaging and analysis software). Las imágenes se digitalizaron y procesaron con el programa UVB Bioluminescence Systems.

La cuantificación del ADN se realizó en un espectrofotómetro (Eppendorf Biophotometer, EUA) según el método descrito por Sambrook *et al.*, [78], el cual se basa en la medición de la absorbancia de luz ultravioleta que se obtiene a una longitud de onda de 260 nm, permitiendo calcular la concentración de los ácidos nucleicos en la muestra y a 280 nm se puede determinar si existen contaminantes proteicos en la muestra. La relación entre las lecturas de absorbancia a 260/280 nm ($DO_{260/280}$) indica la pureza de los ácidos nucleicos extraídos.

2.6.3. Amplificación de las regiones génicas

2.6.3.1. Amplificación de la región ITS-5.8S para identificación de hongos filamentosos

La región ITS-5.8S se amplificó con los iniciadores universales ITS1 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCC G-3') e ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') (Figura 7) [79].

Las reacciones se realizaron de acuerdo con el protocolo de Naumova, *et al.*, [80] las cuales se describen a continuación: el volumen final de las reacciones fue de 25 μ l, que contenían 50 ng de ADN genómico, 1X de amortiguador de PCR (Invitrogen, EUA), 0.20 mM de dNTPs (Invitrogen, EUA), 1.5 mM de MgCl₂ (Invitrogen, EUA), 1 μ M de cada iniciador y 1U de *Taq* polimerasa (Invitrogen, EUA). La amplificación del ADN se realizó en un termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Perkin Elmer), de la siguiente manera: un paso de desnaturalización inicial a 94 °C por un min, seguido por 30 ciclos a 94 °C por 60 s, 58 °C por dos min y 72 °C por 60 s y un último paso de extensión a 72 °C por 5 min.

Los productos de amplificación se separaron mediante electroforesis en geles de agarosa (Invitrogen) al 1.5 % (p/v) teñidos previamente con bromuro de etidio. La corrida se realizó en amortiguador TBE 1X (Tris-borato-EDTA) a 100V por 45 min. Se utilizó un marcador molecular de escalera (1Kb plus) (Invitrogen), los geles se visualizaron en el transiluminador UVP LabWorks 4.0 (Imaging and analysis software). Las imágenes se digitalizaron y procesaron con el programa UVB Bioluminescence Systems.



Figura 7. Representación esquemática de la región ITS-5.8S utilizada para la identificación de hongos.

2.6.3.2. Amplificación del dominio D1/D2 de la subunidad larga del gen 26S ADNr para la identificación de levaduras

La identidad de los aislados seleccionados se corroboró por el análisis de la secuencia de bases del Dominio D1/D2 del gen 26S ADNr, que se amplificó con los iniciadores universales NL1 (5'GCA TAT CAA TAA GCG GAG GAA AAA G-3) y NL4 (5'GGT CGG TGT TTC AAG ACG G-3) [81] (Figura 8).



Figura 8. Representación esquemática del dominio D1/D2 en la subunidad grande del gen ribosomal 26S.

Las reacciones de PCR se realizaron de acuerdo a Libkind *et al* [82]. El volumen final de las reacciones fue de 50 μ l, que contenían 50 ng de ADN genómico, 1X de amortiguador de PCR (Invitrogen, EUA), 0.25 mM de dNTPs (Invitrogen, EUA), 2 mM de $MgCl_2$, 1 μ M de cada iniciador y 1 U de *Taq* ADN polimerasa (Invitrogen, EUA)

La amplificación del ADN se realizó en un termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Perkin Elmer) y consistió de un primer paso de desnaturalización inicial a 95 °C por 12 min., seguido de 40 ciclos a 94 °C por 60 s, 52 °C por 55 s y 72 °C por 2 min. y un paso final de extensión a 72 °C por 5 min. Los productos de amplificación se separaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1.5 % (p/v) teñidos previamente con bromuro de etidio, la corrida se realizó en amortiguador TBE 1X (Tris-borato-EDTA) a 100V por 45 min.. Se utilizó un marcador molecular de escalera (1Kb plus) (Invitrogen), los geles se visualizaron y digitalizaron en un transiluminador UVP LabWorks 4.0 (Imaging and analysis software). Las imágenes se digitalizaron y procesaron con el programa UVB Biolmaging Systems.

2.6.3.3. Amplificación de gen 16S del ADNr para identificación de bacterias

La identidad de las cepas seleccionadas se corroboró por el análisis de la secuencia del gen 16S del ADNr que se amplificó con los iniciadores 16SS (5'AGA GTT TGA TCC TGG CTC-3) y 16SR (5'CGG GAA CGT ATT CAC CG-3) (Figura 9) [83].

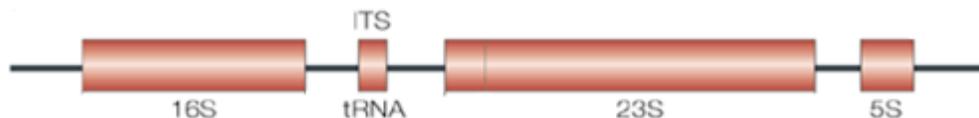


Figura 9. Representación esquemática del gen 16S ribosomal [84].

El volumen final de las reacciones fue de 25 μ l, que contenían 50 ng de ADN genómico, 1X de amortiguador de PCR (Invitrogen, EUA), 0.20 mM de dNTPs (Invitrogen), 1.5 mM de MgCl₂, 1 μ M de cada iniciador y 1U de *Taq* polimerasa (Invitrogen). La amplificación del ADN se realizó en un termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Perkin Elmer) con un paso de desnaturalización inicial a 94 °C por cinco min., seguidos por 30 ciclos a 94 °C por 60 s, 59 °C por 30 s y 72 °C por 60 s y un último paso de extensión a 72 °C por 10 min.

Los productos de amplificación se separaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1.5 % (p/v) teñidos previamente con bromuro de etidio, la corrida se realizó en amortiguador TBE 1X (Tris-borato-EDTA) a 100 V por 45 min. Se utilizó un marcador molecular de escalera (1Kb plus) (Invitrogen), los geles se visualizaron y digitalizaron en un transiluminador UVP LabWorks 4.0 (Imaging and analysis software). Las imágenes se digitalizaron y procesaron con el programa UVB BioImaging Systems.

2.6.4. Secuenciación

Todos los productos de amplificación de las diferentes regiones génicas fueron enviados para su purificación y secuenciación a MACROGEN Inc, Corea. La alineación y edición de las secuencias se realizó con el programa BioEdit v. 7.0.9 [85]. Las secuencias obtenidas se compararon con la base de datos del GenBank utilizando el programa BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) y la Ribosomal Database Project (<https://rdp.cme.msu.edu/>).

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Aislamiento y purificación

Desde el inicio del estudio, al realizar los aislamientos, se pudo apreciar la alta diversidad y abundancia de microorganismos asociados al fruto (pericarpio, testa, semilla) del ramón. En la figura 10 se presenta el número de aislamientos obtenidos de cada grupo de microorganismos por colecta. En la colecta llevada a cabo en el municipio de Mérida se aislaron en total 56 cepas. Del pericarpio se obtuvieron 26, de las cuales 4 fueron bacterias y 22 levaduras, de la testa se aislaron 14 cepas, un hongo, 2 bacterias y 11 levaduras; de la semilla se obtuvieron 16 aislados de los cuales 3 pertenecen a hongos, 4 a bacterias y 9 a levaduras. Mientras que en la colecta realizada en el municipio de Hopelchén se obtuvieron en total 65 cepas: del pericarpio se aislaron 21, que correspondieron a un hongo, 5 bacterias y 15 levaduras, de la testa se obtuvieron 18 cepas, 6 bacterias y 12 levaduras, y de la semilla 26 cepas, 3 hongos, 6 bacterias y 17 levaduras. Como se puede observar en la figura 10 hubo mayor abundancia de aislamientos en el muestreo realizado en Hopelchén, probablemente debido a que el lugar de muestreo que es una zona arqueológica en donde las características del ambiente (temperatura, humedad, tipo de vegetación, alta cantidad de materia orgánica que los microorganismos utilizan para su alimentación, supervivencia, reproducción y distribución) son más favorables para la existencia e interacción de los microorganismos con su hábitat y existe menor efecto antropogénico. Esto concuerda con lo reportado por Rosas, *et al.*, [86] y Madigan, *et al.*, [48] quienes sugieren que la supervivencia y distribución de los microorganismos está determinada por los factores biológicos, físicos y químicos del ambiente en el que coexisten, y la mayoría de los microorganismos provienen de fuentes silvestres, como vegetación, suelo y cuerpos de agua.

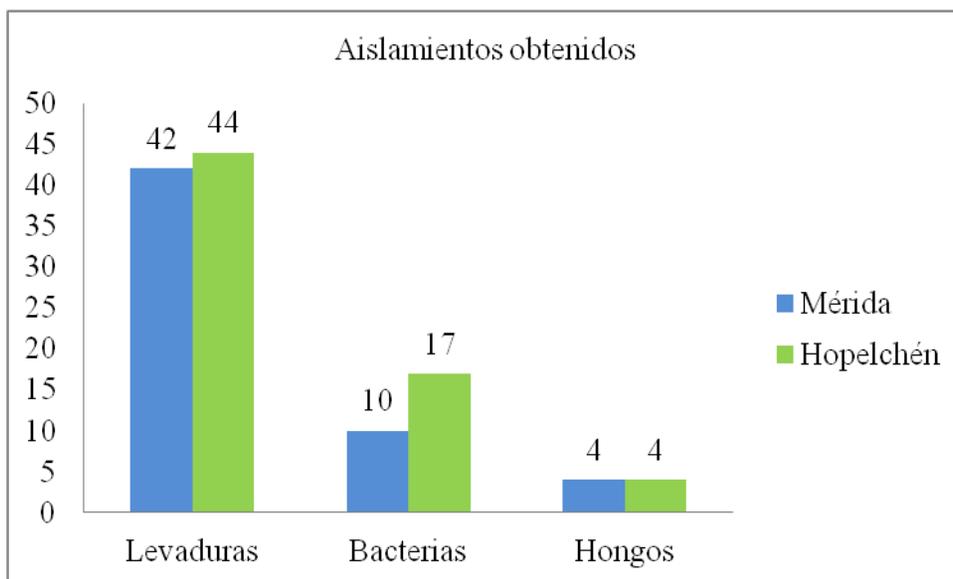


Figura 10. Cantidad de microorganismos aislados en las dos colectas realizadas en los municipios de Mérida, Yucatán y Hopelchén, Campeche.

Los microorganismos más abundantes en las colectas fueron las levaduras aisladas del pericarpio, esto podría deberse a que esta parte del fruto es un sustrato rico en nutrientes específicamente de azúcares, lo cual favorece el crecimiento de este tipo de microorganismos [58, 87, 88, 89].

Por la cantidad de microorganismos encontrados puede afirmarse que el ramón es un buen sustrato para su crecimiento, debido probablemente a su alto contenido de nutrientes.

3.2. Identificación de hongos filamentosos

En total se obtuvieron 8 aislados divididos en 3 géneros: *Aspergillus*, *Penicillium* e *Isaria*, y la mayoría de los aislados correspondió al género *Aspergillus* (5 cepas), seguido por dos cepas del género *Penicillium* y una cepa del género *Isaria* (Tabla 2).

Tabla 2. Aislados de hongos filamentosos obtenidos del fruto del ramón.

Clave	Localidad	Tejido
RSH-1	Mérida	Semilla
RSH-2	Mérida	Semillas
RSH-3	Mérida	Semillas
RSH-4	Mérida	Semillas
RCP-1	Hopelchén	Pericarpio
CSH-1	Hopelchén	Semilla
CHS-2	Hopelchén	Semilla
CSH-3	Hopelchén	Semilla

La mayoría de los hongos del género *Aspergillus* fueron aislados de la semilla. Lo que puede deberse a su alto contenido de almidón, ya que este es un género saprobio que es capaz de degradar almidón, celulosa, hemicelulosa, pectinas y otros polímeros de azúcares y es capaz de colonizar y degradar numerosos substratos, por lo que se ha encontrado en suelo, semillas, granos, cuero, residuos vegetales, etc. y tiene una distribución cosmopolita [90, 91]. Este género también fue aislado en hojas y semillas de ramón en un estudio realizado por Huchin [92], y Rosado (comunicado personal, 2014) lo observó en semillas del mismo árbol. En el caso del género *Penicillium* se ha reportado su aislamiento en suelo, como saprobio en frutos, semillas y alimentos, también se evaluó su capacidad amilolítica, que resultó alta [93, 94].

Entre los aislados de un mismo género, se observó una variabilidad tanto macroscópica (tipo de crecimiento de las colonias, textura, bordes, etc.) como microscópica (forma de los conidios, conidióforos, etc.) principalmente dentro del género *Aspergillus*. (Figura 11). Utilizando la monografía de Klich [95] se identificaron cuatro especies diferentes dentro de este género (*Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus ustus*, *Aspergillus oryzae*). *Penicillium citrinum* se identificó con las monografías de Pitt [96, 97], e *Isaria fumosorosea* con los tratados de Domsh *et al.*, [98] y Samson *et al.* [99]

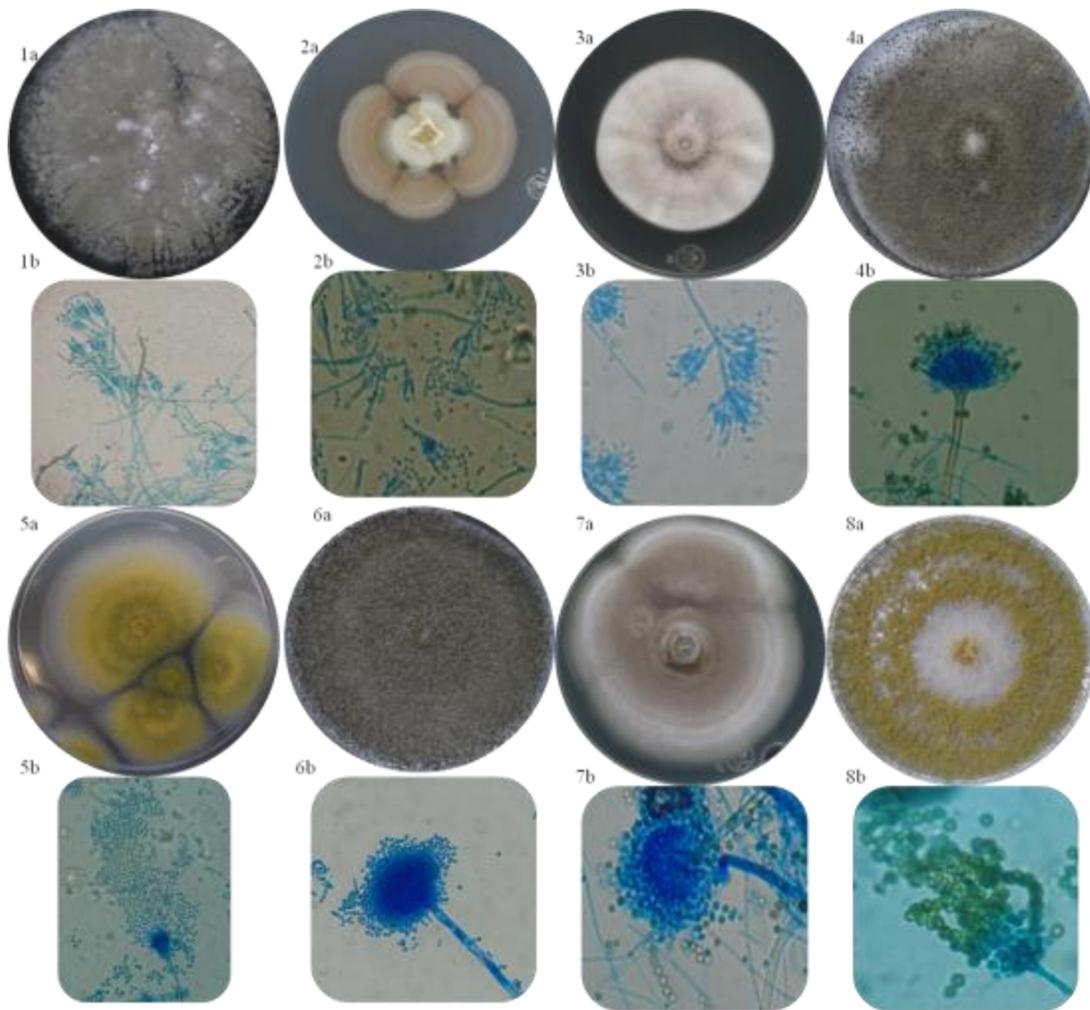


Figura 11. a) Colonias de los aislados de hongos obtenidos del fruto de ramón en medio PDA y b) estructura reproductiva de los géneros. 1 a y b) *P. citrinum*, 2 a y b) *Penicillium* sp., 3 a y b) *I. fumosorosea*, 4 a y b) *A. niger*, 5 a y b) *A. flavus*, 6 a y b) *A. niger*, 7 a y b) *A. ustus*, 8 a y b) *A. oryzae*.

Como resultado de la amplificación de la región ITS, de los aislamientos identificados previamente por su morfología, se obtuvo un producto de 580 pb (Figura 12) y el análisis de las secuencias permitió corroborar y lograr su identidad hasta especie con un 99-100% de similitud, con los datos depositados en la base de datos del GenBank (Tabla 3). Sólo una secuencia presentó un porcentaje de identidad inferior (97%), por lo que se identificó únicamente a género (*Penicillium* sp.). La región ITS es la región conservada más usada

para la identificación de hongos a nivel específico e intraespecífico en estudios ecológicos, relacionados con la sistemática, filogenia y taxonomía [96, 97, 98, 99].

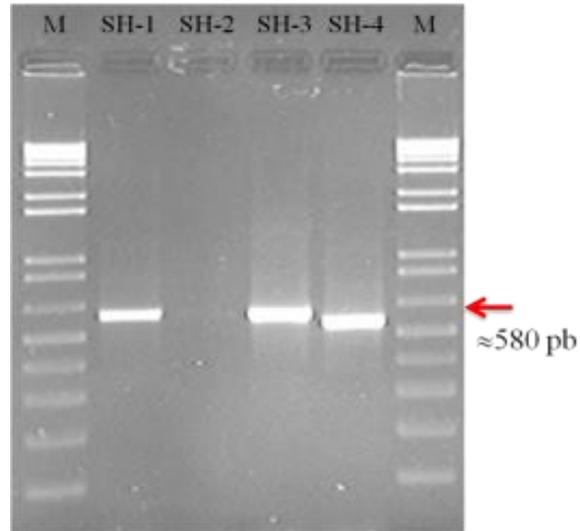


Figura 12. Producto de la amplificación de la región ITS-5.8S del ADNr en hongos filamentosos.

Tabla 3. Identificación molecular de cada uno de aislados de hongos mediante comparación de su secuencia (ITS-5.8S) con las existentes en la base de datos del GenBank.

Clave	Especie	% Cobertura	% Identidad	No. Acceso con respecto al GenBank
RSH-2	<i>Aspergillus niger</i>	100	99	KP307912.1
RSH-3	<i>Aspergillus flavus</i>	98	100	JX157882.1
RSH-4	<i>Aspergillus niger</i>	98	100	JQ929761.1
RSH-1	<i>Penicillium citrinum</i>	99	100	KT004401.1
CPH-1	<i>Aspergillus oryzae</i>	100	100	KP975532.1
CSH-1	<i>Penicillium</i> sp.	100	97	KP329844.1
CSH-2	<i>Isaria fumosorosea</i>	98	99	FJ765015.1
CSH-3	<i>Aspergillus ustus</i>	100	99	HQ607794.1

3.3. Identificación de bacterias

A partir de las muestras del fruto (pericarpio, semilla y testa) de ramón de las colectas realizadas se obtuvieron en total 53 aislamientos. Una vez analizadas las características de las bacterias (coloración, superficie, bordes, tamaño y elevación), se concluyó que estas correspondían a 26 aislados diferentes, las cuales se agruparon con base en el sustrato del que provenían y su micromorfología, quedando 8 aislamientos del pericarpio, 8 de la testa y 10 de la semilla (Tabla 4).

Tabla 4. Aislados de bacterias obtenidas del ramón.

Clave	Localidad	Tejido	Clave	Localidad	Tejido
RPB-1	Mérida	Pericarpio	CP-1	Hopelchén	Pericarpio
RPB-2	Mérida	Pericarpio	CP-2	Hopelchén	Pericarpio
RPB-3	Mérida	Pericarpio	CP-3	Hopelchén	Pericarpio
RPB-4	Mérida	Pericarpio	CP-4	Hopelchén	Pericarpio
RTB-1	Mérida	Testa	CT-1	Hopelchén	Testa
RTB-2	Mérida	Testa	CT-2	Hopelchén	Testa
RSB-1	Mérida	Semilla	CT-3	Hopelchén	Testa
RSB-2	Mérida	Semilla	CT-4	Hopelchén	Testa
RSB-3	Mérida	Semilla	CT-5	Hopelchén	Testa
RSB-4	Mérida	Semilla	CT-6	Hopelchén	Testa
			CS-1	Hopelchén	Semilla
			CS-2	Hopelchén	Semilla
			CS-3	Hopelchén	Semilla
			CS-4	Hopelchén	Semilla
			CS-5	Hopelchén	Semilla
			CS-6	Hopelchén	Semilla

La tinción de Gram permitió clasificarlas en Gram positivos y Gram negativos. Dentro de estas se encontraron cocos y bacilos tanto positivos como negativos como se muestra en la Tabla 5-6. Estos resultados fueron comparados con los reportados en las monografías de Holt, *et al.* [60] y Schaad, *et al.* [72], para estos géneros y en el caso del género *Chitinophaga* los resultados se compararon con los reportados por Kämpfer, *et al.* [100]. En todos hubo coincidencia en las características morfo fisiológicas y bioquímicas entre lo reportado y lo encontrado en este estudio.

Las pruebas bioquímicas permitieron identificar a nivel de género los aislamientos bacterianos, que se dividieron en: *Pantoea* (6 aislamientos), *Gluconobacter*, (5

aislamientos), *Staphylococcus* (3 aislamientos), *Enterobacter*, *Curtubacterium*, y *Burkholderia* con 2 aislamientos cada uno, *Chitinophaga*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Bacillus*, y *Asaia* con sólo un aislamiento cada uno.

Tabla 5. Identificación de los aislados de bacterias del muninipio de Mérida mediante pruebas bioquímicas.

Clave Prueba	Forma	Color	Consistencia (Mucoide)	Gram	Oxidasa	Ureasa	O-F	Crecimiento a 28 y 40°C	Fluorescencia	Género
RPB-1	Bacilo	Bl	-	-	-	-	F-O	28	-	<i>Gluconobacter</i>
RPB-2	Coco	Bl	-	-	-	-	F-O	28	-	<i>Gluconobacter</i>
RPB-3	Coco	Bl	+	+	-	-	F-O	28	-	<i>Gluconobacter</i>
RPB-4	Bacilo	Bl	+	-	-	-	F-O	28	-	<i>Gluconobacter</i>
RTB-1	Bacilo	Bl	-	+	+	-	O	40	-	<i>Burkholderia</i>
RTB-2	Bacilo	Bl	-	+	+	-	O	40	-	<i>Burkholderia</i>
RSB-1	Coco	Bl	-	+	-	-	F-O	40	-	<i>Staphylococcus</i>
RSB-2	Bacilo	Bl	-	+	+	-	F-O	40	-	<i>Bacillus</i>
RSB-3	Coco	Bl	-	+	-	+	F-O	40	-	<i>Staphylococcus</i>
RSB-4	Coco	A	-	+	-	-	F-O	40	-	<i>Staphylococcus</i>

C: Cocos; B: Bacilo; +: Positivo; -: Negativo; F: Fermentativo; O: Oxidativo; Bl: Blanco; A: Amarillo

Tabla 6. Identificación de los aislados de bacterias del municipio de Hopelchén mediante pruebas bioquímicas.

Clave Prueba	Forma	Color	Consistencia (Mucide)	Gram	Oxidasa	Ureasa	O-F	Crecimiento a 28 y 40 °C	Fluorescencia	Género
CP-1	Coco	Bl	-	-	-	-	F-O	28	-	<i>Pantoea</i>
CP-2	Coco	Bl	-	-	+	-	O	28	-	<i>Chitinophaga</i>
CP-3	Coco	Bl	-	-	+	-	F-O	28	-	<i>Pantoea</i>
CP-4	Bacilo	Bl	+	-	-	+	F-O	28	-	<i>Klebsiella</i>
CT-1	Bacilo	Bl	-	-	-	-	O	28	+	<i>Pseudomonas</i>
CT-2	Coco	Bl	-	-	-	-	O	28	-	<i>Gluconobacter</i>
CT-3	Coco	Bl	-	-	-	+	F	28	-	<i>Enterobacter</i>
CT-4	Coco	Bl	-	-	-	-	F-O	28	-	<i>Salmonella</i>
CT-5	Coco	Bl	-	-	+	-	F-O	28	-	<i>Pantoea</i>
CT-6	Coco	Bl	-	-	+	-	F-O	40	-	<i>Pantoea</i>
CS-1	Bacilo	Bl	-	-	-	+	F	28	-	<i>Enterobacter</i>
CS-2	Coco	Bl	-	-	-	-	F-O	28	-	<i>Pantoea</i>
CS-3	Coco	Bl	-	-	-	-	F-O	28	-	<i>Pantoea</i>
CS-4	Coco	A	+	+	-	-	O	28	-	<i>Curtubacterium</i>
CS-5	Coco	Bl	-	-	-	-	F-O	28	-	<i>Asaia</i>
CS-6	Coco	A	+	+	-	-	O	28	-	<i>Curtubacterium</i>

C: Cocos; B: Bacilo; +: Positivo; -: Negativo; F: Fermentativo; O: Oxidativo; Bl: Blanco; A: Amarillo

Al amplificar la región 16S el producto de amplificación obtenido fue de aproximadamente 1550 pb (Figura 13).

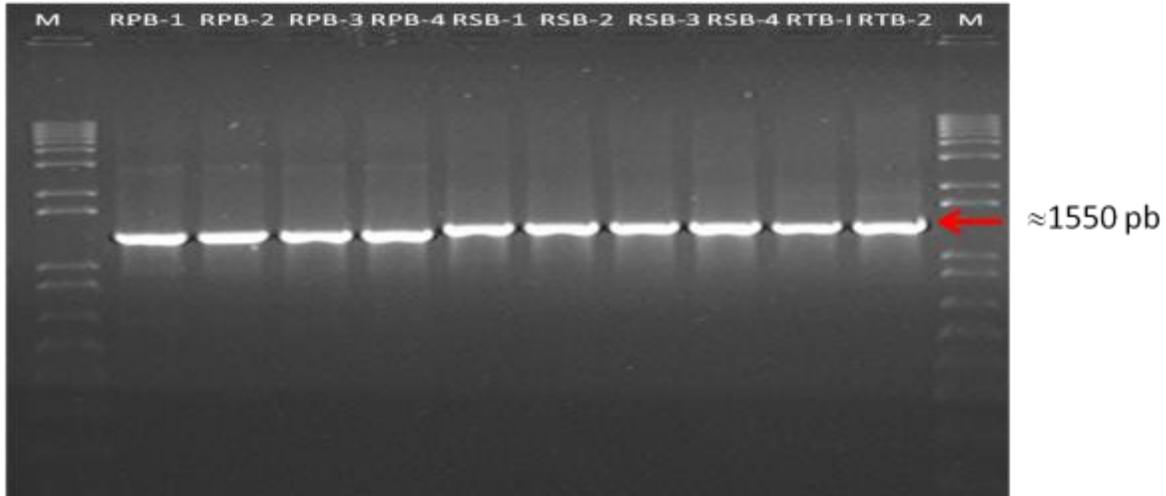


Figura 13. Producto de la amplificación del gen 16S de los aislados de bacterias

Los resultados obtenidos por secuenciación se muestran en la Tabla 7-8. Existió un 99-100% de similitud entre las secuencias obtenidas en este trabajo y las depositadas en la base de datos del GenBank. Al ser comparadas con la base de datos del Ribosomal Database Project, coincidieron con los resultados obtenidos en el GenBank, confirmando la identificación de cada aislamiento. Sólo una secuencia presentó un porcentaje de identidad inferior (97%) por lo que se identificó únicamente a género como *Pantoea* sp.

Tabla 7. Especies identificadas del municipio de Mérida por comparación de sus secuencias (16S ADNr) con las existentes e la base de datos GenBank.

Clave	Especie	% Cobertura	% Identidad	No. Acceso con respecto al GenBank
RPB-1	<i>Gluconobacter japonicus</i>	100	99	JF346081.1
RPB-2	<i>Gluconobacter frateurii</i>	99	99	NR_112239.1
RPB-3	<i>Gluconobacter kondonii</i>	100	99	NR_104680.1
RPB-4	<i>Gluconobacter japonicus</i>	100	99	NR_041445.1
RTB-1	<i>Burkholderia gladioli</i>	100	100	KP306792.1
RTB-2	<i>Burkholderia gladioli</i>	99	98	EF193642.1
RSB-1	<i>Staphylococcus pasteurii</i>	100	100	KT239002.1
RSB-2	<i>Bacillus megaterium</i>	100	99	LC011865.1
RSB-3	<i>Staphylococcus pasteurii</i>	100	100	KT427912.1
RSB-4	<i>Staphylococcus pasteurii</i>	100	99	KJ870045.1

Tabla 8. Especies identificadas del municipio de Hopelchén por comparación de sus secuencias (16S ADN_r) con las existentes e la base de datos GenBank.

Clave	Especie	% Cobertura	% Identidad	No. Acceso con respecto al GenBank
CP-1	<i>Pantoea dispersa</i>	100	99	JN391535.1
CP-2	<i>Chitinophaga filiformis</i>	100	99	NR_040909.1
CP-3	<i>Pantoea anthophila</i>	100	100	JN644500.1
CP-4	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	99	100	KM077044.1
CT-1	<i>Pseudomonas geniculata</i>	100	99	EU194335.1
CT-2	<i>Gluconobacter frateurii</i>	100	99	AB819116.1
CT-3	<i>Enterobacter hormaechei</i>	100	100	KF054945.1
CT-4	<i>Salmonella bongori</i>	100	99	KC178578.1
CT-5	<i>Pantoea</i> sp.	99	97	FJ788420.1
CT-6	<i>Pantoea agglomerans</i>	98	99	AY924374.1
CS-1	<i>Enterobacter cloacae</i>	100	100	CP012167.1
CS-2	<i>Pantoea agglomerans</i>	100	100	GQ374472.1
CS-3	<i>Pantoea anthophila</i>	100	99	JN644500.1
CS-4	<i>Curtobacterium citreum</i>	100	99	JQ659486.1
CS-5	<i>Asaia bogorensis</i>	100	100	AB682112.1
CS-6	<i>Curtobacterium citreum</i>	100	99	FJ976536.1

En total fueron identificadas 16 especies, distribuidas en 12 géneros. Es importante destacar que en las muestras provenientes de Hopelchén existió mayor diversidad de especies que en las de Mérida, lo cual puede deberse a que como las muestras de Mérida proceden de un área urbana, la perturbación humana es considerablemente mayor que la de la zona arqueológica. De estos podemos inferir que el ambiente urbano no es favorable para la existencia y el desarrollo de algunas de las especies bacterianas encontradas en la semilla de ramón, y esto puede deberse a que las mismas no sean capaces de adaptarse a este ambiente, lo que trae como consecuencia que exista posiblemente mayor cantidad de

individuos de una misma especie pero menor diversidad de las mismas, esto coincide con otros estudios donde se ha comparado la riqueza microbiana en ambientes diferentes [101, 102].

La mayoría de las especies identificadas son consideradas fitopatógenas [60, 72] y no se encontró información sobre su actividad amilolítica. Por ello no se consideraron para la prueba de hidrólisis de almidón a excepción de *B. megaterium* y *C. citreum* los cuales si se han reportado como amilolíticos [103, 104].

3.4. Identificación de levaduras

En total se obtuvieron 86 aislamientos de levaduras, tomando en cuenta la morfología colonial en medio WLA (Figura 14). Con base en diferencias morfológicas se distinguieron 35 aislamientos (Tabla 9) que procedían: 13 del pericarpio, 10 de la testa y 12 de la semilla. A todas se les realizaron las pruebas de las galerías API 32C, las pruebas sugeridas por Yarrow [70].

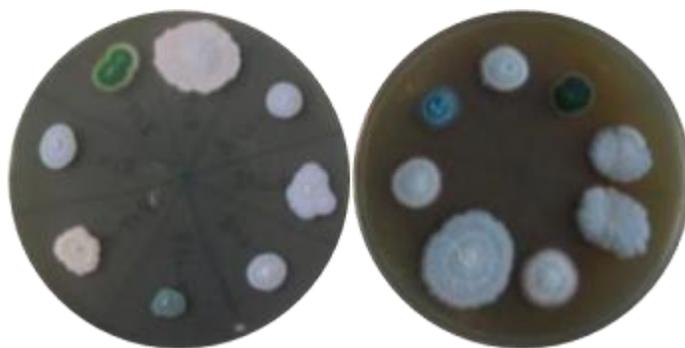


Figura 14. Colonias de los aislados de levaduras obtenidas del fruto de en medio WL agar nutritivo por 4 días.

Tabla 9. Aislados de levaduras obtenidos del fruto de ramon en los muestreos realizados en los municipios de Mérida, Yucatán y Hopelchén, Campeche.

Clave	Localidad	Tejido	Clave	Localidad	Tejido
RPL-1					
RPL-2			PL-1		
RPL-3			PL-2		
RPL-4	Mérida	Pericarpio	PL-3	Hopelchén	Pericarpio
RPL-5			PL-4		
RPL-6			PL-5		
RPL-7			PL-6		
RTL-1			TL-1		
RTL-2			TL-2		
RTL-3	Mérida	Testa	TL-3	Hopelchén	Testa
RTL-4			TL-4		
RTL-5			TL-5		
RSL-1			SL-1		
RSL-2			SL-2		
RSL-3	Mérida	Semilla	SL-3	Hopelchén	Semilla
RSL-4			SL-4		
RSL-5			SL-5		
RSL-6			SL-6		

En las Tablas 10-11 se presentan los resultados de las diferentes pruebas realizadas para la identificación morfo-fisiológica y bioquímica de las levaduras. En la prueba de tolerancia a diferentes temperaturas solamente se consideró 40 °C, sin embargo se observó que algunos aislamientos aún tenían crecimiento a esta temperatura, por lo que se incubaron a 42 y 45 °C, aunque algunos crecieron a los 42 °C, a los 45 °C ningún aislado mostró crecimiento.

Tabla 10. Resultados de las pruebas fisiologicas y bioquimicas realizadas a los aislados de levaduras obtenidos de frutos de ramón del municipio de Mérida.

Prueba Clave	RPL-1	RPL-2	RPL-3	RPL-4	RPL-5	RPL-6	RPL-7	RTL-1	RTL-2	RTL-3	RTL-4	RTL-5	RSL-1	RSL-2	RSL-3	RSL-4	RSL-5	RSL-6	
Fermentación																			
Glucosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Galactosa	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
Sacarosa	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
Maltosa	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-
Lactosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Rafinosa	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+
Almidón	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Temperatura																			
30 °C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
36 °C	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
40 °C	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+
42 °C	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+
Asimilación																			
D-Galactosa	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
Cicloheximida (actidiona)	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+
D-Sacarosa	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
N-acetil- glucosamina	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
Ácido Láctico	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+
L-Arabinosa	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+
D-Celobiosa	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+
D-Rafinosa	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+
D-Maltosa	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+

+: Positivo

-: Negativo

Tabla10. Resultados de las pruebas fisiologicas y bioquimicas realizadas a los aislados de levaduras obtenidos de frutos de ramón del municipio de Mérida (continuacion).

Prueba Clave	RPL-1	RPL-2	RPL-3	RPL-4	RPL-5	RPL-6	RPL-7	RTL-1	RTL-2	RTL-3	RTL-4	RTL-5	RSL-1	RSL-2	RSL-3	RSL-4	RSL-5	RSL-6	
Asimilación																			
D-Trehalosa	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2-Cetogluconato de potasio	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
α Metil-D-Glucopiranosido	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+
D-Manitol	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
D-Lactosa (origen bovina)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Inositol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Base nitrogenada	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Sorbitol	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
D-Xilosa	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
D-Ribosa	-	+	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-
Glicerol	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
L-Ramnosa	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Palatinosa	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+
Erithritol	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+
D-Melobiosa	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+
Glucuronato de sodio		-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
D-Melecitosa	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
Gluconato de potasio	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
Levulinato	+	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+
D-Glucosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-Sorbosa	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
Glucosamina	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Esculina-citrato-férrico	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

+: Positivo

-: Negativo

Tabla 11. Resultados de las pruebas fisiologicas y bioquimicas realizadas a los aislados de levaduras obtenidos de frutos de ramón del municipio de Hopelchén, Campeche

Prueba Clave	PL-1	PL-2	PL-3	PL-4	PL-5	PL-6	TL-1	TL-2	TL-3	TL-4	TL-5	SL-1	SL-2	SL-3	SL-4	SL-5	SL-6
Fermentación																	
Glucosa	+ ^b	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Galactosa	+ ^b	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-
Sacarosa	+ ^b	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-
Maltosa	+ ^a	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-
Lactosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Rafinosa	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
Almidón	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Temperatura																	
30 °C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
36 °C	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+
40 °C	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
42 °C	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Asimilación																	
D-Galactosa	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-
Cicloheximida (actidiona)	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+
D-Sacarosa	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
N-acetil- glucosamina	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Ácido Láctico	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-
L-Arabinosa	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
D-Celobiosa	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
D-Rafinosa	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
D-Maltosa	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
D-Trehalosa	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-

+: Positivo

-: Negativo

Tabla 11. Resultados de las pruebas fisiológicas y bioquímicas realizadas a los aislados de levaduras obtenidos de frutos de ramón del municipio de Hopelchén, Campeche (Continuación)

Pruebas Clave	PL-1	PL-2	PL-3	PL-4	PL-5	PL-6	TL-1	TL-2	TL-3	TL-4	TL-5	SL-1	SL-2	SL-3	SL-4	SL-5	SL-6
Asimilación																	
2-Cetogluconato de potasio	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+
α Metil-D-Glucopiranosido	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-
D-Manitol	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-
D-Lactosa (origen bovina)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Inositol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Base nitrogenada	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Sorbitol	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-
D-Xilosa	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-
D-Ribosa	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-
Glicerol	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
L-Ramnosol	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-
Palatinosa	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-		+	-	-
Erithritol	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-
D-Melobiosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glucuronato de sodio	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Meleticosa	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
Gluconato de potasio	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-	+
Levulinato	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+	-		+	-	-
D-Glucosa	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-Sorbosa	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Glucosamina	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Esculina-citrato-férrico	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	.	+	-	+

+:Positivo

-: Negativo

Dado que la base de datos de Biomeriux, donde se analizaron las pruebas API 32C, es muy restringida, no se pudieron identificar todas las especies de levaduras. Por ello fue necesario hacer una identificación polifásica, en la que se usaron, los resultados de las pruebas sugeridas por Yarrow [70] y los resultados de las galerías API 32C, para hacer la identificación en la base de datos de la Colección Central Bureau voor Schimmelcultures (CBS) y luego complementarla con las monografías de levaduras de Barnett, *et al.*, [55], de Kurtzman, *et al.*, [54] y los resultados de la amplificación del dominio D1/D2 de la subunidad grande del gen 26S ADNr.

El producto de amplificación obtenido para el dominio D1/D2 fue de aproximadamente 550 pb (Figura 15). El análisis de las secuencias del dominio D1/D2 del gen 26S del ADNr de todas las cepas mostró entre un 99-100% de identidad con secuencias de especies depositadas en el GenBank (Tabla 12-13) y 98-99% de identidad con la base de datos de la CBS. Esta región es altamente conservada en levaduras y tiene una elevada variabilidad, por lo que se ha utilizado para la identificación taxonómica y estudios filogenéticos entre especies [105, 106].

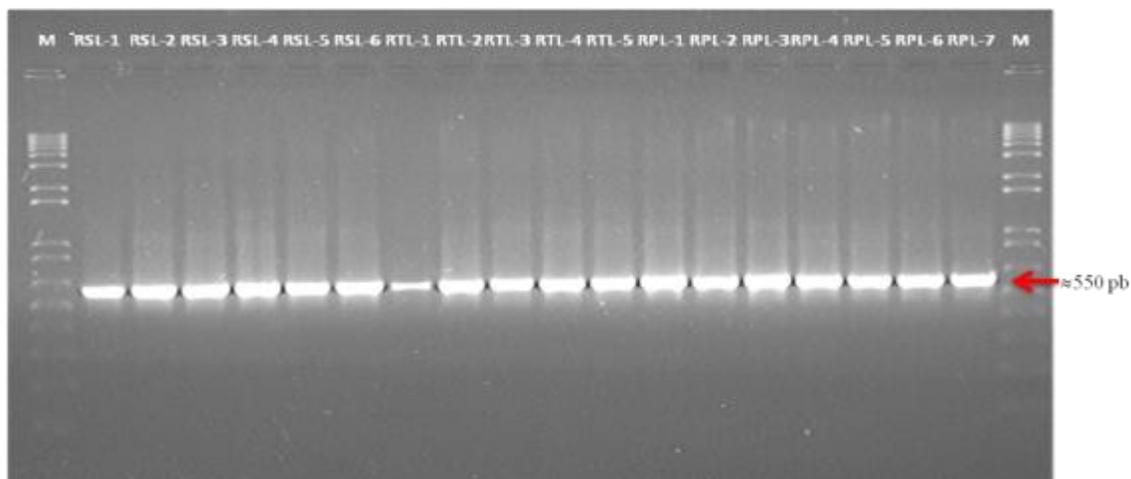


Figura 15. Producto de amplificación del dominio D1/D2 del gen 26S del ADNr de los aislados de levaduras.

Tabla 12. Identificación de los aislados de levaduras colectados en Mérida, Yucatán por comparación de sus secuencias del dominio D1/D2 del gen 26S del ADNr con la base de datos del GenBank.

Clave	Especie	% Cobertura	% de similitud	No. Acceso con respecto al GenBank
RPL-1	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	100	99	KF992155.1
RPL-2	<i>Candida natalensis</i>	100	99	KJ794716
RPL-3	<i>Candida oleophila</i>	99	99	KF830179.1
RPL-4	<i>Candida quercitrusa</i>	100	99	EF375703
RPL-5	<i>Candida quercitrusa</i>	99	99	EF375703.1
RPL-6	<i>Candida quercitrusa</i>	100	100	EF375703
RPL-7	<i>Candida natalensis</i>	100	100	AB436394
RTL-1	<i>Debaryomyces nepalensis</i>	100	99	KJ705003.1
RTL-2	<i>Candida natalensis</i>	100	100	KJ794716.1
RTL-3	<i>Candida oleophila</i>	99	100	KF830179.1
RTL-4	<i>Candida quercitrusa</i>	100	100	EF375703.1
RTL-5	<i>Candida quercitrusa</i>	99	100	EF375703.1
RSL-1	<i>Debaryomyces nepalensis</i>	100	100	KJ705003.1
RSL-2	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	100	100	HM627056.2
RSL-3	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	100	100	KM279364.1
RSL-4	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	97	99	KJ794711.1
RSL-5	<i>Debaryomyces nepalensis</i>	100	100	KJ705003.1
RSL-6	<i>Debaryomyces nepalensis</i>	100	100	JN544061.1

Tabla 13. Identificación de los aislados levaduras colectados en Hopelchén, Campeche, por comparación de sus secuencias del dominio D1/D2 del gen 26S del ADNr con la base de datos del GenBank.

Clave	Especie	% Cobertura	% de similitud	No. Acceso con respecto al GenBank
PL-1	<i>Candida. tropicalis</i>	100	99	EU543670.1
PL-2	<i>Candida. tropicalis</i>	99	99	KC544468.1
PL-3	<i>Candida tropicalis</i>	100	100	KC544465.1
PL-4	<i>Hanseniaspora thailandica</i>	99	99	KJ095633.1
PL-5	<i>Kodamea ohmeri</i>	100	100	JX068673.1
PL-6	<i>Kodamea ohmeri</i>	99	99	KP866696.1
TL-1	<i>Wickerhamomyces ciferri</i>	96	99	EF550339.1
TL-2	<i>Pichia kudriavzevii</i>	100	99	KJ472906.1
TL-3	<i>Hanseniaspora guilliermondii</i>	98	99	AM748540.1
TL-4	<i>Candida cylindracea</i>	100	99	LC054315.1
TL-5	<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	100	99	KC111446.1
SL-1	<i>Wickerhamomyces ciferri</i>	98	99	EF550339.1
SL-2	<i>Hanseniaspora thailandica</i>	99	99	KJ095633.1
SL-3	<i>Wickerhamomyces rabaulensis</i>	97	100	AB858455.1
SL-4	<i>Hanseniaspora thailandica</i>	98	99	DQ404527.1
SL-5	<i>Wickerhamomyces ciferrii</i>		99	AB772427.1
SL-6	<i>Hanseniaspora guilliermondii</i>	98	99	AB773391.1

De los 35 aislamientos, las especies más abundantes fueron *C. quercitrusa* y *D. nepalensis* halladas en Mérida, con 5 y 4 aislamientos respectivamente (Tabla 14). Las especies más abundantes en el municipio de Hopelchén fueron *C. tropicalis*, *H. thailandica* y *W. ciferri* con 3 aislamientos cada una. Como en el caso de las bacterias, en la localidad de Hopelchén se encontró una mayor diversidad de especies, de igual forma puede notarse que no hay coincidencias entre las especies de una localidad con la otra, lo cual se le atribuye a lo

explicado anteriormente en el caso de las bacterias y que coincide con lo planteado por Iwen, *et al.*, [105] y Sampai, *et al.*, [106].

Tabla 14. Especies de levaduras y numero de aislados obtenidos a partir de frutos de ramón colectados en los municipios de Mérida, Yucatán y Hopelchén, Campeche.

Especie	Aislamientos	Localidad	Clave
<i>C. quercitrusa</i>	5		RPL-4, RPL-5, RPL-6, RTL-4, RTL-5
<i>D. nepalensis</i>	4		RTL-1, RSL-1, RSL-5, RSL-6
<i>C. natalensis</i>	3	Mérida	RPL-2, RPL-7, TRL-2
<i>M. guilliermondii</i>	2		RSL-3, RSL-4
<i>H. uvarum</i>	2		RPL-1, RSL-2
<i>C. oleophila</i>	2		RPL-3, RTL-3
<i>C. tropicalis</i>	3		PL-1, PL-2, PL-3
<i>H. thailandica</i>	3		PL-4, SL-2, SL-4
<i>W. ciferri</i>	3		TL-1, SL-1, SL5
<i>K. ohmeri</i>	2		PL-5, PL-6
<i>H. guilliermondii</i>	2	Hopelchén	TL-3, SL-6
<i>H. opuntiae</i>	1		TL-5
<i>W. rabaulensis</i>	1		SL-3
<i>P. kudriavzevi</i>	1		TL2
<i>C. cylindracea</i>	1		TL-4

En las tablas 15-16, se presentan los resultados de la prueba de tolerancia a etanol. Como se muestra se encontraron diferencias entre las cepas en cuanto al nivel de tolerancia a etanol. Las especies que presentaron mayor tolerancia fueron: *C. quercitrusa* (RPL-5) y *W. ciferri* (SL-1), con una tolerancia a 10% (v/v) de etanol, *H. thailandica* (SL-2) a un 11% (v/v), y las cepas *C. quercitrusa* (RPL-4), *C. natalensis* (RPL-7), *C. reilenensis* (RTL-3), *K. ohmeri* (PL-6), *H. uvarum* (RSL-2), *D. nepalensis* (RSL-1, RSL-5 y RSL-6), *C. tropicalis* (PL-1, PL-2, PL-3) y *M. guilliermondii* (RSL-3 y RSL-4) toleraron hasta un 12% (v/v) de etanol.

Es interesante destacar que se hallaron diferencias entre aislamientos de la misma especie en cuanto a la tolerancia a etanol. Los resultados muestran que algunas cepas tienen un poder alcohológeno alto al tolerar entre un 10-12 % (v/v) de alcohol [107], estos resultados coinciden con lo reportado para las especies *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces marxianus*, *Candida valida*, especies más utilizadas en la producción de bebidas fermentadas, que alcanzan una tolerancia de un 10 a 12% de etanol [108, 109, 110]. Por lo que las especies evaluadas en este trabajo son promisorias para la producción de etanol.

Tabla 15. Resultados de la tolerancia a etanol de los aislados de levaduras colectados en Mérida, Yucatán.

Tejido	Clave	Especie	% Etanol						
			6	7	8	9	10	11	12
Pericarpio	RPL-1	<i>H. uvarum</i>	+	-	-	-	-	-	-
	RPL-2	<i>C. natalensis</i>	+	-	-	-	-	-	-
	RPL-3	<i>C. oleophila</i>	+	-	-	-	-	-	-
	RPL-4	<i>C. quercitrusa</i>	+	+	+	+	+	+	+
	RPL-5	<i>C. quercitrusa</i>	+	+	+	+	+	-	-
	RPL-6	<i>C. quercitrusa</i>	-	-	-	-	-	-	-
	RPL-7	<i>C. natalensis</i>	+	+	+	+	+	+	+
Testa	RTL-1	<i>D. nepalensis</i>	+	-	-	-	-	-	-
	RTL-2	<i>C. natalensis</i>	+	-	-	-	-	-	-
	RTL-3	<i>C. oleophila</i>	+	+	+	+	+	+	+
	RTL-4	<i>C. quercitrusa</i>	-	-	-	-	-	-	-
	RTL-5	<i>C. quercitrusa</i>	-	-	-	-	-	-	-
Semilla	RSL-1	<i>D. nepalensis</i>	+	+	+	+	+	+	+
	RSL-2	<i>H. uvarum</i>	+	+	+	+	+	+	+
	RSL-3	<i>M. guilliermondii</i>	+	+	+	+	+	+	+
	RSL-4	<i>M. guilliermondii</i>	+	+	+	+	+	+	+
	RSL-5	<i>D. nepalensis</i>	+	+	+	+	+	+	+
	RSL-6	<i>D. nepalensis</i>	+	+	+	+	+	+	+

+: Positivo

-: Negativo

Tabla 16. Resultados de la tolerancia a etanol de los aislados de levaduras colectados en Hopelchén, Campeche.

Tejido	Clave	Especie	% Etanol						
			6	7	8	9	10	11	12
Pericarpio	PL-1	<i>C. tropicalis</i>	+	+	+	+	+	+	+
	PL-2	<i>C. tropicalis</i>	+	+	+	+	+	+	+
	PL-3	<i>C. tropicalis</i>	+	+	+	+	+	+	+
	PL-4	<i>H. thailandica</i>	-	-	-	-	-	-	-
	PL-5	<i>K. ohmeri</i>	+	+	+	-	-	-	-
	PL-6	<i>K. ohmeri</i>	+	+	+	+	+	+	+
Testa	TL-1	<i>W. ciferri</i>	+	+	+	-	-	-	-
	TL-2	<i>P. kudriavzevii</i>	+	+	+	-	-	-	-
	TL-3	<i>H. guilliermondii</i>	+	+	+	+	-	-	-
	TL-4	<i>C. cylindracea</i>	-	-	--	-	-	-	-
	TL-5	<i>H. opuntiae</i>	+	+	+	-	-	-	-
Semilla	SL-1	<i>W. ciferri</i>	+	+	+	+	+	-	-
	SL-2	<i>H. thailandica</i>	+	+	+	+	+	+	-
	SL-3	<i>W. rabaulensis</i>	-	-	-	-	-	-	-
	SL-4	<i>H. thailandica</i>	+	+	+	-	-	-	-
	SL-5	<i>W. ciferrii</i>	-	-	-	-	-	-	-
	SL-6	<i>H. guilliermondii</i>	+	+	+	-	-	-	-

+: Positivo

-: Negativo

3.3. Hidrólisis de almidón

De las 69 cepas aisladas nueve presentaron actividad amilolítica en placa, la mayoría de las cepas con esta capacidad fueron hongos filamentosos (siete aislamientos), seguidos de las bacterias (dos aislamientos) (Tabla 17), en el caso de los aislamientos de levaduras ninguna fue positiva a esta prueba.

Tabla 17. Especies de hongos filamentosos y bacterias con capacidad amilolítica.

Clave	Tejido	Capacidad amilolítica	Especie
RCP-1	Pericarpio	+	<i>A. oryzea</i>
CSH-1	Semilla	+	<i>P. citrinum</i>
CSH-3	Semilla	+	<i>A. ustus</i>
RSH-1	Semilla	+	<i>P. citrinum</i>
RSH-2	Semilla	+	<i>A. niger</i>
RSH-1E	Semilla	+	<i>A. flavus</i>
RSH-2E	Semilla	+	<i>A. niger</i>
CS-4	Semilla	+	<i>C. citrium</i>
CS-6	Semilla	+	<i>C. citrium</i>

+: Positivo

Como se puede observar, todas las especies de *Aspergillus* fueron positivas a esta prueba, coincidiendo con lo reportado en varios estudios donde se menciona que los géneros *Aspergillus* y *Penicillium*, son los que presentan mayor actividad enzimática y también que son los más importantes recursos fúngicos en la producción de enzimas amilasas para el uso industrial [111, 112, 113].

Las especies que tuvieron mayor capacidad amilolítica fueron *A. flavus* y *A. niger* coincidiendo con lo reportado por Sanchis, *et al.*, [114] que evaluaron cepas de *A. flavus*, y todas fueron positivas a esta prueba (Figura 16). Sin embargo la especie más reconocida por su capacidad amilolítica es *A. niger* [115, 116, 117].

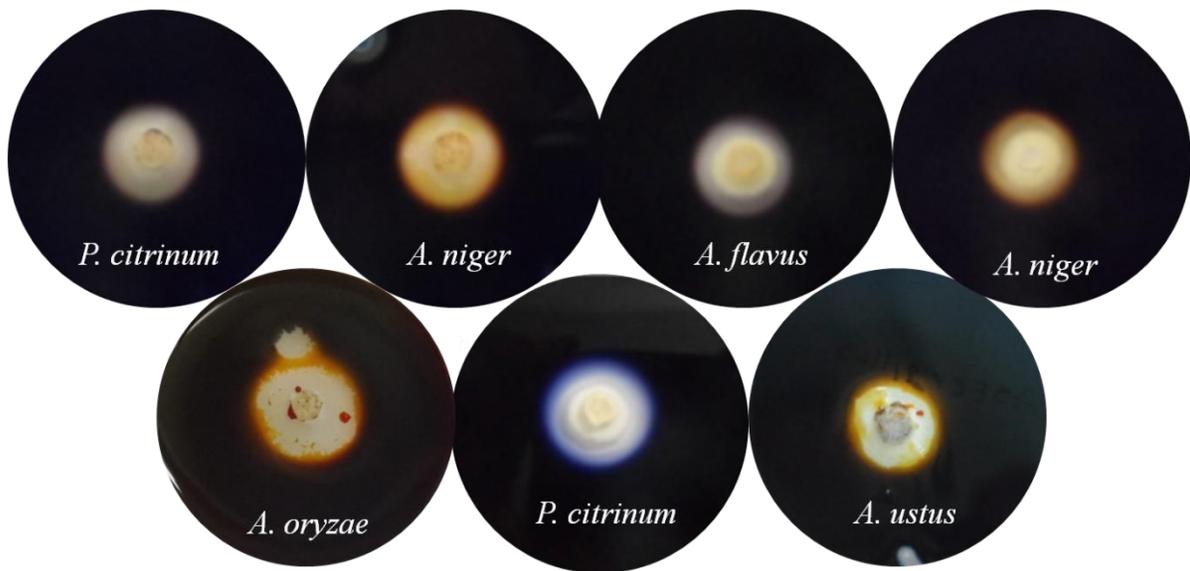


Figura 16. Placas de medio extracto de levadura-agar-almidón inoculadas con los hongos aislados y adicionadas con lugol para detectar la actividad amilasa.

Con respecto a los aislados de *C. citrium* (CS-4 y CS-6), ambos fueron positivos a esta prueba como puede observarse en la Figura 17. En ambas placas de ELAA se observó un halo hialino alrededor de las colonias, lo que sugiere que estas cepas son capaces de hidrolizar el almidón, sin embargo, esta especie no está reportada como productora de amilasas, pues sólo se consideran como bacterias amilolíticas a algunas especies de los géneros *Bacillus*, *Clostridium*, *Cytophaga*, *Streptococcus*, [46, 118, 119, 120].

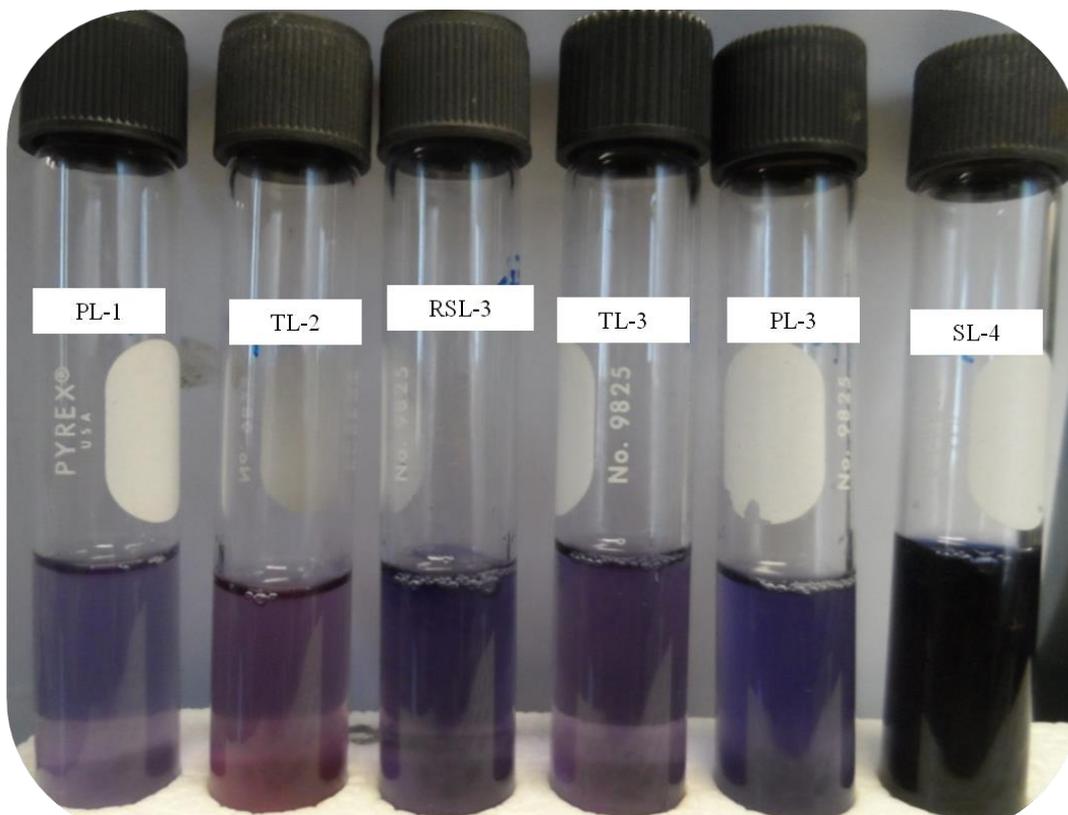


Figura 17. Aislamientos de *C. citrium* con reacción positiva a la prueba de lugol.

En el caso de las levaduras, en la hidrólisis de almidón en placa no se observó la formación del halo alrededor de la colonia, por lo que se consideró negativa a la producción de la enzima amilasa.

En medio líquido la prueba de hidrólisis de almidón fue positiva en los hongos filamentosos y las bacterias, coincidiendo con la prueba en placa, mientras que las levaduras sólo lograron la hidrólisis parcial del almidón en medio líquido.

En ninguno de los tubos de levaduras se observó una reacción dextrinoide (que indica la hidrólisis parcial del almidón a dextrina), ni amilolítica completa, ya que ninguno de los tubos presentó una coloración amarilla al adicionar el lugol, sólo se observaron coloraciones violeta claro, indicativas de una degradación parcial del almidón (Figura 18).



C. tropicalis *P. kudriavzevii* *M. guilliermondii* *H. guilliermondii* *C. tropicalis* *H. thailandica*

Figura 18. Asimilación de almidón en medio líquido por diferentes especies de levaduras.

Las levaduras que dieron una reacción parcial a esta prueba fueron: *C. tropicalis* (PL-1, PL-3), *P. kudriavzevii* (TL-2), *M. guilliermondii* (RSL-3), y *H. guilliermondii* (TL-3), ya que en todos los tubos se observó una coloración violácea lo que indica presencia de almidón.

Estos resultados son de gran importancia, ya que es el primer reporte de microorganismos aislados del ramón, con una capacidad amilolítica parcial, lo cual da paso a la evaluación de dichos microorganismos para la posible producción de etanol. Debido a que las especies *A. niger* y *C. tropicalis* son utilizadas internacionalmente para la producción de α -amilasas y para producción de etanol [115, 121, 122, 123], fueron evaluadas por Olguín (comunicación personal, 2015) en harina de semillas de ramón, y se obtuvieron producciones de 80 y 166 L/ton de etanol respectivamente.

CONCLUSIONES

- Se aislaron en total 69 cepas de microorganismos a partir del fruto del ramón, las cuales se dividieron en tres géneros de hongos filamentosos, 12 géneros de bacterias y 7 géneros de levaduras. La mayor diversidad de la micobiota (24 especies) se encontró en el municipio de Hopelchén, Campeche.
- Trece cepas mostraron actividad amilolítica, seis especies de hongos filamentosos pertenecientes a los géneros *Aspergillus* (5 especies) y dos cepas de *Penicillium citrinum*, 4 especies de levaduras: *Candida tropicalis*, *Pichia kudriavzevi*, *Meyerozyma guilliermondii* y *Hanseniaspora guilliermondii* y dos aislamientos de la bacteria *Curtubacterium citrium*.
- La mayor tolerancia a etanol fue al 12% y la mostraron las especies: *C. quercitrusa*, *C. natalensis*, *C. reilenensis*, *K. ohmeri*, *H. uvarum*, *D. nepalensis*, *C. tropicalis*, *M. guilliermondii*, *W. ciferrii* y *H. thailandica*.
- Las especies con mayor potencial para la producción de etanol a partir de almidón de ramón, dada su capacidad amilolítica y tolerancia a etanol son: *Candida tropicalis*, *Meyerozyma guilliermondii* y *Aspergillus niger*.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] S.-H. Ho; W.-M. Che; J.-S. Chang, *Scenedesmus obliquus* CNW-N as a potential candidate for CO₂ mitigation and biodiesel production, *Bioresource Technol.*, 101, (22), 8725-8730, 2010.
- [2] F. Manzini; P. Macías, Nuevas energías renovables: una alternativa energética sustentable para México (Análisis y Propuesta), México, D. F., 2004.
- [3] P. Rufes, Energía solar térmica: Técnicas para su aprovechamiento, Barcelona: S. A. Marcombo, 2010, p. 320.
- [4] Programa especial para el aprovechamiento de Energías Renovables, 2009. [En línea].
<http://www.sener.gob.mx/webSener/res/0/Programa%20Energias%20Renovables.pdf>. [Último acceso: 14 Mayo 2014].
- [5] Secretaría. de Energía, Energías Renovables, 2012. [En línea].
<http://www.renovables.gob.mx/portal/Default.aspx?id=1669&lang=1>. [Último acceso: 14 Mayo 2014].
- [6] N. Y. Amponsah; M. Troldborg; B. Kington; I. Aalders; R. Hough, Greenhouse gas emissions from renewable energy sources: A review of lifecycle considerations, *Renew. Sust. Energ. Rev.*, 39, 461-475, 2014.
- [7] A. I. E., Bioenergy, 2013. [En línea]: <http://www.iea.org/topics/bioenergy/>. [Último acceso: 14 Mayo 2014].
- [8] A. V. Alarcón, Producción de bioetanol con *Zymomonas mobilis*, Tesis de Maestría, Instituto Politécnico Nacional, México, 2010.
- [9] H. Balat; C. ÖZ, Progress in bioethanol processing, *Prog. Energy Combust. Sci.*, 34, 551-573, 2008.
- [10] T. D. Pennington; J. Sarukhán, Árboles tropicales de México: manual para la identificación de campo de las principales especies., 3 ed., México, D. F.: FAO, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, 1968, p. 413.

- [11] M. C. Peters; E. Pardo-Tejeda, *Brosimum alicastrum* (Moraceae): uses and potential in Mexico, *Econ. Bot.*, (36), 166-175, 1982.
- [12] Z Barquera B., Obtencion de bioetanol a partir de semillas de ramon (*Brosimum alicastrum* Sw), Tesis de Maestría, Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C., México, 2013.
- [13] M. Meiners; C. Sánchez; S. Blois, El ramón: fruto de nuestra cultura y raíz para la conservación, *CONABIO. Biodiversitas*, (87), 7-10, 2009.
- [14] R. M. Burns; M. S. Mosquera; J. L. Whitmore, Useful Trees of the Tropical Region of North America, Washington, DC, U. S. A.: North American Forestry Commission, 1998, p. 447.
- [15] E. Pardo-Tejeda; M. C. Sánchez, *Brosimum alicastrum*: ramón, capomo, ojite, ojoche. Recurso silvestre tropical desaprovechado, vol. 31, Xalapa, Ver, México: Instituto Nacional de Investigaciones sobre Recursos Bióticos (INIREB), 1980, pp. 1-8.
- [16] A. Vega; J. I. Valdez; V. M. Cetina, Zonas ecológicas de *Brosimum alicastrum* Sw. en la costa del Pacífico mexicano, *Madera y bosques*, 9 (1), 27-53, 2003.
- [17] J. Raedowski, The northern limit of tropical rain forest in continental North America, *Vegetation*, (11), 173-198, 1963.
- [18] T. D. Pennington; J. Sarukhan, Árboles tropicales de México, México, D. F., Universidad Autónoma de México: Fondo de Cultura Económica, 2005, pp. 138-139.
- [19] E. Morales; L. Herrera, ramón (*Brosimum alicastrum* Swartz). Protocolo para su colecta, beneficio y almacenaje, CONAFOR, México, 2009.
- [20] A. Gillespie; D. M. Bocanegra-Ferguson; J. Jimenez, The propagation of ramón (*Brosimum alicastrum* Sw.; Moraceae) in Mayan homegardens of the Yucatan peninsula of Mexico, *New Forest.*, 27 (1), 25-38, 2004.
- [21] I. N. B, Información sobre especímenes, 2003. [En línea]. <http://atta.inbio.ac.cr/>. [Último acceso: 12 08 2011].

- [22] J. Petit, Árboles y arbustos forrajeros, Mérida, Venezuela: Instituto Forestal Latinoamericano, 1994, p. 14.
- [23] C. C. Berg, *Brosimum alicastrum* Sw. subsp. *alicastrum*, *Manejo de semillas de 100 especies forestales de América Latina*, 1, Turrialba, CATIE, 2000, p. 175.
- [24] J. Cordero; D. Boshier, Árboles de Centroamerica: un manual para extensionistas, Costa Rica: Bib. Orton IICA/CATIE, 2003, p. 1079.
- [25] B. Ojeda, Planeación y establecimiento de la colección de plantas: jardín etnobotánico Alfredo Herrera Vázquez de la UADY, Mérida, Yucatán, 1996.
- [26] B. U. Aragón, Caracterización preliminar del ramón (*Brosimum alicastrum* Swats), *in situ* en el bosque muy húmedo subtropical cálido del Petén, Guatemala, 1990.
- [27] R. Huchin, Estudio preliminar de la floración, la formación del fruto y la germinación de *Brosimum alicastrum*, Instituto Tecnológico de Conkal, Conkal, Yucatán, 2013.
- [28] F. Geilfus, El árbol al servicio del agricultor. Manual de agroforestería para el desarrollo rural, ENDA-CATIE, Turrialba, Costa Rica, 1994.
- [29] D. Alvarado; J. R. Sosof; M. S. Sánchez, Búsqueda, colecta, caracterización y preservación de materiales de ramón (*Brosimum alicastrum*) en la región Sur-Occidental de Guatemala, IIDESO-CUNSUROC, Guatemala, 2006.
- [30] O. E. Martínez; F. González, Vegetación del sureste de Tamaulipas, México, *Biotica*, 2 (2), 1-45, 1977.
- [31] A. Ayala; S. M. Sandoval, Establecimiento y producción temprana de forraje de ramón (*Brosimum alicastrum* Swartz) en plantaciones a altas densidades en el norte de Yucatán, *Agrofor. Am.*, 7, 10-16, 1995.
- [32] H. E. Cuanalo, Suelos del Campo Experimental Forestal "El Tormento", Campeche, *Boletín Técnico, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales*, 1(15), 35, 1964.
- [33] J. F. Morton, Some folk-medicine plants of Central American markets, *Q. J. Crude Drug Res.*, 15 (4), 165-192, 1977.

- [34] C. B. Díaz; R. E. Sosa, ramón. Manual de agroforestería para la Península de Yucatán, ICRAF-México, Chetumal, Quintana Roo, 1999.
- [35] R. Bressani; FAO, *Frutales. Valor nutritivo y usos en la alimentación humana de algunos cultivos autóctonos subexplotados de Mesoamérica, Chile*, Santiago de Chile, 1993.
- [36] Vegan peace: striving towards peacefully sharing our Earth, [En línea]. http://www.veganpeace.com/nutrient_information/nutrient_content_tables/display_tables/nuts_seeds/nuts_seeds2.htm. [Último acceso: 23 febrero 2014].
- [37] A. Bahaji; J. Li; A. M. Sánchez-López; E. Baroja-Fernández; F. J. Muñoz; M. Ovecka; G. Almagro; M. Montero; I. Ezquer; E. Etxeberria; J. Pozueta-Romero, Starch biosynthesis, its regulation and biotechnological approaches to improve crop yields, *Biotechnol. Adv.*, 32, 87-106, 2014.
- [38] M. J. E. C. Maarel; B. Veen; J. C. M. Uitdehaag; H. Leemhuis; L. Dijkhuizen, Properties and applications of starch-converting enzymes of the α -amylase family, *J. Biotechnol.*, 94 (2), 137-155, 2002.
- [39] R. F. Tester; J. Karkalas; X. Qi, Starch-composition, fine structure and architecture, *J. Cereal Sci.*, 39 (2) 151-165, 2004.
- [40] J. Meneses; C. M. Corrales; M. Valencia, Síntesis y caracterización de un polímero biodegradable a partir del almidón de Yuca, *Revista EIA*, (8), 57-67, 2007.
- [41] W. G. C. Banks, *Starch and its components*, Michigan: Wiley, 1975.
- [42] A. C. Bertolini, *Starches: characterization, properties and applications*, New York: Taylor and Francis Group, LLC, 2010, p. 290.
- [43] A. Buléon; P. Colonna; V. Planchot; S. Ball, Starch granules: structure and biosynthesis, *Int. J. Biol. Macromol.*, 23, 85-112, 1998.
- [44] A.-C. Eliasson, *Starch in food: Structure, function and applications*, Cambridge England: Woodhead Publishing Limited, 2004.
- [45] A. M. Smith; K. Denyer; S. C. Zeema; A. Edwards; C. Martin, The synthesis of the starch granule, *Annu. Rev. Plant Physiol.. Plant Mol. Biol.*, 48, 67-87, 1997.

- [46] A. Pandey; P. Nigam; C. Soccol; V. Soccol; D. Singh; R. Mohan, Advances in microbial amylases, *Biotechnol. Appl. Biochem*, 31 (4), 135-152, 2000.
- [47] R. Gupta; P. Gigras; H. Mohapatra; V. K. Goswani; B. Chaihan, Microbial α -amylases: a biotechnological perspective, *Process Biochem.*, 38 (11), 1599-1616, 2003.
- [48] M. T. Madigan; J. M. Martinko; J. Parker; M. Sánchez, Brock: Biología de los microorganismos, 10 ed., Pearson, Préntince Hall, 2004, p. 1011.
- [49] A. K. McCann; J. Barnett, The utilization of starch by yeasts, *Yeast*, 2 (2). 109-115, 1986.
- [50] B. K. Lonsane; M. V. Ramesh, Production of bacterial thermostable α -amylase by solid state fermentation: a potential tool for achieving economy in enzyme production and starch hydrolysis, San Diego California: Academic Press, 1990.
- [51] A. Rojas-Triviño, Conceptos y prácticas de microbiología general, Universidad Nacional de Colombia, Sede Palmira, Colombia, 2011.
- [52] V. Loureiro, Spolage yeast in foods and beverages: characterization and ecology for improved diagnosis and control, *Food Res. Int.*, 33, 247-256, 2000.
- [53] M. Mokhtari; H. R. Etebarian; S. H. Mirhendi; M. Razavi, Identification and phylogeny of some species of the genera *Sporidiobolus* and *Rhodotorula* using analysis of the 5.8S rDNA gene and two Ribosomal Internal Transcribed Spacers, *Arch. Biol. Sci*, 63, 79-88, 2011.
- [54] C. Kurtzman; J. W. Fell; T. Boekhout, The yeasts. A taxonomy study, Amsterdam: ELSEVIER, 2011.
- [55] J. A. Barnett; R. W. Payne; D. Yarrow, Yeast characteristics and identification, Cambridge: Cambridge University Press, 2000.
- [56] W. C. Frazier; D. C. Westhoff, Microbiología de los alimentos, Zaragoza, España: Acribia, 1993.
- [57] D. Mossel; B. Moreno; C. Struijk, Microbiología de los alimentos, 2 ed., Zaragoza, España: Acribia, 2003.

- [58] L. Carrillo; M. C. Audisio; N. V. Bejarano; S. E. Gómez; G. Ancasi; M. Benítez, Manual de microbiología de los alimentos, San Sallvador de Jujuy: Asociación Cooperadora de la Facultad de Ciencias Agrarias, 2007.
- [59] L. B. Reller; M. P. Weinstein, Detection and identification of microorganisms by gene amplification and sequencing, *Clin. Infect. Dis.*, 44 (8), 1108-1114, 2007.
- [60] J. G. Holt; N. R. Krieg; P. H. A. Sneath; J. T. Staley; S. T. Williams, Bergey's Manual of determinative bacteriology, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000.
- [61] N. G. Agrios, Plant pathology, 5 ed., San Diego California: Elsevier Academic Press, 2005.
- [62] N. Capote; A. M. Pastrana; A. Aguado; P. Sánchez-Torres, Molecular tools for detection of plant pathogenic fungi and fungicide resistance, de *Plant Path. edited by Dr. Cristian Joseph Cumagun*, InTech, 2012, p. 362.
- [63] H. A. McCartney; S. J. Foster; B. A. Fraaije; E. Ward, Molecular diagnostics for fungal plant pathogens, *Pest Manag. Sci.*, 59 (2), 129-142, 2003.
- [64] G. H. Fleet, Yeast in food and beverages: impact on production quality and safety, *Curr. Opin. Biotech.*, 18, 170-175, 2007.
- [65] W. F. Doolittle; O. Zhaxybayeva, On the origin of prokaryotic species, *Genome Res.*, 19, 744-756, 2009.
- [66] R. Temmerman; G. Huys; J. Swings, Identification of latic acid bacteria: culture-dependent and culture independent methods, *Trends Food Sci. Tech.*, 15, 348-359, 2004.
- [67] J. C. Goud; A. J. Termorshuizen, Quality of methods to quantify microsclerotia of *Verticillium dahliae* in soil, *Eur. J. Plant Pathol.*, 109, 523-534, 2003.
- [68] H. L. Barnett; B. B. Hunter, Illustrated genera of imperfect fungi, Fourth ed., Saint Paul, Minnesota: APS Press, 1998.
- [69] T. Watanabe, Pictorial Atlas of Soil and Seed Fungi: Morphologies of Cultured Fungi and Keys, CRC Press LLC, 2000.

- [70] D. Yarrow, Methods for the isolation, maintenance and identification of yeasts. en Kurtzman, C.P; J. W. Fell, *The Yeasts: A Taxonomic Study*, 4th ed., Amsterdam: Elsevier, 1998.
- [71] M. A. Lachance, Yeast communities in a natural tequila fermentation, *A. Van Leeuw.*, 68 (2), 151-160, 1995.
- [72] N. W. Schaad; J. B. Jones; W. Chun, *Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria*, Third ed., St. Paul, Minnesota: The American Phytopathological Society, 2001.
- [73] M. L. Rodríguez, *Manual para la identificación de bacterias fitopatógenas*, México: Universidad Autónoma Chapingo, México, 2001.
- [74] E. W. Koneman; S. D. Allen; W. C. Winn; W. M. Janda; G. W. Procop; P. C. Schreckenberger; G. L. Woods, *Koneman. Diagnostico microbiológico: texto y atlas en color*, Buenos Aires: Panamericana, 2008.
- [75] L. Favaro; V. Corich; A. Giacomini; M. Basaglia; S. Casella, Grape marcs as unexplored source of new yeast for future biotechnological applications, *World J Microbio Biotechnol*, 29, 1551-1562, 2013.
- [76] M. Moradi; P. Shariati; F. Tabandeh; B. Yakhchali; G. Bakhshi, Screening and isolation of powerful amyolytic bacterial strain, *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci*, 3 (2), 758-768, 2014.
- [77] R. Tapia-Tussel; P. Lappe; M. Ulloa; A. Quijano-Ramayo; M. Cáceres-Farfán; A. Larque-Saavedra; D. Pérez-Brito, A rapid and simple method for DNA extraction from yeast and fungi isolated from *Agave fourcroydes*, *Mol. Biotechnol.*, 33 (1), 67-70, 2006.
- [78] D. J. Sambrook; E. F. Fritsch; T. Maniatis, *Molecular cloning: A laboratory manual*, Cold spring harbor laboratory,, New York, 1989.
- [79] T. White; T. Bruns; S. Lee; J. Taylor, Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics., de *PCR Protocols: A guide to methods and aplicaciones*. M.A. Innis; D. H. Gelfand; J. J. Sninsky and T. J. White, New

- York, Academic press, 1990, pp. 315-322.
- [80] E. S. Naumova; N. N. Sukhotina; G. I. Naumov, Molecular-genetic differentiation of the dairy yeast *Kluyveromyces lactis* and its closest wild relatives, *FEMS Yeast Res.*, (5), 263-269, 2004.
- [81] K. O. Donnell, *Fusarium* and its near relatives. In: D. R. Reynolds; J. W. Taylor, The fungal Holomorph: Mitotic, Meiotic and Pleomorphic Speciation in Fungal Systematic, Wallingford, England: CBA International, 1993.
- [82] D. Libkind; S. Brizzio; A. Ruffini; M. Gadanho; B. Broock; J. P. Sampaio, Molecular characterization of carotenogenic yeast from aquatic environments in Patagonia, Argentina, *Antonie van Leeuwenhoek*, 84, 313-322, 2003.
- [83] K. Ström; J. Sjögren; A. Broberg; S. J., *Lactobacillus plantarum* MiLAB 393 produces the antifungal cyclic dipeptides cyclo (L-Phe-L-Pro) and cyclo (L-Phe-trans-4-OH-L-Pro) and 3-Phenyllactic acid, *Appl. Environ. Microb.*, 68 (9), 4322-4327, 2002.
- [84] D. L. Lafontaine; D. Tollervey, The function and synthesis of ribosomes, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2 (7), 514-520, 2001.
- [85] T. Hall, BioEdit v7.0.9, 2007. [En línea]. [http://www.mbio.ncsu.edu/Bio-Edit/..](http://www.mbio.ncsu.edu/Bio-Edit/) [Último acceso: 15 Septiembre 2014].
- [86] I. Rosas; A. Cravioto; E. E., Microbiología ambiental, México: Programe, S. A, 2004.
- [87] E. J. Carvajal; D. Libkind; A. I. Briones; J. U. Iranzon; P. Portero; I. Roberts; S. James; P. B. Morais; C. A. Rosa, Yeasts biodiversity and its significance: case studies in natural and human-related environments, *ex situ* preservation, applications and challenges, de *Changing diversity in changing environment*, Croatia, INTECH, 2011, pp. 55-86.
- [88] D. Hiyon, Ecology of yeasts, *The Kor. J. Microbiol.*, 8 (1), 41-51, 1970.
- [89] W. T. Starmer, M. Lachance, Yeast ecology, de *The yeasts, a taxonomic study*, New York, Elsevier, 2011, pp. 65-83.

- [90] J. Lacey, Aspergilli in feeds and seeds in Powell, K. A.; Renwick, A.; Peberdy, J. F., de *The genus Aspergillus: From taxonomy and genetics to industrial application*, New York, Springer Science + Business Media, 1994, pp. 73-92.
- [91] J. W. Bennet, An overview of genus *Aspergillus* In: Machida, M.; Gomi, K., In *Aspergillus: Molecular Biology and Genomics*, Norfolk, UK, Caister Academic Press, 2010, pp. 1-17.
- [92] E. G. Huchin, Diagnóstico e identificación de enfermedades y plagas der ramón (*Brosimum alicastrum* Swarts), Tesis de Licenciatura, Yucatán, México, 2012.
- [93] B. N. Swargiari; P. K. Baruah, Isolation and screening of amyolytic *Penicillium* species from soil, *Int. J. Pharm. Biol. Sci.*, 4(1), 575-581, 2013.
- [94] J. Houbraken; J. Frisvad, Taxonomy of *Penicillium citrinum* and related species, *Fungal Divers.*, 44, 117-133, 2010.
- [95] M. A. Klich, Identification of Common *Aspergillus* species, Utrecht, The Netherlands: Centraalbureau voor Schimmelcultures, 2002.
- [96] J. I. Pitt, 1979, The Genus *Penicillium* and its Teleomorphic States *Eupenicillium* and *Talaromyces*. Academic Press. London
- [97] J. I. Pitt, 1985, A Laboratory Guide to Common *Penicillium* Species. Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization, Division of Food Research. North Ryde
- [98] Domsh K. H., Gams W., Anderson T. H. (1993). *Compendium of Soil Fungi*. IHW Verlag. Regensburg.
- [99] Samson R.A., Hoekstra E.S., Frisvad J.C. 2004. Introduction to Food and Airborne Fungi. 7a Ed. Ceentraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht
- [100] D. S. Hibbett; A. Ohman; D. Glotzer; M. Nuhn; P. Kirk; R. H. Nilsson, Progress in molecular and morphological taxon discovery in fungi and options for formal classification of environmental sequences, *Fungal Biol. Rev.*, 25, 38-47, 2011.
- [101] C. L. Schoch; K. A. Seifert; S. Huhndorf; V. Robert; J. L. Spouge, C. A. Levesque; W. Chen; F. B. Consortium, Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS)

- region as universal DNA barcode marker for fungi, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 109 (16), 6241-6246, 2012.
- [102] K. A. Seifert, Progress towards DNA bancoding of fungi, *Mol. Ecol. Resour.*, 9 (1), 83-89, 2009.
- [103] R. H. Nilsson; E. Kristiansson; M. Ryberg; N. Hallenberg, Intraespecific ITS variability in the kingdom fungi as expressed in the international sequence database and its implications for molecular species identification, *Evol. Bioinform.*, 4, 193-201, 2008.
- [104] P. Kämpfer; C.-C. Young; K. R. Srighar; A. B. Arun; W. A. Lai; F. T. Shen; P. D. Rekha, Transfer of [*Flexibacter*] *sancti*, [*Flexibacter*] *filiformis*, [*Flexibacter*] *japonensis* and [*Cytophaga*] *arvensicola* to the genus *Chitinophaga* and description of *Chitinophaga skermanii* sp.nov.» *Int. J. Syst. Evol. Micr.* 56 (9), 2223-2228, 2006.
- [105] V. Torsvik; L. Ovreas, Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems, *Curr. Opin. Microbiol.*, 5 (3), 240-245, 2002.
- [106] S. Naeem; D. Byers; S. Tjossem, *Biodiversity and ecosystem functioning: maintaining natural life support processes*, Washington, DC: Ecological Society of America, Issues in Ecology Series, 1999, p. 14.
- [107] A. W. Ashiru; O. D. Teniola; N. N. Dibiana; A. Apena, Isolation of starch degrading spoilage bacteria from 'Ogi' (Fermenting Maize Starch), *Pak. J. Nut.*, 11 (3), 243-246, 2012.
- [108] S. B. Oyeleke; S. H. a. E. E. C. Auta, Production and characterization of amylase produced by *Bacillus megaterium* isolated from a local yam peel dumpsite in Minna, Niger State, *J. Microbiol. Antimicrob.*, 2 (7), 88-92, 2010.
- [109] P. Iwen; S. H. Hinrichs; M. E. Rupp, Utilization of the internal transcribed spacer regions as molecular targets to detect and identify human fungal pathogens, *Med. Mycol.*, 40, 87-109, 2002.
- [110] J. P. Sampai; M. Weib; M. Gadanho; R. Bauer, New taxa in the Tremellales:

Bulleribasidium oberjochense gen. et sp. nov., *Papiliotrema bandonii* gen. et sp. nov. and *fibulobasidium murrhardtense* sp. Nov., *Mycologia*, 94, 873-887, 2002.

- [111] E. Collado, Levaduras y la fermentación alcohólica, Collado, Q., 27 Noviembre 2001. [En línea]. <http://www.verema.com/articulos/500449-levaduras-fermentacion-alcoholica-ii>. [Último acceso: 2 Octubre 2015].
- [112] A. R. Estrada-Godina; A. E. Cruz-Guerrero; P. Lappe; M. Ulloa; M. García-Garibay; L. Gómez-Ruiz, Isolation and identification of killeryeasts from Agave sap (aguamiel) and pulque, *World J. Microb. Biot.*, 17 (6),. 557-560, 2001.
- [113] R. J. Bothast; M. Schlicher, Biotechnological processes for conversion of corn into ethanol, *Appl. Microbiol. Biot.*, 67 (1), 19-25, 2005.
- [114] J. A. Quintero; M. I. Montoya; O. J. Sánchez; C. A. Cardona, Evaluación de la deshidratación de alcohol carburante mediante simulación de procesos, *FCA*, 5 (2), 72-83, 2007.
- [115] L. Hankin; S. Anagnostakis, The use of solid media for detection of enzyme production by fungi, *Mycologia*, 67 (3), 597-607, 1975.
- [116] I. Khokhar; I. Mukhtar; S. Mushtaq, Isolation and screening of amyolytic filamentous fungi, *J. Appl. Sci. Environ. Manag.*, 15 (1), 203-206, 2011.
- [117] S. C. B. Gopinath; P. Anbu; A. Hilda, Extracellular enzymatic activity profiles in fungi isolated from oil-rich environments, *Mycoscience*, 46 (2), 119-126, 2005.
- [118] V. Sanchis; I. Viñas; M. Jimenez; E. Hernandez, Diferencias morfológicas y enzimáticas entre cepas de *Aspergillus flavus* productoras y no productoras de aflatoxinas, *An. Biol.*, 1, 109-114, 1984.
- [119] A. M. Omemu; I. Akpan; M. O. Bankole; O. D. Teniola, Hydrolysis of raw tuber starches by amylase of *Aspergillus niger* AM07 isolated from the soil, *Afr. J. Biotechnol.*, 4 (1), 19-25, 2005.
- [120] Z. Rodriguez; R. Boucourt; J. Rodríguez; N. Albelo; O. Nuñez; F. R. Herrera, Aislamiento y selección de microorganismos con capacidad de degradar almidón, *R. Cuban. Cien. Agr.*, 40 (3), 349-354, 2006.

- [121] N. Akeme-Esuomini, Effect of *Aspergillus niger* amylases on cassava starch hydrolysis, Zaria, Nigeria, 2013.
- [122] O. Prakash; N. Jaiswal, α -amylase: an ideal representative of thermostable enzymes, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 160 (8), 2401-2414, 2010.
- [123] C. E. S. Teodoro; M. L. L. Martins, Culture conditions for the production of thermoestable amylase by *Bacillus* sp., *Braz. J. Microbiol.*, 31, 298-302, 2000.
- [124] H. Sun; P. Zhao; X. Ge; Y. Xia; Z. Hao; J. Liu; M. Peng, Recent advances in microbial raw starch degrading enzymes, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 160 (4), 988-1003, 2010.
- [125] M. M. Abouzied; C. A. Reddy, Direct fermentation of potato starch to ethanol by co cultures of *Aspergillus niger* and *Saccharomyces cerevisiae*, *Appl. Environ. Microb.*, 52 (5), 1055-1059, 1986.
- [126] L. Jamai; K. Ettayebi; J. E. Yamani; M. Ettayebi, Production of ethanol from starch by free and immobilized *Candida tropicalis* in the presence of α -amylase, *Bioresource technol.*, 98, 2765-2770, 2007.
- [127] K. N. Varalakshmi; B. S. Kumudini; B. N. Nandini; J. Solomon; R. Suhas; B. Mahesh; A. P. Kavitha, Production and characterization of α -amylases from *Aspergillus niger* JGI 24 isolated Bangalore, *Pol. J. Microbiol.*, 58 (1), 29-36, 2009.

ANEXOS

Anexo 1. Medios de cultivo para Hongos

Agua peptonada

Reactivo	Cantidad
Peptona	1.0 g.
Tween	5.0
Agua	1000 ml

PD (Papa, dextrosa)

Reactivo	Cantidad
Trozos de papa blanca pelada	200.0 g
Dextrosa	20.0g
Agua	1000 ml

Anexo 2. Medios de cultivo para levaduras

GELPA (Glucosa-extracto de levadura-peptona-agar)

Reactivo	Cantidad
Glucosa	20.0 g.
Extracto de Levadura	5.0 g.
Peptona de caseína	10. 0 g.
Agar	20.0 g
Agua	1000 ml

Medio basal de Wicherham para fermentación de carbohidratos

Reactivo	Cantidad
Peptona	7.5 g.
Extracto de carne	4. g.
Agua	1000 ml

GELP (Glucosa-extracto de levadura-peptona)

Reactivo	Cantidad
Glucosa	20.0 g.
Extracto de levadura	5.0 g.
Peptona de caseína	10. 0 g
Agua	1000 ml

YMA (Extracto de levadura-extracto de malta)

Reactivo	Cantidad
Glucosa	10.0 g.
Extracto de Levadura	3.0 g.
Extracto de Malta	3.0 g
Peptona	5.0 g
Agua	1000 ml

Anexo 3. Medios de cultivo para bacterias

NBY (Caldo nutritivo-extracto de levaduras-agar)

Reactivo	Cantidad
Caldo nutritivo	8.0 g.
Extracto de levadura	2.0 g.
K ₂ HPO ₄	2. 0 g.
KH ₂ PO ₄	0.2 g.
Glucosa	2.5 g.
Agar	15.0 g.
Agua	1000 ml

KB (B de King)

Reactivo	Cantidad
Proteasa peptona	20.0 g.
K ₂ HPO ₄	1.5 g.
MgSO ₄ :7H ₂ O	1.5 g.
Glicerol	15 ml
Agar	15.0 g.
Agua	1000 ml

YDC (Extracto de Levadura-Dextrosa-CaCO₃)

Reactivo	Cantidad
Extracto de levadura	10.0 g.
Dextrosa o Glucosa	20.0 g.
Carbonato de Calcio	20.0 g.
Agar	15.0 g.
Agua	1000 mL

Medio para hidrólisis de urea

Reactivo	Cantidad
NH ₄ H ₂ PO ₄	0.5 g.
K ₂ HPO ₄	0.5 g.
MgSO ₄ :7H ₂ O	0.2 g.
NaCl	5.0 g
Extracto de levadura	1.0 g
Rojo de cresol	16 mg
Urea (solución acuosa 10%)	200.0 ml
Agua	800 ml

NGA (Caldo nutritivo-Glucosa-Agar)

Reactivo	Cantidad
Extracto de carne	3.0 g
Peptona	5.0 g.
Glucosa	2.5 g.
Agar	15.0 g.
Agua	1000 ml

Medio de Hugh and Leifson

Reactivo	Cantidad
Peptona	2.0 g.
NaCl	5.0 g.
KH ₂ PO ₄	0.3 g.
Agar	3.0 g.
Azul de bromotimol (solución acuosa al 10%)	3.0 ml
Agua	1000 ml

NBY (Caldo nutritivo-extracto de levadura)

Reactivo	
Caldo nutritivo	8.0 g
Extracto de Levadura	2.0 g
K ₂ HPO ₄	2.0 g
KH ₂ PO ₄	0.2 g
Glucosa	2.5 g
Agua	1000 ml

Anexo 4. Hidrólisis de almidón

ELAA (Extracto de levadura-almidón-agar)

Reactivo	Cantidad
Extracto de levadura	4.0 g
Almidón soluble	15.0 g
K ₂ HPO ₄	1.0 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5 g
Agar	20 g.
Agua	1000 ml

Anexo 5. Preparación de buffer de corrida

Buffer TE

Solución madre	Cantidad
Tris 1M,pH 8.0	10.0 ml
EDTA 0.5 M, pH 8.0	2.0 ml.
Agua destilada	1000 ml