



CUANTIFICACIÓN ESPECIE-ESPECÍFICA DE LEVADURAS EN CULTIVOS MIXTOS POR qPCR

Ma. del Socorro Ramírez González, Erika De la Cruz Arguijo, María Tamayo Ordoñez, Ricardo Sánchez Mercado, C. Patricia Larralde Corona, José A. Narváez Zapata. Instituto Politécnico Nacional - Centro de Biotecnología Genómica, Laboratorio de Biotecnología Industrial, - Reynosa, Tamaulipas. CP. 88710. E-mail: jnarvaez@ipn.mx

Palabras clave: qPCR, fermentación, *S. cerevisiae*, *K. marxianus*

Introducción. En la industria de las fermentaciones generalmente se utilizan inóculos puros de *Saccharomyces*. Sin embargo, se ha demostrado que las interacciones de diferentes géneros de levaduras pueden mejorar las características de las bebidas (1). La cuantificación de especies específicas en cultivos mixtos se realiza utilizando medios sólidos (2) pero esta puede limitarse por las diferentes habilidades de crecimiento de estas levaduras en medios específicos (3). La qPCR cuantitativa ha demostrado ser una técnica eficaz en la determinación de células viables en cultivos puros de levaduras (2), aunque su aplicación en cultivos mixtos aún está pendiente. El objetivo de este trabajo es emplear la técnica qPCR para la determinación de levaduras específicas en cultivos mixtos y su comparación con el conteo en medios sólidos.

Metodología. En este estudio se incluyeron cepas de *S. cerevisiae* (Sc3Y8) y *Kluyveromyces marxianus* (Km1Y9), mismas que fueron crecidas independientemente en medio YPD con un preinoculo de 1×10^6 cel/mL. Se monitoreo el crecimiento a las 0, 24 y 48 h por UFC/ml y por qPCR usando oligonucleótidos ITS universales (SCER-R/CESP-F) y específicos. Las curvas de calibración de los oligos se establecieron usando diluciones seriales de ADNg. El número de copias de fragmentos amplificados se relacionó con el número de células viables presentes en los cultivos independientes.

Resultados Los oligonucleótidos universales SCER-R/CESP-F fueron positivos para ambas levaduras, mientras que fue posible generar oligos específicos (~300 pb) para *S. cerevisiae* a partir de los 67°C de TM (Fig. 1). La cuantificación del ADNg de los cultivos individuales de *S. cerevisiae* y *K. marxianus* con respecto a las UFC/ml presenta una relación logarítmica (R^2) de 0.99 y 0.75, respectivamente, como consecuencia de las limitaciones metodológicas en la extracción del ADN impuestas por la fisiología de cada especie. El número de copias obtenido por qPCR utilizando los oligos universales presento grandes diferencias por especie de levadura analizada (Tabla 1).

Tabla 1. Número de copias por qPCR obtenidos por ADN y número celular usando los oligos universales.

Cepa	T (h)	Cel/ml (10^{-5})	ADN (ng)	Copias (10^{-8})
Sc 3Y8	0	5	5305	3799
	24	647	46140	117858
	48	1953	59780	78388
Km 1Y9	0	1	317	2
	24	570	18076	23
	48	2480	26200	18

Conclusiones. La aplicación del conteo de copias de la región ITS por cebadores de qPCR universales varia ampliamente entre los géneros de levaduras de estudio, sugiriendo el uso de cebadores específicos para incrementar la confianza del análisis, más aun si se trata de cultivos mixtos.

Agradecimientos. Se agradece a los proyectos SIP 2015-1149 y 2015-1484, así como del CONACyT FOMIX-Tamaulipas 193682 y Ciencia Básica 2013-01-221289. SMR agradecen el apoyo BEIFI otorgado por el IPN.

Bibliografía

1. Sadoudi M, Tourdot-Maréchal R, Rousseaux S, Steyer D, Gallardo-Chacón JJ, Ballester J, Vichi S, Guérin-Schneider R, Caixach J, Alexandre H. (2012). *Food Microbiology* 32, 243-253
2. Andorrà I, Esteve-Zarzoso B, Guillamón JM, Mas, A. (2010). *International Journal of Food Microbiology*, 144, 257-262
3. Millet V, Lonvaud-Funel A. (2000). *Letters in Applied Microbiology* 30, 136-141.

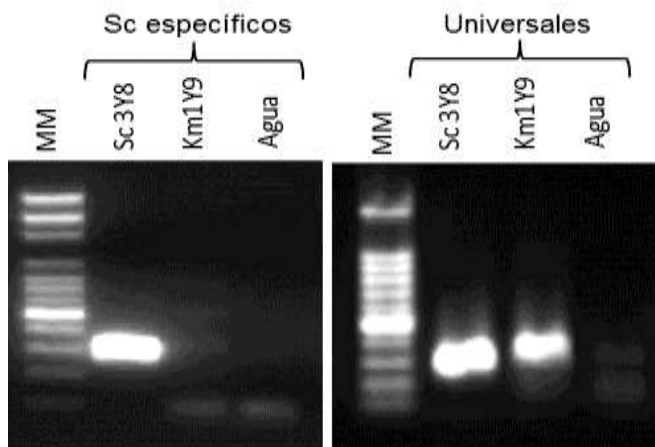


Fig. 1. Amplificación por PCR sobre la cepa de *S. cerevisiae* 3Y8 y *K. marxianus* 1Y9 usando los oligos específicos de este estudio y los universales SCER-R/CESP-F a TM de 65°C.