

INSTITUTO TECNOLÓGICO Y DE ESTUDIOS SUPERIORES DE OCCIDENTE

Departamento de Procesos Tecnológicos e Industriales

Sustentabilidad y Tecnología

PROYECTO DE APLICACIÓN PROFESIONAL (PAP)

**Programa de Desarrollo Tecnológico para la Sustentabilidad Ambiental Energética y
Alimentaria**



**ITESO, Universidad
Jesuita de Guadalajara**

4D09 Biorrefinerías avanzadas

Aislamiento, conservación e identificación de microorganismos

PRESENTAN

Programas educativos y Estudiantes

Ing. en Biotecnología María Fernanda Flores Rodríguez

Ing. en Biotecnología María Fernanda Zendejas Barragán

Profesor PAP: Dr. Alejandro Arana Sánchez & Dr. Luis Eduardo Segura García

Tlaquepaque, Jalisco, Marzo, 2022

ÍNDICE

Contenido

REPORTE PAP	2
Presentación Institucional de los Proyectos de Aplicación Profesional.....	2
Resumen	0
1. Ciclo participativo del Proyecto de Aplicación Profesional.....	0
1.1 Entendimiento del ámbito y del contexto	0
1.2 Caracterización de la organización.....	1
1.3 Identificación de la(s) problemática(s).....	1
1.4. Planeación de alternativa(s).....	1
1.5. Desarrollo de la propuesta de mejora	2
1.6. Valoración de productos, resultados e impactos	2
1.7. Bibliografía y otros recursos	2
1.8. Anexos generales.....	2
2. Productos	3
3. Reflexión crítica y ética de la experiencia.....	4
3.1 Sensibilización ante las realidades	4
3.2 Aprendizajes logrados	4

REPORTE PAP

Presentación Institucional de los Proyectos de Aplicación Profesional

[Este texto deberá aparecer en todos los RPAP]

Los Proyectos de Aplicación Profesional (PAP) son experiencias socio-profesionales de los alumnos que desde el currículo de su formación universitaria- enfrentan retos, resuelven problemas o innovan una necesidad sociotécnica del entorno, en vinculación (colaboración) (co-participación) con grupos, instituciones, organizaciones o comunidades, en escenarios reales donde comparten saberes.

El PAP, como espacio curricular de formación vinculada, ha logrado integrar el Servicio Social (acorde con las Orientaciones Fundamentales del ITESO), los requisitos de dar cuenta de los saberes y del saber aplicar los mismos al culminar la formación profesional (Opción Terminal), mediante la realización de proyectos profesionales de cara a las necesidades y retos del entorno (Aplicación Profesional).

El PAP es un proceso acotado en el tiempo en que los estudiantes, los beneficiarios externos y los profesores se asocian colaborativamente y en red, en un proyecto, e incursionan en un mundo social, como actores que enfrentan verdaderos problemas y desafíos traducibles en demandas pertinentes y socialmente relevantes. Frente a éstas transfieren experiencia de sus saberes profesionales y demuestran que saben hacer, innovar, co-crear o transformar en distintos campos sociales.

El PAP trata de sembrar en los estudiantes una disposición permanente de encargarse de la realidad con una actitud comprometida y ética frente a las disimetrías sociales. En otras palabras, se trata del reto de “saber y aprender a transformar”.

El Reporte PAP consta de tres componentes:

El primer componente refiere al ciclo participativo del PAP, en donde se documentan las diferentes fases del proyecto y las actividades que tuvieron lugar durante el desarrollo de este y la valoración de las incidencias en el entorno.

En caso de requerirse alguna adecuación al nombre de las fases propuestas para este componente, se puede realizar siempre y cuando sea complementario a lo ya establecido.

El segundo componente presenta los productos elaborados de acuerdo con su tipología.

El tercer componente es la reflexión crítica y ética de la experiencia, el reconocimiento de las competencias y los aprendizajes profesionales que el estudiante desarrolló en el transcurso de su labor.

Resumen

El Programa de Desarrollo Tecnológico para la Sustentabilidad Ambiental Energética y Alimentaria Biorrefinerías avanzadas, en el escenario de Biocontrol tuvo como objetivo el aislamiento e identificación de levaduras, de distintas muestras como bebidas fermentadas, alimentos en descomposición, berries y árboles frutales. Esto con la finalidad del aumento en el cepario ITESO para su futuro uso en proyectos e investigaciones de la carrera de Ingeniería en Biotecnología. La metodología usada consistió en técnicas de estría cruzada, extensión de placa, criopreservación y PCR-RFLP. Teniendo como resultado el aislamiento de 14 posibles levaduras, siendo estas identificadas por medio de bases de datos.

1. Ciclo participativo del Proyecto de Aplicación Profesional

El PAP es una experiencia de aprendizaje y de contribución social integrada por estudiantes, profesores, actores sociales y responsables de las organizaciones, que de manera colaborativa construyen sus conocimientos para dar respuestas a problemáticas de un contexto específico y en un tiempo delimitado. Por tanto, la experiencia PAP supone un proceso en lógica de proyecto, así como de un estilo de trabajo participativo y recíproco entre los involucrados.

1.1 Entendimiento del ámbito y del contexto

El biocontrol o control biológico es un método para controlar plagas como insectos, malas hierbas, ácaros y varios otros microorganismos que causan enfermedades en las plantas (Flint et al., 1998). Las enfermedades de las plantas causadas por patógenos infecciosos han afectado seriamente a la sociedad humana y la naturaleza a través de los daños a la producción de alimentos, el desarrollo económico, la resiliencia ecológica y los paisajes naturales a lo largo de la historia humana. Las enfermedades de las plantas pueden ocurrir en toda la cadena de producción de cultivos y permanecer como una de las mayores amenazas para el desarrollo sostenible de la sociedad, lo que resulta en una pérdida de rendimiento anual del 13 % al 22 %, o costos económicos de miles de millones de dólares estadounidenses en alimentos básicos como arroz, trigo , maíz y papa junto con costos adicionales gastados en educación y el desarrollo de estrategias de manejo. Estas pérdidas biológicas y económicas explican, al menos parcialmente,

las estimaciones recientes de ~800 millones de personas en el mundo que sufren hambre o desnutrición (He et al., 2021).

En la larga historia de la agricultura, los seres humanos han desarrollado una variedad de enfoques para manipular la interacción para crear un sistema a favor del crecimiento y desarrollo de las plantas huésped, pero subóptimo para el establecimiento, reproducción y transmisión de patógenos. Según las circunstancias del cultivo, el patógeno, la ubicación geográfica, la disponibilidad de tecnología, la política de regulación y otros factores, estos enfoques de control pueden ser agronómicos, regulatorios, genéticos, físicas y químicas y se pueden usar individualmente o en combinación (manejo integrado de enfermedades, IDM) para suprimir el patógeno causal, promover la inmunidad, o cambiar el ambiente biótico y abiótico donde ocurre la interacción huésped-patógeno (He et al., 2021).

El control biológico es un método de manejo de enfermedades de las plantas al inhibir los patógenos de las plantas, mejorar la inmunidad de las plantas y/o modificar el medio ambiente a través de los efectos de microorganismos benéficos, compuestos o sistemas de cultivo saludables. El control biológico ofrece varias ventajas sobre otros enfoques de manejo de enfermedades de las plantas al tomar en consideración lo siguiente: (1) los agentes de control biológico (BCA) generalmente se enfocan en un grupo específico de patógenos y, por lo tanto, tienen menos impactos negativos en el ecosistema en comparación con los fungicidas, incluso aunque algunos riesgos de problemas, particularmente con la introducción de especies no nativas; (2) muchos BCA pueden sostenerse por sí mismos y mantenerse durante más tiempo sin esfuerzos adicionales para mantener el sistema en funcionamiento (He et al., 2021).

Levaduras

Las levaduras se encuentran en todos los ambientes y se han descrito como potentes antagonistas de varios patógenos de plantas. Debido a su capacidad antagónica, requisitos de cultivo poco exigentes y preocupaciones limitadas de bioseguridad, muchos de estos hongos unicelulares se han considerado para aplicaciones de biocontrol (Freimoser et al., 2019).

A pesar de su relevancia como eucariotas modelo para aplicaciones biotecnológicas y en micología médica, el uso potencial de levaduras antagónicas como agentes de control biológico

aún está poco explotado. Solo un puñado de productos fitosanitarios a base de levadura ha llegado al mercado e incluso en la investigación fundamental, las levaduras antifúngicas han sido descuidadas y poco investigadas con tecnología de punta y a nivel molecular. No obstante, las levaduras combinan fuertes actividades antifúngicas con propiedades ventajosas para una aplicación (p. ej., fuerte actividad antagónica, cultivabilidad, formulabilidad, aplicabilidad, resistencia al estrés) y, por lo tanto, son prometedoras para el desarrollo de agentes fitosanitarios biológicos. Además, la estrecha relación con levaduras modelo, particularmente *Saccharomyces cerevisiae*, permite aprovechar las herramientas moleculares y la plétora de datos desarrollados para estos organismos para estudios básicos y orientados a la aplicación en levaduras de biocontrol. Cualquier organismo que se vaya a utilizar como ingrediente activo en un producto de control biológico debe ser eficaz contra la enfermedad de destino, pero las propiedades secundarias, como la bioseguridad y los problemas de registro, los requisitos y condiciones de producción, las opciones de formulación y el equipo de aplicación requerido, son tanto o más importante. Aunque la falta de crecimiento filamentoso invasivo de la mayoría de las levaduras puede parecer una desventaja, la morfología similar a la levadura es la razón de la cultivabilidad manejable en fermentadores, características de formulación ventajosas y amplias opciones de aplicación. En cuanto a las bacterias, la morfología unicelular de las levaduras también favorece la adhesión y la formación de biopelículas, lo que influye directamente en la persistencia ambiental, la competitividad y, por lo tanto, mejora la actividad de biocontrol (Freimoser et al., 2019).

Las levaduras se han utilizado para la producción de alimentos y bebidas durante miles de años, se consumen directamente como complementos alimenticios y se emplean ampliamente en la industria alimentaria. En muchos casos, estas “levaduras de la industria alimentaria” pertenecen al mismo género o incluso a la misma especie que las destinadas al biocontrol (*Saccharomyces cerevisiae*, *Candida sake*, *Metschnikowia pulcherrima*). Esta puede ser la razón por la cual las levaduras generalmente se consideran seguras y, por lo tanto, la aplicación de levaduras en cultivos y productos alimenticios genera menos preocupación que las aplicaciones de bacterias u hongos filamentosos (Freimoser et al., 2019).

Aguamiel

Se conoce como aguamiel a la savia que exuda la piña del maguey pulquero tras haber sido

raspado, producida de manera natural por hidrólisis de sus fructanos y es la materia básica con la que se fabrica el pulque. Según el tamaño del maguey y la habilidad del tlachiquero es la cantidad de aguamiel que se obtiene los magueyes púa larga y manso producen entre 250 y 350 litros de aguamiel en su vida productiva; las especies ayoteco y chalqueño producen el doble (Secretaría De Agricultura Y Desarrollo Rural). El aguamiel es también conocido como tlachique, néctar de agave o hidromiel y suelen atribuírsele propiedades benéficas como: suplemento alimenticio, probiótico y diurético además de ser una bebida con bajo índice glucémico. Sin embargo, su vida útil es aproximadamente de 2 horas a temperatura ambiente, debido a que es un producto altamente susceptible a fermentación se destina principalmente a la elaboración de pulque, aunque otra de sus aplicaciones es la elaboración de jarabes fructosados (Espíndola et al., 2018).



Figura 1. Aguamiel

Tuba

La costumbre de producir e ingerir tuba proviene de Asia, de Filipinas específicamente. El procedimiento de obtención de tuba se realiza mediante el goteo de la savia del tallo o de las inflorescencias de la palma de coco. Para obtenerla, se hace un corte en la parte superior del cocotero justo donde florecería y se le deja un especie de filtro, denominado vástago del mismo tallo del cocotero y por ahí pasa filtrando, goteando, durante toda la noche. Al día siguiente se recoge la tuba y se le hace un corte a la punta del vástago y se lava para que la tuba que se recoge por la tarde no se contamine. Para conservar su sabor natural se aplica un proceso de fermentado y cocción para quedar lista para su consumo como bebida natural, refrescante, dulce, nutritiva y

energética, en un plazo de dos horas, la fermentación rinde un aromático vino de contenido en alcohol de hasta cuatro por ciento, suave y dulce (Elizondo, 2016).

La tuba es ofrecida por vendedores ambulantes y servida en recipientes de plástico y debido al procesamiento térmico al que se sometió, se conserva a temperatura ambiente.



Figura 2. Tuba (Pizano, 2021)

Kombucha

Kombucha o té de kombucha localmente se refiere a una bebida refrescante fermentada que tiene un sabor ligeramente dulce y ácido. Se consume en todo el mundo por sus beneficios para la salud no probados. Kombucha se refiere particularmente al cultivo microbiano utilizado para fermentar la infusión de té y el té de kombucha. el cultivo es una biopelícula creada por la asociación simbiótica de levaduras y un grupo bacteriano productor de ácido acético que también se denomina "hongo del té". Cuando esta biopelícula crece en caldo de té enfriado y se le agrega azúcar, forma una capa de película celulósica que es un rasgo característico de las bacterias del ácido acético (Jayabalan, 2016).



Figura 3. Kombucha (Sinir et al., 2021)

Alimentos en descomposición (Carga microbiana)

La contaminación de los alimentos es un problema serio para la industria alimentaria, debido a que da lugar a la aparición de productos inaceptables para el consumo humano. La producción industrial de alimentos es un proceso que se desarrolla a gran escala, razón por la cual las consecuencias de pérdidas por contaminación microbiana son elevadas y altamente costosas. Este fenómeno generalmente es un proceso mixto, en el que participan bacterias, levaduras y hongos filamentosos; al mismo tiempo es un proceso competitivo, en el cual prevalecen aquellos grupos que muestran la mayor adaptación a las condiciones ambientales, que se manifiestan en el producto en particular (Orberá, 2004).

Las levaduras constituyen un grupo microbiano de gran interés en la industria alimentaria. Numerosos productos fermentados, como el pan, quesos, embutidos, la cerveza o el vino, deben sus características organolépticas únicas a estos microorganismos, que dirigen su fermentación. Sin embargo, las levaduras también pueden ser responsables de la alteración de diversos alimentos, especialmente si tiene un pH ácido, actividad de agua reducida, presencia de conservadores o escasa disponibilidad de oxígeno, debido a que estas condiciones reducen las posibilidades de proliferación de muchas bacterias (Martin et al., 2002). Es justo destacar que el grupo de levaduras que se asocia perjudicialmente a los alimentos es muy reducido: alrededor del 25 % de las especies identificadas y de éstas, un número muy bajo de forma dañina. Las levaduras asociadas a alimentos se clasifican en: no perjudiciales y alteradoras. Las levaduras alteradoras de alimentos se definen como especies particulares capaces de causar deterioro en alimentos y bebidas que han sido procesados y empacados según las Normas de Buenas Prácticas para producción, manejo y empaque de los alimentos (Orberá, 2004).

1.2 Caracterización de la organización o comunidad

En el presente proyecto PAP Programa de Desarrollo Tecnológico para la Sustentabilidad Ambiental energética y alimentaria PRIMAVERA 2022, se encuentra dividido en varias secciones, entre las que se encuentra la sección de biorrefinerías avanzadas cuyo objetivo es procurar el desarrollo sustentable en la región de Jalisco en lo que respecta al aprovechamiento de residuos agroindustriales bajo el concepto de biorrefinería e ingeniería

circular, el manejo eficiente de agua, la evaluación del impacto ambiental de las actividades productivas a través de indicadores y políticas públicas y el manejo de cultivos a través de técnicas de control biológico en la ZMG y comunidades cercanas.

El proyecto de biorrefinerías avanzadas esta a su vez dividido en 4 secciones las cuales son: Biorrefinerías Avanzadas esta sección del proyecto busca producir microorganismos y enzimas de interés biotecnológico en áreas de agricultura, alimentos y farmacología a nivel biorreactor. Simular bioprocesos para su integración con refinerías avanzadas. Comprender y aprovechar la fisiología y bioquímica de procariotas y eucariotas. El escenario Evaluación de Impacto de Políticas Públicas cuyo interés es el desarrollar métodos de medición de impacto de políticas públicas de calidad del aire, usando herramientas de simulación por computadora y análisis estadístico. También se encuentra la sección de Ecosistemas de Economía Circular donde se busca diseñar estrategias de economía circular a nivel geoespacial, para aprovechar los residuos dentro de una misma región y generar riqueza sostenible. Por último, está el escenario de Biocontrol que tiene la finalidad de estudiar la biología molecular de comunidades de microorganismos (en desarrollo), aislar microorganismos vía muestreo en campo y pruebas de campo con compuestos GRAS y evaluar el potencial de los microorganismos a nivel laboratorio, siendo este ultimo de interés en este documento.

La sección de biocontrol se divide en 3 escenarios; el primero de ellos es CUCBA (Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias) integrado por: Luis Alberto Caballero Tirado, Marisol Domínguez Alcaide, Dinorah Valdez Rodríguez, Paula García Pedroza y Judith Vázquez Hernández. Teniendo como objetivo la prueba de enfrentamiento de microorganismos biocontroladores in vitro, y de igual manera in vivo en el Huerto del ITESO. El segundo escenario conlleva al Huerto; Monserrat de la Mora Fernández y Aime Estephania Pérez Martínez, pruebas de microorganismos biocontroladores in vivo. Y el último escenario, consiste en el área de Biología Molecular; María Fernanda Zendejas Barragán y María Fernanda Flores Rodríguez, para el aislamiento para microorganismos y la determinación de levaduras mediante el uso de la técnica de PCR-RFLP para una actual del cepario.

El PAP se llevó a cabo mediante la dirección del Dr. Alejandro Arana Sánchez y Dr. Luis Eduardo Segura García.

1.3 Identificación de la(s) problemática(s)

Los microorganismos se encuentran en todo el mundo con algunas excepciones, incluidas las superficies esterilizadas. Incluyen flora normal que no es patógena, que contribuye al mayor porcentaje, y especies patógenas que son pocas. Por lo tanto, las actividades de los humanos no pueden separarse completamente de los microbios. Por lo que muchos microorganismos patógenos han llegado a las frutas y verduras frescas, que son una gran fuente de una dieta saludable para los humanos. La creciente demanda de frutas y verduras frescas ha requerido una mayor producción. La mayor producción de hortalizas en el menor tiempo posible para satisfacer la creciente demanda las ha colocado en un mayor riesgo de contaminación con los microbios patógenos, lo que hace que la seguridad de los consumidores sea incierta. El estudio de fuentes de contaminación y tipo de agentes etiológicos patógenos aislados de frutas y hortalizas frescas incluye *Bacillus cereus*, *Campylobacter jejuni*, *Clostridium botulinum*, *E. coli O157:H7*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella spp.*, *Shigella*, *Staphylococcus* y *Vibrio cholera* (Balali et al., 2020).

Las enfermedades de las plantas reducen las cosechas, desmejoran la calidad del producto, limitan la disponibilidad de alimentos y materias primas; el impacto que esto tiene para las personas que dependen de la agricultura, es muy grande. En la actualidad la producción agrícola y particularmente la sanidad vegetal, se enfocan cada vez más en estrategias de manejo basadas en las tecnologías de la información, mismas que han mostrado ser de gran utilidad para incrementar la productividad de los cultivos y aminorar la contaminación y el impacto ambiental (SIAP, 2016).

Dicha problemática incentiva a los investigadores a buscar alternativas que permitan no solo tener cultivos libres de patógenos, si no dar una solución sin repercusiones ambientales y en la salud, por lo que se plantea el uso de microorganismos para contrarrestar las plagas que dañan los cultivos conocida como Biocontrol.

Problemática del PAP

Debido a la pandemia vivida desde hace dos años ocasionada por el Covid-19 muchos sitios

han limitado la afluencia de personas lo que suele ocasionar que el trabajo a realizar se vuelva un poco más lento. De igual manera al estar el proyecto involucrado en distintas áreas, entre ellas la producción de berries, se vio limitado la asistencia de los estudiantes a los campos en semestres anteriores y con ello un atraso en las muestras obtenidas y en la realización de las pruebas de los microorganismos biocontroladores aislados con anterioridad.

Por otro lado, una de las limitantes específicas en el área del equipo de Biología Molecular al comienzo del semestre fueron los reactivos faltantes, para poder llevar a cabo la metodología de identificación por PCR-RFLP para poder tener una familiarización con las técnicas y un menor porcentaje de error con las cepas nuevas a aislar.

1.4. Planeación de alternativa(s)

El desarrollo experimental que se llevara a cabo durante el periodo escolar Primavera 2022, como fecha de inicio 17 de enero y finalizando el 16 de mayo.

Planeación general PAP BIOCONTROL primavera 2022-Equipo Biomol

- Semana 1 (17/01/2022-21/01/2022)

La primera semana se realizaron las presentaciones de parte de los integrantes del equipo, así mismo la organización de los escenarios PAP propuestos; CUCBA, Huerto y Biomol. Por lo que se otorgó el trabajo a realizar para cada uno.

- Semana 2 (24/01/2022-28/01/2022)

Se determinó el equipo de Biomol; el cual trabajará en conjunto con la asesora PAP Ana Jazmín Estrada Corona. Antes de asistir a laboratorio, fue necesario desarrollar un protocolo general de los procedimientos y técnicas a utilizar durante la metodología, como establecer los horarios y laboratorios a usar mensualmente.

- Semana 3 (31/01/2022-4/02/2022)

Se siguió desarrollando protocolo, como la búsqueda de literatura que permitiera una mejor comprensión y complementación de la metodología que se iba a realizar en laboratorio. Así mismo, reuniones con nuestra asesora PAP para dudas y organización.

- Semana 4 (08/02/2022-11/02/2022)

Se realizó la reactivación de las cepas *Candida guilliermondii*, *Saccharomyces cerevisiae* *Candida Krusei* y *Kazachstania humilis* de las cuales solo hubo crecimiento de las primeras dos, se realizó un traspase de dichas cepas y se volvió a inocular *Candida Krusei* y *Kazachstania humilis* sin embargo no hubo crecimiento de estas últimas dos por lo que se procedió a trabajar sólo con *Candida guilliermondii* y *Saccharomyces cerevisiae*.

- Semana 5 (14/02/2022-18/02/2022)

Se realizó la PCR-RFLP de las cepas *Candida guilliermondii* y *Saccharomyces cerevisiae* esta última obtenida del tejuino, esto con el fin de familiarizarse con los protocolos establecidos en el periodo de OTOÑO 2021, posteriormente se realizó la electroforesis para verificar el resultado de la PCR, una vez que se observó que la PCR fue exitosa se procedió a realizar una digestión enzimática utilizando las enzimas de restricción HhaI, HaeIII y HinfI y se realizó electroforesis de dicha digestión.

Además de lo anterior se inició con la inoculación de jitomate y pera en descomposición en medio WL para la obtención de levaduras.

- Semana 6 (21/02/2022 – 25/02/2022)

Se realizó la inoculación de dos muestras líquidas por la técnica de extensión de placa de aguamiel y Kombucha. Primero se hizo un conteo por cámara de Neubauer, para saber las diluciones necesarias a llevar a cabo. Realizándose una dilución 1/10 de ambas muestras, posteriormente se inocularon 100 µL de la solución madre y la dilución en medio WL mediante la técnica antes mencionada. Dichas muestras se dejaron en incubación a 30°C por dos días. Además, se comenzó el aislamiento de algunas levaduras que se encontraron en las cajas de las muestras de pera que se dejaron el viernes 18 en incubación.

De igual manera se hizo una recolección de muestras de fruta de árboles de ITESO y de árboles ubicados en vía pública y muestreo un agave ubicado en plantel. Para dicho procedimiento un isopo fue sumergido en solución salina estéril, se frotó la cascara de los distintos frutos con dicho isopo y posteriormente se guardó un tubo falcón de 15ml

estéril. Siendo las muestras transportadas al laboratorio donde se inoculó en caja de Petri con medio WL. Dichas muestras se dejaron en incubación a 30°C por dos días.

Para la identificación de posibles colonias de levaduras, se utilizó un microscopio para observar dichas características. Siendo las colonias inoculadas en medio WL para su aislamiento total y las levaduras de pera y tomate anteriormente aisladas se inocularon en medio YPD.

- **Semana 7 (28/02/2022 – 04/03/2022)**

Se realizó el traspaso de las colonias posteriormente aisladas a YPD de Aguamiel Madre y Tomate. De igual manera se repitió la metodología para la identificación e inoculación de las posibles colonias de levaduras. Observando su crecimiento en incubadora para posteriormente colocar en refrigerador. Debido a que no se obtuvo una identificación clara, se realizó por tinción Gram la muestra de Aguamiel Madre Blanco, siendo descartada al ser bacteria.

De igual manera se prepararon medio YPD y WL, para el traspaso de las muestras todavía no aisladas y las que se obtuvo éxito a YPD.

- **Semana 8 (07/03/2022 – 11/03/2022)**

Se realizó el traspaso de las muestras todavía no aisladas a medio WL, y las que se obtuvo éxito a YPD.

- **Semana 9 (14/03/2022 – 18/03/2022)**

Se realizó la inoculación en medio WL mediante la técnica de estriado de muestras extraídas de fresa, frambuesa y zarzamora, las colonias que fueron consideradas como levaduras se revisaron en cámara de Neubauer para descartar las bacterias y traspasar las levaduras a medio WL para su aislamiento, además se realizó tinción con azul de metileno de colonias cuya morfología en el microscopio no se identificó a simple vista.

Las colonias que se lograron aislar se traspasaron a medio YPD, no se aisló ninguna levadura de la zarzamora.

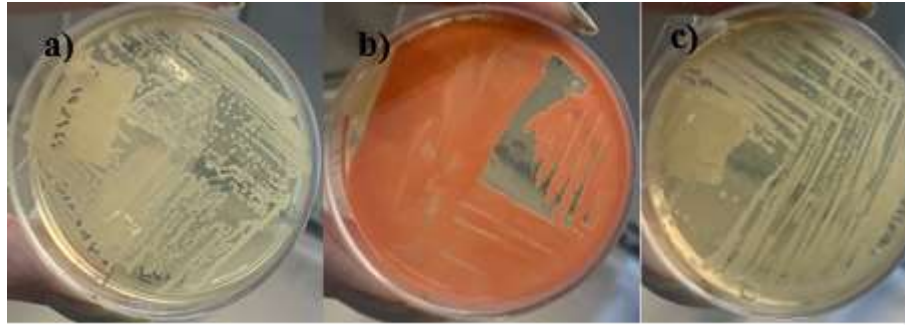


Figura 4. a) Posible levadura aislada de fresa en descomposición, b) Posible levadura aislada de frambuesa, c) Posible levadura aislada de fresa.

- Semana 10 (21/02/2022 – 25/03/2022)

Se realizó el traspase a medio YPD aquellas colonias completamente aisladas y se traspasó a medio WL a las colonias que tenían alguna contaminación y se inocularon muestra obtenidas de guayaba y plátano. Sin embargo, no se encontró ninguna levadura en el plátano.

- Semana 11 (28/03/2022 – 01/04/2022)

Se realizó el traspase a medio YPD aquellas colonias completamente aisladas y se traspasó a medio WL a las colonias que tenían alguna contaminación. Las colonias que fueron consideradas como levaduras se revisaron en cámara de Neubauer para descartar las bacterias. Se aisló una posible levadura de la muestra de guayaba.

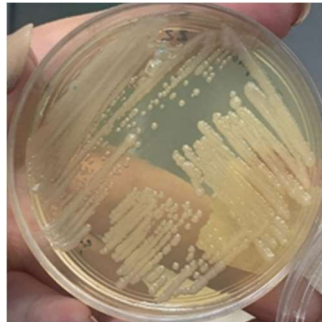


Figura 5. a) Posible levadura aislada de guayaba.

- Semana 12 (04/04/2022 – 08/04/2022)

Realización de PCR RFLP de 4 de las muestras aisladas, la preparación de las muestras se muestra a continuación

Tabla 1. Reactivos y cantidades para PCR-RFLP

Reactivo	Cantidad (μL)
Master Mix Promega (Made in USA)	12.5

<i>Primer ITS 1 IDT(100 µM)</i>	2.5
<i>Primer ITS 4 IDT (100 µM)</i>	2.5
<i>Agua libre de nucleasas Promega (Made in USA)</i>	7.5

Y por medio de la técnica de punción se obtuvo una pequeña muestra de la colonia, la cual fue introducida al tubo de PCR.

Además, se llevó a cabo una electroforesis de la PCR, las condiciones de dicha electroforesis fueron 2.5% de agarosa, 100V durante 80 minutos, se colocó el SYBR diluido primero en agua MiliQ y luego en TAE 1X en la muestra, los resultados de dicha electroforesis no fueron satisfactorios debido a que las bandas de marcador de peso molecular se encontraban muy abajo en el gel y se apreciaban muy pocas bandas. Debido a lo anterior se llevó a cabo una nueva electroforesis de la PCR esta vez con una concentración de 3% de agarosa, 100V por 100 min, con la finalidad de que las bandas se aparecieran más arriba en el gel y se separaran más. Se colocó el SYBR preparado en la muestra, las bandas fueron muy tenues por lo que se decidió repetir el procedimiento. Debido a los resultados insatisfactorios se siguieron realizando protocolos de estandarización donde se colocó el SYBR esta vez diluido dos veces en agua MiliQ, dicho gel se corrió a 100V durante 100min y en las bandas se lograron apreciar más. Se considero esta estandarización como la adecuada y se analizaron las muestras de PCR con dicho procedimiento sin embargo de nuevo se había degradado el SYBR por lo que no se pudieron apreciar los resultados de la PCR.

- Semana 13 (18/04/2022 – 22/04/2022)

Se inocularon muestras de los frutos Ciruela Pasa y Dátil. Para la identificación de posibles colonias de levaduras, se utilizó un microscopio para observar dichas características, descartando las dos muestras al ser su morfología diferente a la esperada por posibles levaduras.

De igual manera se llevó a cabo la identificación de 8 de las posibles levaduras aisladas con PCR-RFLP y digestión enzimática, pero debido a un fallo en el baño María utilizado, no se obtuvieron resultados visibles una vez analizado los geles en el fotodocumentador.

- Semana 14 (25/04/2022 – 29/04/2022)

Se obtuvieron 16 muestras finales de posibles levaduras aisladas en YPD, por lo que se procedió a realizar la metodología de PCR-RFLP y Digestión enzimática para su identificación. Siendo clasificadas temporalmente de la siguiente manera:

Tabla 2. Números de identificación de las posibles levaduras aisladas

<i># de identificación</i>	<i>Origen de muestra</i>
1	<i>Aguamiel 1/10 Vb</i>
2	<i>Tuba EB</i>
3	<i>Tomate (2)</i>
4	<i>Kombucha M</i>
5	<i>Fresa (I)</i>
6	<i>Aguamiel M</i>
7	<i>Aguamiel M Am</i>
8	<i>Aguamiel 1/10 BB</i>
9	<i>Pera (2)</i>
10	<i>Frambuesa (2)</i>
11	<i>Guayaba</i>
12	<i>Aguamiel 1/10 Az</i>
13	<i>Fresa (1)</i>
14	<i>Pera (2V)</i>
15	<i>Tuba (EV)</i>
16	<i>Lima Limón</i>

De las muestras 1,5, 7, 9, 10, 11, 15 y 16 no se obtuvieron resultados satisfactorios, por lo que se repitió su análisis.

- Semana 15 (02/05/2022 – 06/05/2022)

Se llevo a cabo la metodología para la identificación de las cepas aisladas con las muestras que no se obtuvieron resultados.

De igual manera se realizó limpieza y entrega de los materiales usados durante el PAP como; esterilización de cajas Petri, tubos de ensayo, entre otros, para su correcta entrega a almacén.

Se trabajó en la redacción final del RPAP para revisión.

- Semana 16 (02/05/2022 – 06/05/2022)

En dicha semana se recolecto y organizó la información obtenida durante el PAP para la

presentación final, como la redacción y corrección de error presentados en la primera presentación de avances como en el RPAP.

1.5. Desarrollo de la propuesta de mejora

1.5.1 Activación

Para la activación de cepas, se realizará un procedimiento lento:

Los criovales pasaran de la temperatura de -84°C a -18°C en un horario aproximado de 2 horas, repitiendo el proceso para -18°C a 4°C (dos horas aprox.). Para posteriormente llevar las cepas a temperatura ambiente en cuestión de minutos.

Se tomará una cantidad para reactivar en caldo YPD y su posterior incubación.

Tabla 3. Lista de microorganismos activados

<i>Cultivo de donde provienen</i>	Condiciones	Microorganismo
<i>YPD-EST-B8 duplicado 1</i>	-15°C	<i>Candida Krusei</i>
<i>YPD-EST-B7 duplicado 1</i>	-15°C	<i>Kazachstania humilis</i>
<i>YPD-EST-V3 duplicado 1</i>	-15°C	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>Verde-Bac-M1</i>	-15°C	<i>Candida guilliermondii</i>
<i>YPD-EST-N5- CON (Tejuino)</i>	-15°C	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>

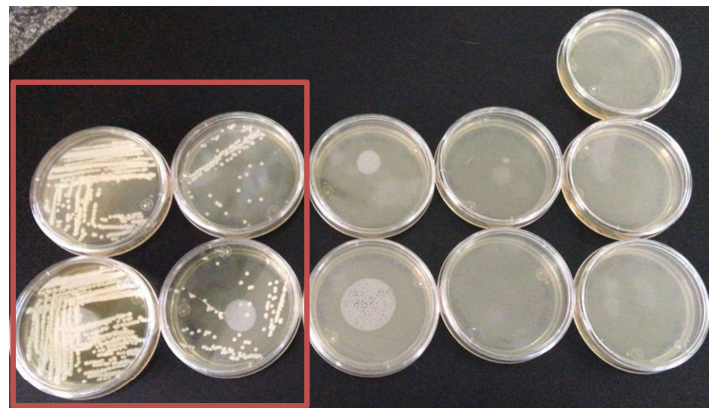


Figura 6. Crecimiento obtenido de las muestras actividad en YPD. Obteniendo solo crecimiento de

las cepas *Candida guilliermondii* y *Saccharomyces cerevisiae* (recuadro rojo)

1.5.2 Preparación de medios de cultivo

1.5.2.1 Medio WL

Agar Diferencial WL es un medio selectivo para la examinación de materiales encontrados en la elaboración de cerveza y para fermentaciones industriales que contienen flora mixta de levaduras y bacterias. WL Differential Agar ayuda en el aislamiento selectivo y la enumeración de bacterias encontradas en cervecerías y fermentaciones industriales (Sigma Aldrich [a], s.f.).

Procedimiento:

- Suspender 80.25 g del medio en 1 L de agua destilada.
- Mezclar bien y disolver calentando con agitación frecuente, evitando la caramelización de la glucosa.
- Ajustar el pH a 5.5
- Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

(Condalab, 2019)



Figura 7. Preparación de medio WL

1.5.2.2 Medio YPD

El agar YPD es un medio de cultivo de levadura para la mayoría de las especies de levadura, especialmente para *Saccharomyces cerevisiae*. También se conoce como YEPD y se compone de extracto de levadura, peptona bacteriológica, glucosa y agar. Los componentes de este medio aportan todos los nutrientes necesarios para el crecimiento de la levadura. Las vitaminas, minerales y aminoácidos esenciales en el medio actúan

como fuente de carbono y nitrógeno (Sigma Aldrich [b], s.f.).

Procedimiento:

- Suspender 20 g de peptona, 20 g de dextrosa y 10 g de extracto de levadura en 1 L de agua destilada.
- Ajustar el pH a 5.5
- Agregar 15 g de agar bacteriológico.
- Mezclar bien y disolver calentando con agitación frecuente.
- Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.
- Enfriar a 45-50°C y dispensar en placas.

(Condalab, 2019)

1.5.3 Inoculación, incubación y aislamiento en placa

1.5.3.1 Cultivo en líquido con YPD

*Microorganismos previamente aislados

Es necesario realizar el trabajo en una campana de flujo laminar; sanitizar y posteriormente introducir los materiales a utilizar desinfectados.

Se flamea la boquilla del tubo de ensayo con ayuda de un mechero y se deja enfriar. De igual manera se flamea y se enfría la boquilla del frasco que contiene el caldo nutritivo. Verter 10 mL de medio YPD en cada tubo de ensayo, se vuelve a flamear la boquilla del tubo y se deja enfriar. Con la flama del mechero, se esteriliza el asa bacteriológica y se deja enfriar, después se toma el cultivo con el asa y se coloca en el tubo de ensayo con caldo nutritivo. Se flamea la boquilla del tubo y se deja enfriar para después tapar e incubar a 25°C por 42-48°C.

1.5.3.2 Estría cruzada

Es necesario realizar el trabajo en una campana de flujo laminar; sanitizar y posteriormente introducir los materiales a utilizar desinfectados.

Vaciar aproximadamente 20 mL de medio de cultivo YPD en las cajas Petri y dejar gelificar. Esterilizar el asa bacteriológica en la flama del mechero y dejar enfriar en un extremo de la placa, para posteriormente tomar la muestra.

Estriar la superficie, teniendo la precaución de no romper el agar. Se repite el proceso de esterilizar el asa bacteriológica y estriar el segundo sector cruzando tres de las estrías con el primer sector para el arrastramiento de los microorganismos. Con el asa previamente esterilizada

y enfriada, como se mencionó anteriormente, estriar el tercer sector del mismo modo que el segundo sector. Incubar las cajas de 42- 48 h a 25°C.



Figura 8. Técnica de estría cruzada

1.5.3.3 Extensión en placa

Es necesario realizar el trabajo en una campana de flujo laminar; sanitizar y posteriormente introducir los materiales a utilizar desinfectados.

Colocar 100 μ L de dilución (30-300 UFC) con una micropipeta con punta estéril en una caja Petri con medio WL, y con ayuda de una asa en L, previamente esterilizada, cubrir en su totalidad la superficie del agar.

Etiquetar la muestra con los datos correctos; nombre del equipo, materia, microorganismo inoculado, lugar de procedencia, fecha y medio utilizado. Se incuba de 24 a 48 h a 30°C, siendo revisadas diariamente.

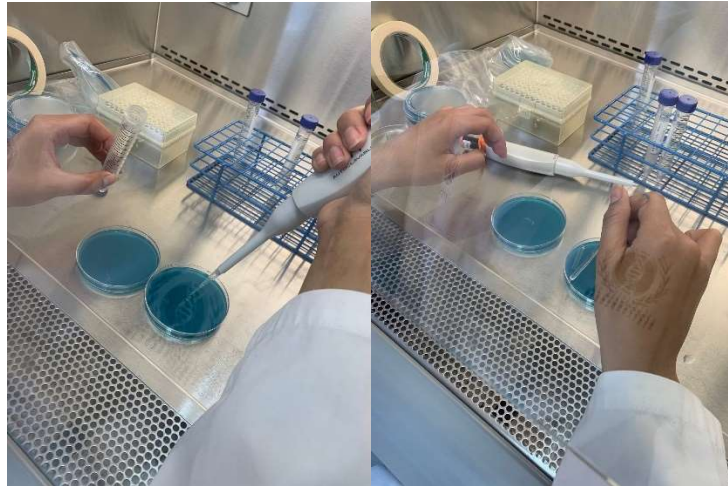


Figura 9. Técnica de extensión en placa

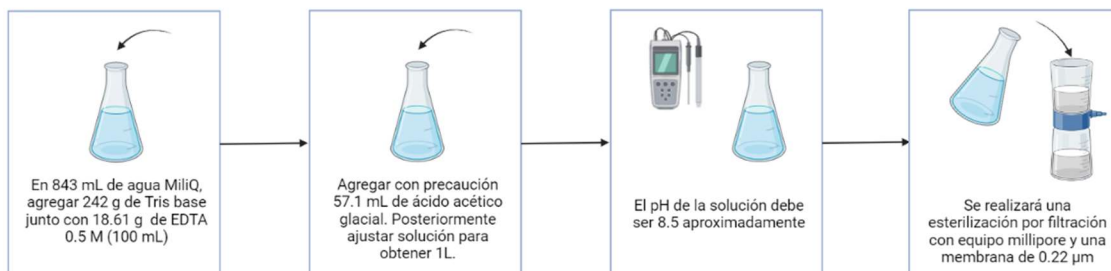
1.5.4 Preparación de reactivos para PCR-RFLP

1.5.4.1 EDTA



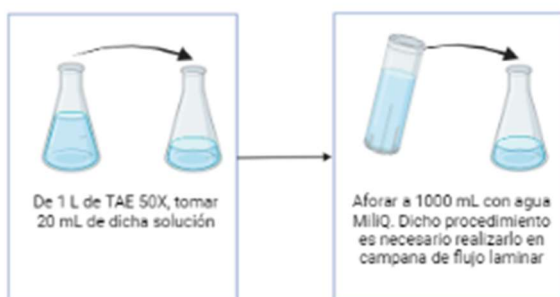
(Cold Spring Harbor Protocols, s.f.)

1.5.4.2 Buffer TAE 50X

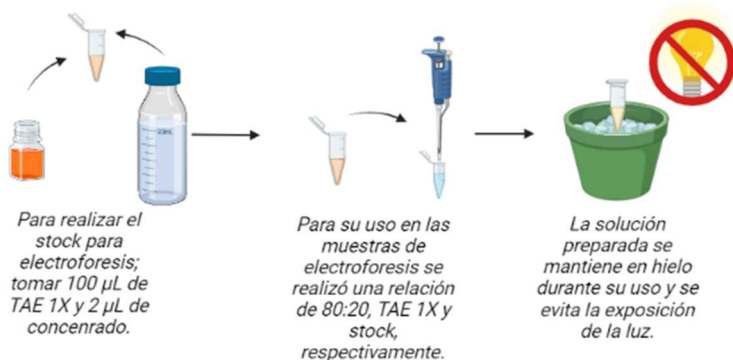


(50x TAE Electrophoresis Buffer, s. f.)

1.5.4.3 Buffer TAE 1X



1.5.4.4 SYBER GREEN



1.5.5 Proceso de PCR-RFLP con muestras de caja de Petri

Para dicho procedimiento se debe picar una colonia de levaduras aisladas en la caja de Petri con una punta metálica estéril, posteriormente se introduce la punta en un tubo con la mezcla de PCR la cual debe contener 12.5µL de Master Mix de la marca PROMEGA (PROMEGA, 2016), dicha mezcla contiene 50 Unids/mL Taq DNA polimerasa, 400µM dNTPs, 3mM MgCl₂ y buffer de PCR, n y 2.5µL de los primers ITS1 (5'-TCC-GTA-GGT-GAA-CCT-GCG-G-3') e ITS4 (5'-TCC-TCC-GCT-TAT-TGA-TAT-GC-3') con una concentración de 100mM cada uno. El volumen final de la mezcla de PCR deberá ser de 25µL por lo que se ajustará añadiendo 7.5µL de agua estéril ultrapura.

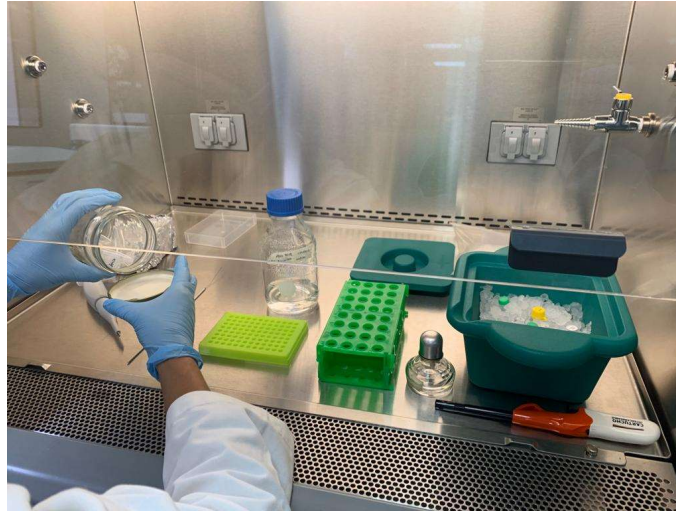


Figura 10. Preparación de la mezcla de PCR

1.5.5.1 Proceso de PCR-RFLP con muestra pura

La reacción de PCR-RFLP se llevará a cabo con un termociclador programado con las siguientes condiciones: desnaturalización inicial 95°C por 25 min, posteriormente por 35 ciclos se llevarán a cabo una desnaturalización a 94°C durante 1 min., seguida del alineamiento a 55°C por 2min., y la extensión a 72°C durante 2 min., después de los ciclos se tendrá una extensión final de 72°C durante 10min. Finalmente, para el mantenimiento se baja la temperatura a 4°C, las muestras se almacenan en un refrigerador manteniéndolas así viables para su uso futuro. A continuación, se muestra el termograma de la PCR-RFLP.

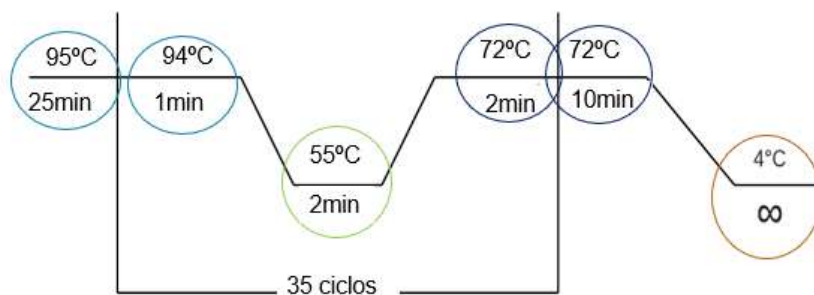


Figura 11. Termograma de PCR-RFLP para levaduras, muestra pura

1.5.6 Electroforesis

Se preparó en un matraz de agarosa al 3% con TAE 1X (40 ml de TAE y 1.2 g de agarosa) y se calentó en microondas durante intervalos de 10 segundos hasta que la agarosa se disolvió completamente. La mezcla se vertió en el soporte del gel de electroforesis y se esperó a que la

solución solidificara. En seguida se colocó el gel en la cámara de electroforesis y se agregó TAE 1X hasta que el gel quedara cubierto por completo.

Posteriormente se tomaron 5 μL de cada producto de PCR y se mezclaron con 1 μL de buffer de carga 6X y 1 μL de la solución SYBER GREEN preparada, esta mezcla se colocó en un pocillo del gel. La electroforesis se llevó a cabo a 100V durante 100 min. Finalmente, el gel se observó en el fotodocumentador. Para cargar el ruler DNA Molecular Weight Ladder VIII (19 -1114 pb) de la marca Roche, se mezcló 1 μL de ruler, 2 μL de buffer de carga 6X, 6 μL de agua ultrapura y 1 μL de solución SYBER GREEN.



Figura 12. Preparación y carga de muestras para metodología de Electroforesis

1.5.7 Digestión enzimática

El resto de producto de PCR se tomaron 6 μL y se colocaron 2 μL en cada tubo de PCR, y a los que se les agregará una enzima de restricción diferente, dichas enzimas serán HhaI, HaeII y HinfI (PROMEGA), con sus respectivos buffers. Los tubos posteriormente se incubarán a 37°C durante 2 horas para que las endonucleasas corten el DNA en sitios específicos. A continuación, se muestran las cantidades a agregar de cada reactivo.

Tabla 2. Volumen y reactivos utilizados

Reactivo Promega (Made in USA)	Volumen
Agua estéril ultrapura	14.8 μL

Buffer RE 10X	2 μ L
Albúmina de suero bovino (BSA) acetilada	0.2 μ L
DNA	2 μ L
Mezclar los reactivos con micropipeta CAPP	
Enzima de restricción	1 μ L

1.5.8 Electroforesis de digestión enzimática

Se realizó un gel de agarosa grande al 3% con TAE al 1 X (se pesaron 1.4 g de agarosa IBI SCIENTIFIC) y se diluyó en 40 mL de TAE 1X, se calentó y se añadió 7 μ L de Syber green, el cual fue cargado con el ruler DNA Molecular Weight Ladder VIII (19 -1114 pb) y las muestras digeridas. Las condiciones del gel fueron: 100 V durante 80 minutos.



Figura 13. Electroforesis de digestión enzimática

1.5.9 Criopreservación

Para dicha metodología los microorganismos aislados y cultivados en medio YPD líquido a 30°C por 150 rpm por 8 horas. Fueron criopreservados en tubos Eppendorf estériles, los cuales contenían 500 μ L de glicerol estéril y 500 μ L del medio inoculado. Posteriormente cada Eppendorf fue centrifugado por aproximadamente un minuto, esto para lograr una homogenización antes de su almacenamiento. Los tubos fueron etiquetados del 1 al 15, siendo

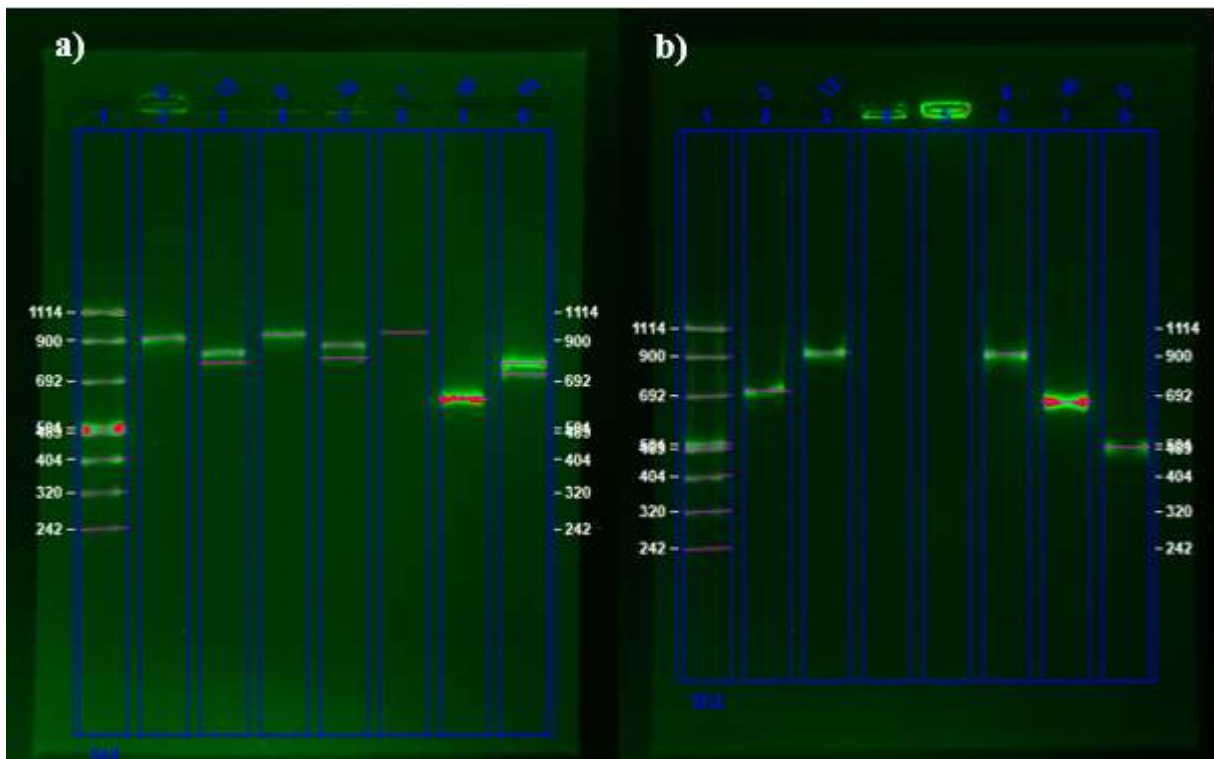
almacenados por duplicado a las temperaturas de -15°C y -80°C .

1.6. Valoración de productos, resultados e impactos

A lo largo del periodo de primavera 2022 se lograron aislar 16 cepas de las cuales se identificaron 14 levaduras tanto de bebidas artesanales como de frutas en descomposición, berries y árboles frutales, dichas levaduras fueron identificadas mediante la técnica de PCR-RFLP con la finalidad de aumentar el cepario del ITESO para la realización de futuros proyectos de la carrera de ingeniería en biotecnología.

PCR-RFLP

Posterior al aislamiento de todas las posibles levaduras provenientes de las diferentes muestras se realizó la amplificación de la región ITS-5.8S mediante la técnica de PCR-RFLP por lo que se pudieron identificar que las 14 de las muestras, se trataban de posibles levaduras.



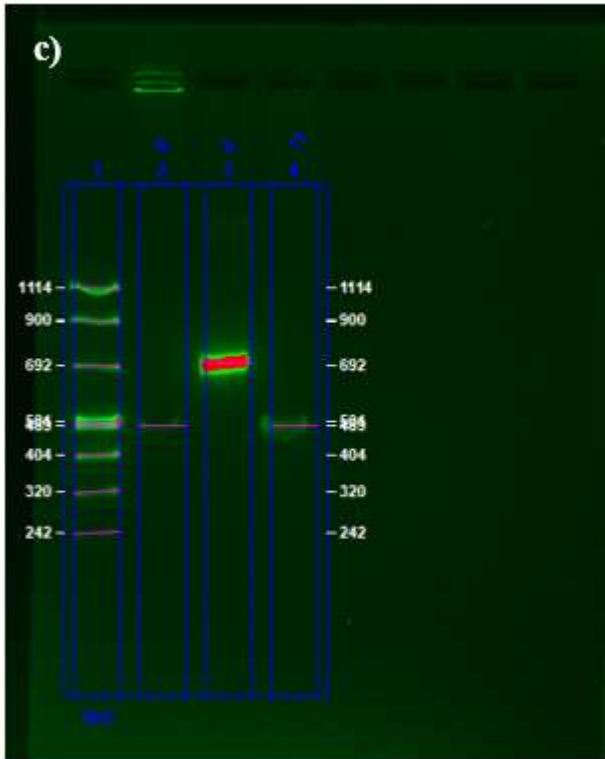
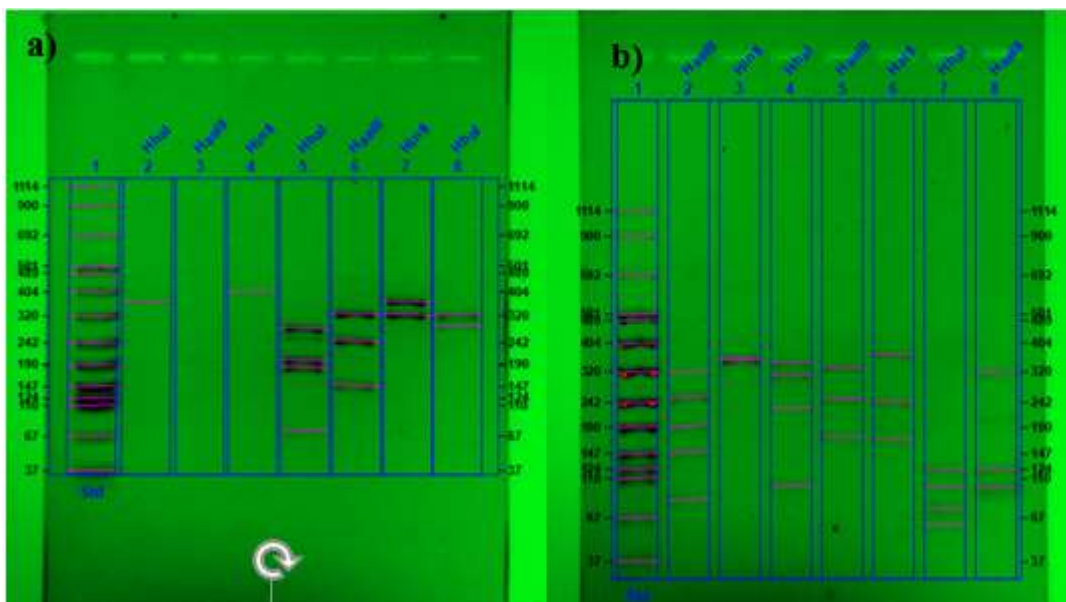
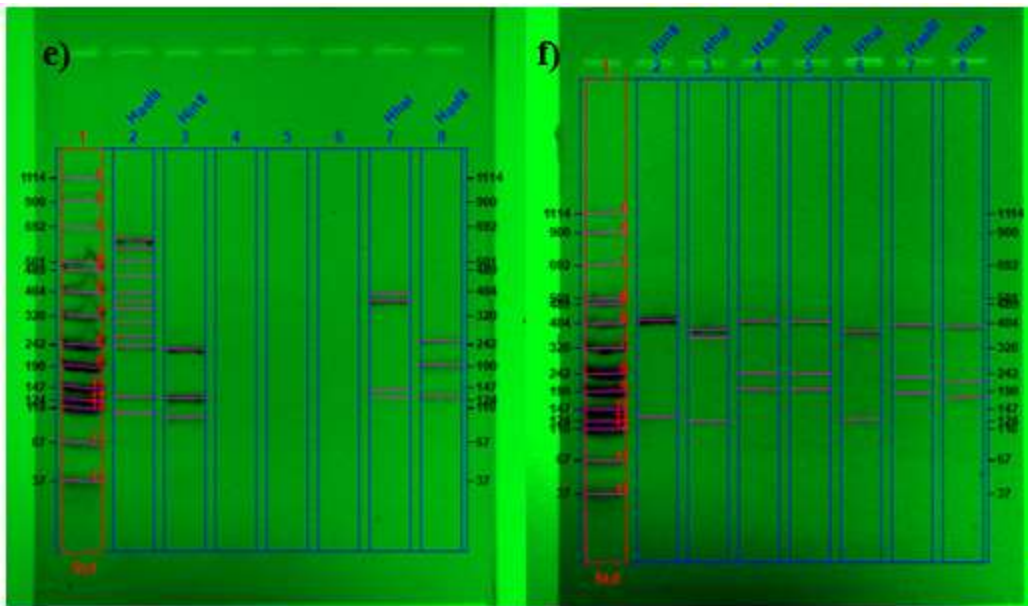
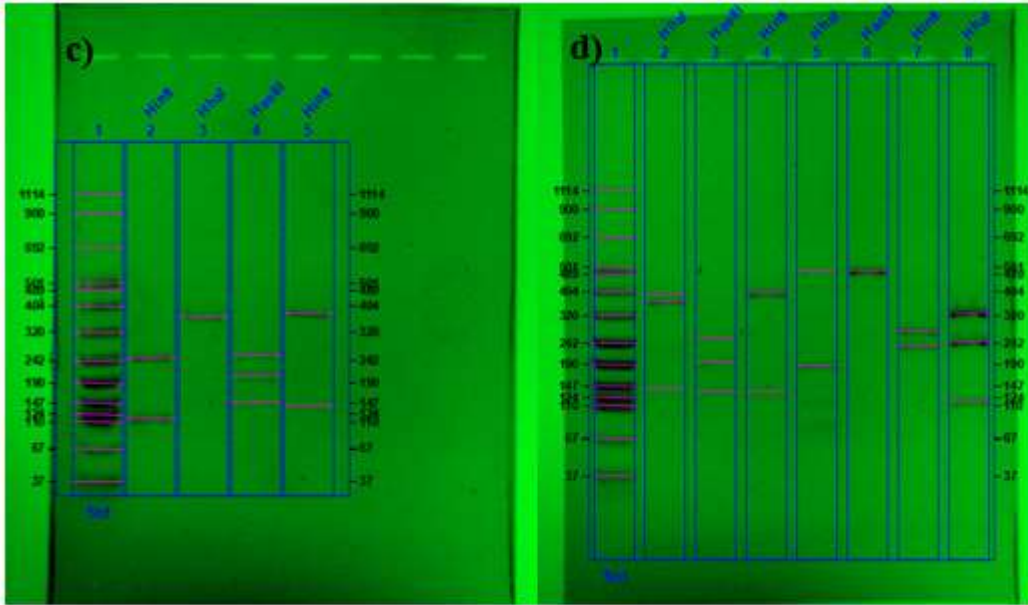


Figura 14. En los gels se muestran los resultados de la PCR-RFLP en la parte superior con cada banda están identificadas cada una de las muestras con sus respectivos números.

Posterior a esto, se realizó una digestión enzimática utilizando las endonucleasas *HaeIII*, *HhaI*, *HinfI*, a las cepas amplificadas, esto con la finalidad de conocer los marcadores de peso molecular de las bandas obtenidas por los cortes para la identificación de las levaduras.

Los gels de electroforesis a continuación muestran los cortes obtenidos de las 14 cepas.





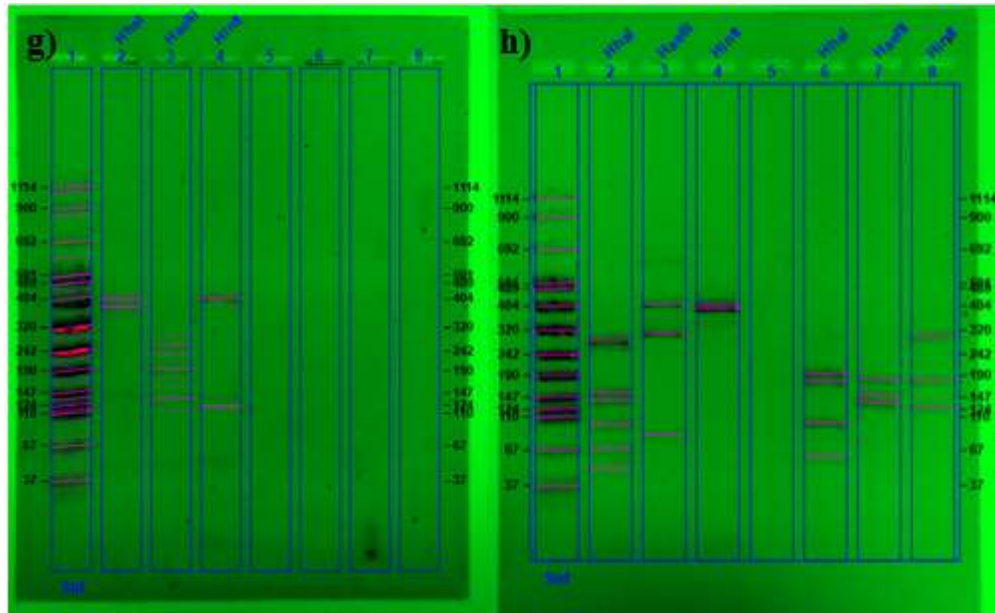


Figura 15. En el gel a) se pueden observar los cortes de la muestra dos de en los carriles del 7 al 7, además se pueden ver los cortes de la enzima HhaI de la muestra 3, en el gel b) se observan los cortes de las otras dos enzimas utilizadas en la muestra 3 en los carriles 2 y 3, en los carriles del 4 al 6 se encuentran los cortes de la muestra 4 y en los últimos dos carriles se encuentran los cortes de la muestra 5, en el gel c) en el carril 2 se encuentra el corte con HinfI de la muestra 5 y en los carriles del 3 al 5 se encuentra la muestra 6. d) carriles del 2 al 4 muestra 8, del 5 al 7 muestra 9 y carril 8 corte de HhaI muestra 10. e) carriles 2 y 3 cortes de HaeIII y HinfI muestra 10, 7 y 8 muestra 12. f) carril 1 muestra 12, carril 3 al 5 muestra 13 y carriles del 6 al 8 muestra 14. g) se observan los cortes de la muestra 1 con cada una de las 3 enzimas. h) en los carriles del 2 al 4 se encuentran los cortes con HhaI, HaeIII y HinfI de la muestra 15 y en los carriles del 6 al 8 se encuentran los cortes de las enzimas de la muestra 16.

En la tabla presentada a continuación se observan los cortes obtenidos por las diferentes endonucleasas en cada una de las muestras, así como la identificación de las posibles lavaduras a las cuales corresponden dichos cortes.


Tabla 3. Cortes obtenidos en digestión enzimática utilizando las endonucleasas *HhaI*, *HaeIII* y *HinfI*




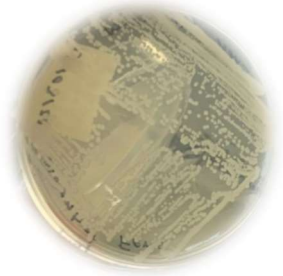

Nombre de identificación	Cepa	Enzimas		
		HhaI	HaeIII	HinfI
Ag 1/10 Vb	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	404 376	260 194 135	407 407 134
TUB EB	<i>Saccharomyces servazzi</i>	281 256 199 184 73	327 246 149	367 323
T2	<i>Kluyveromyces waltii</i>	323, 288	320,254,192,148,84	355 355
KMB	<i>Saccharomyces cariocanus</i>	345 311 100	331 250 173	368,244,169
FRE I	<i>Saccharomyces spp.</i>	123,98,75,60	320,207,123,97	248,116
Ag M	<i>Saccharomyces pastorianus</i>	366	255,206,150	381, 141
Ag 1/10 BB	<i>Saccharomyces paradoxus</i>	394,369,141	254,195,135	401 135
P2	<i>Pichia misumaiensis</i>	495,429,321,188,116,80	495	274,235
Fram 2	<i>Rhodotorula spp.</i>	329,246,118	620 565, 501, 467, 404, 364, 342, 298, 237, 130, 101	230,127,96
Guay	<i>Sin identificar</i>	-	-	-
Ag 1/10 Az	<i>Candida maltosa</i>	396 366 142 127	256,194,131	416,132
Fres 1	<i>Candida spp.</i>	378,351,125	411,243,196	409,242,196
P2 V	<i>Candida cantarelli</i>	374,127	399,229,185	392,216,175
Tub Ev	<i>Hanseniaspora osmophila</i>	284 155 140 98 67 50	412 308 84	410 396
LIMA LIMÓN	<i>Pichia spp.</i>	194 177 100 60	181 149 135	299 180 128




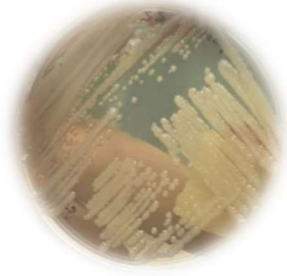

Cabe señalar que no todas los cortes de las enzimas de restricción coincidieron en su totalidad con los que se encontraban en la base de datos proporcionada por el Dr. Alejandro Arana, ni con la página de yeast-id.org que también se usó de referencia. Se tiene la suposición que las diferencias entre los cortes pudieron deberse a problemas con la digestión enzimática, contaminación en las enzimas de restricción o a cortes no tan precisos de los reactivos utilizados, así como a posibles degradaciones al cargar el gel de electroforesis.



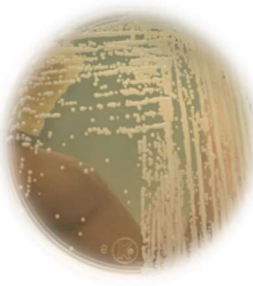

A continuación, se muestra la tabla de las morfologías de las cepas aisladas con su posible identificación:

Tabla 4. Morfología de las cepas aisladas

Número de identificación	Cepa	Imagen
1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	

2	<i>Saccharomyces servazzi</i>	
3	<i>Kluyveromyces waltii</i>	
4	<i>Saccharomyces cariocanus</i>	
5	<i>Saccharomyces spp.</i>	
6	<i>Saccharomyces pastorianus</i>	

8	<i>Saccharomyces paradoxus</i>	
9	<i>Pichia misumaiensis</i>	
10	<i>Rhodotorula spp.</i>	
11	Sin identificación	
12	<i>Candida maltosa</i>	

13	<i>Candida spp.</i>	
14	<i>Candida cantarelli</i>	
15	<i>Hanseniaspora osmophila</i>	
16	<i>Pichia spp.</i>	

Discusión de resultados

Tuba

Algunos estudios de calidad microbiológica de la tuba se afirma que se han encontradi levaduras fermentativas cuya inoculación es por medio de vectores como son los insectos que visitan la palma. Por ejemplo, la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*. Algunas especies de los hongos y levaduras identificadas en la fermentación de la savia de la palma incluyen a *Schizosaccharomyces pombe*, *Pichia pastoris* y algunos miembros de los géneros *Candida* y

Saccharomyces (Rodríguez, 2015). De las levaduras de Tuba aisladas se encontró una posible *Saccharomyces*.

Kombucha

La composición microbiana del hongo kombucha ha sido estudiada anteriormente en diferentes países. Hasta ahora se ha reportado que dicho consorcio está conformado por bacterias acéticas, dentro de las que se encuentra *Acetobacter xylinu*, *Acetobacter xylinoides*, *Bacterium gluconicum*, *Acetobacter aceti* y *Acetobacter pasteurianus* y *Gluconobacter*. También se han sido identificadas levaduras como *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomycodes ludwigii*, *Kloeckera apiculata*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Zygosaccharomyces bailii*, *Brettanomyces bruxellensis*, *Brettanomyces lambicus*, *Brettanomyces custersii*, *Brettanomyces intermedius*, *Candida*, *Candida famata*, *Mycoderma*, *Mycotorula*, *Pichia membranaefaciens*, *Torula* (Gonzales, *et al.*, 2019). De dichas cepas, se aisló una posible *Saccharomyces*.

Aguamiel

Al iniciarse la fermentación del aguamiel los cambios químicos que se presentan en el sustrato propician el desarrollo y sucesión de diversos grupos microbianos, como sigue: levaduras *no-Saccharomyces* y *Saccharomyces* y bacterias (*Zymomonas mobilis ssp. mobilis*) que transforman los azúcares en etanol y otros metabolitos secundarios que repercuten en el perfil sensorial de la bebida, 3) bacterias productoras de dextranas (*Leuconostoc spp.*) que confieren la viscosidad al pulque (Herrera, *et al.*, 2008). Fue posible identificar en los microorganismos aislados del aguamiel una *Saccharomyces*, además de una posible *Candida*, esta última no pertenece a los microorganismos descritos según lo investigado y se cree que pueda ser una levadura que se encuentra en la bebida debido al sitio donde se compró.

Berries

Las frutas frescas son propensas a la contaminación por hongos en el campo, durante la cosecha, el transporte, la comercialización y con el consumidor. Es importante identificar los contaminantes fúngicos en las frutas frescas porque algunos mohos pueden crecer y producir micotoxinas en estos productos, mientras que ciertas levaduras y mohos pueden causar infecciones o alergias. Los mohos más comunes aislados de estos productos fueron *Botrytis cinerea*, *Rhizopus* (en fresas), *Alternaria*, *Penicillium*, *Cladosporium* y *Fusarium* seguidas de

levaduras, *Trichoderma* y *Aureobasidium* (Tournas et al., 2005). De dichas muestras se aislaron posibles *Rhodotorula* y *Kluyveromyces*, teniendo en cuenta como factor influyente el lugar de compra.

1.7. Bibliografía y otros recursos

1. Balali, G. I., Yar, D. D., Afua Dela, V. G., & Adjei-Kusi, P. (2020). Microbial contamination, an increasing threat to the consumption of fresh fruits and vegetables in today's world. *International Journal of Microbiology*, 2020.
2. Cold Spring Harbor Protocols. (s. f.). EDTA. <http://cshprotocols.cshlp.org/content/2006/1/pdb.rec8030>
3. Condalab. (2019). Agar Diferencial WL [Ebook].
4. Condalab. (2019). Agar YPD [Ebook].
5. CSIC. (2015). Yeast-id.org | Database for rapid identification of yeasts. Yeast-Id.Org. <https://www.yeast-id.org/>
6. Espíndola-Sotres, V., Trejo-Márquez, M. A., Lira-Vargas, A. A., & Pascual-Bustamante, S. (2018). Caracterización de aguamiel y jarabe de agave originario del Estado de México, Hidalgo y Tlaxcala. *Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 3(1), 522-528.
7. Flint, M. L., & Dreistadt, S. H. (1998). *Natural enemies handbook: the illustrated guide to biological pest control* (Vol. 3386). Univ of California Press.
8. Freimoser, Florian M.; Rueda-Mejia, Maria Paula; Tilocca, Bruno; Migheli, Quirico (2019). Biocontrol yeasts: mechanisms and applications. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 35(10), 154–. doi:10.1007/s11274-019-2728-4
9. Elizondo, D. A. C. (2016). El tejuino, el bate y la tuba bebidas refrescantes: símbolos que perduran de generación en generación en el estado de Colima. *Razón y Palabra*, 20(94), 89-104.
10. González, S., Vázquez, D., Espinosa, J., & Gómez, R. (2019). Estudio Comparativo de la microbiota aislada del Hongo Kombucha y su uso en la elaboración de alimentos fermentados para Síndrome metabólico. *Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos*.
11. He, D. C., He, M. H., Amalin, D. M., Liu, W., Alvindia, D. G., & Zhan, J. (2021). Biological Control of Plant Diseases: An Evolutionary and Eco-Economic Consideration. *Pathogens* (Basel, Switzerland), 10(10), 1311. <https://doi.org/10.3390/pathogens10101311>
12. Herrera-Solórzano, M., Lappe-Oliveras, P., & Wachter-Rodarte, C. (2008). Identificación polifásica de levaduras y bacterias ácido lácticas aisladas de aguamiel, pulque y semilla. In VII simposio de produccion de alcoholes y levaduras.
13. Jayabalan, R. (2016). Reference Module in Food Science || Kombucha. , (), – . doi:10.1016/b978-0-08-100596-5.03032-8

14. Martín, I. G., de Santos, M. D. R. M., López-Calleja, I., Cruza, P. E. H., Mayoral, B., & Lacarra, T. G. (2002). Levaduras y alteración de los alimentos. *Alimentaria: Revista de tecnología e higiene de los alimentos*, (334), 59-66.
15. Orberá Ratón, T. D. L. M. (2004). Acción perjudicial de las levaduras sobre los alimentos. *Revista Cubana de salud pública*, 30(3), 0-0.
16. Pizano, I. (2021). Colima: la ciudad de las palmeras. Entorno Turístico. <https://www.entomoturistico.com/colima-la-ciudad-de-las-palmeras/>
17. Rodríguez-López, A. (2015). Identificación molecular de levaduras de la tuba. [Título profesional, Universidad de Guadalajara] Repositorio CUCBA de la Universidad de Guadalajara. <http://repositorio.cucba.udg.mx:8080/xmlui/handle/123456789/5907>
18. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera [SIAP]. (2016). El impacto de las plagas y enfermedades en el sector agrícola. Gobierno Mexicano. <https://www.gob.mx/siap/articulos/el-impacto-de-las-plagas-y-enfermedades-en-el-sector-agricola>
19. Secretaría De Agricultura Y Desarrollo Rural. (2019, 28 septiembre). La magia detrás de la producción del pulque. Gobierno de México. Recuperado 18 de febrero de 2022, de <https://www.gob.mx/agricultura/es/articulos/la-magia-detras-de-la-produccion-del-pulque>
20. Sigma Aldrich. [a] (s. f.). WL Differential Agar. https://www.sigmaaldrich.com/MX/es/product/sial/17215?gclid=Cj0KCQIA_8OPBhDtARIsAKQu0gbv7PqoqNpcgN7S7ny3WTaD9Lwz1T6lbsqyt77jNwqfJ3GAMkrpXNEaAuvnEALw_wcB
21. Sigma Aldrich. [b] (s. f.). YPD Agar. https://www.sigmaaldrich.com/MX/es/product/sial/17215?gclid=Cj0KCQIA_8OPBhDtARIsAKQu0gbv7PqoqNpcgN7S7ny3WTaD9Lwz1T6lbsqyt77jNwqfJ3GAMkrpXNEaAuvnEALw_wcB
22. Sinir, G. Ö., Tamer, C. E., & Suna, S. (2019). Kombucha tea: A promising fermented functional beverage. In *Fermented Beverages* (pp. 401-432). Woodhead Publishing.
23. Tournas, V. H., & Katsoudas, E. (2005). Mould and yeast flora in fresh berries, grapes and citrus fruits. *International journal of food microbiology*, 105(1), 11–17. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.05.002>
24. 50x TAE Electrophoresis Buffer. (s. f.). Microbiology UC Davis. http://microbiology.ucdavis.edu/privalsky/sites/default/files/50x_TAE.pdf

1.8. Anexos generales

2. Productos

Ficha 1. Morfología de las cepas aisladas

Nombre y código del PAP (como en la carátula):	4D09 Ecosistema de Economía Circular
Nombre del sub proyecto (como en la carátula):	Biocontrol
Nombre del producto:	Morfología de las cepas aisladas
Descripción (qué es, para quién se realizó y para qué es):	En el documento se muestran las cepas aisladas e identificadas. El lector podrá observar la morfología de las cepas, una breve descripción de ella como el nombre de cada una, para su uso en semestres siguientes.
Autores:	María Fernanda Flores Rodríguez María Fernanda Zendejas Barragán
Enlace	Morfología_PAP4D09.xlsx

Ficha 2. Digestión enzimática

Nombre y código del PAP (como en la carátula):	4D09 Ecosistema de Economía Circular
Nombre del sub proyecto (como en la carátula):	Biocontrol

Nombre del producto:	Digestión enzimática
Descripción (qué es, para quién se realizó y para qué es):	En el documento se muestran los cortes obtenidos de las enzimas usadas (<i>HhaI</i> , <i>HaeIII</i> y <i>HinfI</i>) durante la metodología de Digestión enzimática. El lector podrá observar de manera resumida lo obtenido en los geles de electroforesis.
Autores:	María Fernanda Flores Rodríguez María Fernanda Zendejas Barragán
Enlace	Digestiónenzimática_PAP4D09.xlsx

Ficha 3. Documentos generados por el programa Image Lab 6.1

Nombre y código del PAP (como en la carátula):	4D09 Ecosistema de Economía Circular
Nombre del sub proyecto (como en la carátula):	Biocontrol
Nombre del producto:	Archivos Image Lab 6.1
Descripción (qué es, para quién se realizó y para qué es):	En la carpeta se encuentran diferentes archivos PDF generados por el programa Image Lab 6.1, los cuales cuentan con información más general de los geles de electroforesis obtenidos.
Autores:	María Fernanda Flores Rodríguez María Fernanda Zendejas Barragán
Enlace	Archivos Image Lab 6.1

Ficha 4. Presentación RPAP

Nombre y código del PAP (como en la carátula):	4D09 Ecosistema de Economía Circular
Nombre del sub proyecto (como en la carátula):	Biocontrol
Nombre del producto:	Presentación RPAP
Descripción (qué es, para quién se realizó y para qué es):	En la presentación se abordan las principales metodologías utilizadas en todo el PAP, así como los resultados y conclusiones obtenidas.
Autores:	María Fernanda Flores Rodríguez María Fernanda Zendejas Barragán
Enlace	PresentacionPAP.pptx

3. Reflexión crítica y ética de la experiencia

El RPAP tiene también como propósito documentar la reflexión sobre los aprendizajes en sus múltiples dimensiones, las implicaciones éticas y los aportes sociales del proyecto para compartir una comprensión crítica y amplia de las problemáticas en las que se intervino.

3.1 Sensibilización ante las realidades

María Fernanda Flores Rodríguez

El Programa de Desarrollo Tecnológico para la Sustentabilidad Ambiental Energética y Alimentaria Biorrefinerías avanzadas, en el escenario de Biocontrol, pude obtener una nueva perspectiva de los problemas que se enfrenta día a día la agricultura en nuestro país, teniendo más en consideración como nos afecta y es un problema que nos concierne a cada uno de nosotros. Es decir, siendo consciente del privilegio de tener acceso a dichos alimentos, pero que

desgraciadamente esto se ha visto limitado conforme el paso de los años a miles de mexicanos por distintas razones. Por ejemplo, los precios elevados en ello o la baja cantidad de alimentos obtenidos por cosecha. Pero para ello es importante conocer la raíz del problema; la cantidad de cultivos que se ven afectados por microorganismos patógenos que enferman a las plantas y acaban con el trabajo de los agricultores es alarmante, siendo una pérdida significativa económica para los agricultores como en su esfuerzo diario y siendo la causa que afecta a cada uno de los mexicanos. Usando mi experiencia en laboratorio es sumamente frustrante cuando se pone dedicación y esfuerzo en un trabajo y los resultados obtenidos no son satisfactorios, y más cuando son por razones externas que algunas veces no se tiene el control sobre ello, y aun cuando no es a un nivel comparable, la frustración y angustia de los agricultores que viven de ello y que al final por más cuidado se tengan una plaga acabe con todo ello, siendo empática con dicha situación. Por ello comprendí aún más la importancia de investigar y realizar técnicas de Biocontrol para poder ofrecer ayuda en dichos problemas, que no solo beneficiaría a un sector de la sociedad sino en su totalidad.

En específico mi carrera al trabajar con microorganismos, y buscar su aplicación para la resolución de problemáticas y con ello el cómo obtenerlos es sumamente interesante. El escenario que se trabajó la primera cuestión fue la búsqueda de muestras, teniendo variedad de posibilidades. Se trabajó con bebidas fermentativas, obteniendo resultados sumamente interesantes por las cepas que crecieron de ello, de distintos frutos ya sea en descomposición o simplemente sin una higiene adecuada, esto último también me hizo reflexionar la importancia que se tiene que dar al correcto lavado y desinfección de cualquier tipo de alimento por la cantidad de microorganismos que se pueden encontrar en ello, aun cuando el objetivo fue el aislamiento de levaduras, siempre se obtuvo un crecimiento general también de hongos y bacterias en dichas muestras, por ello la importancia de la higiene para prevenir enfermedades.

De igual manera me permitió entender aún más el impacto que tiene mi carrera en distintos ámbitos para la sociedad; cualquier carrera que se estudie tiene como finalidad buscar un bien común. Pero centrándome en biotecnología, pude concretar los beneficios que se pueden obtener de investigaciones y aplicaciones de metodologías, y con ello de igual manera empatizar con el arduo trabajo de los investigadores que comparten su experiencia y conocimiento en artículos y libros que me permitieron poder llevar a cabo este PAP, es un trabajo exhaustivo y difícil porque los resultados no se obtienen en periodo corto, y como lo experimenté, son pruebas con aciertos

y errores, pero es con un fin positivo.

Estoy muy agradecida con el Dr. Alejandro Arana Sánchez y el Dr. Luis Eduardo Segura, por permitirme ser parte de este proyecto y poder aportar el aprendizaje adquirido durante mi carrera, siendo también esto reflejado en ayudar en la ampliación del cepario actual del ITESO, para futuros proyectos de alumnos que se encuentren aún en su formación académica. Así mismo por su orientación, paciencia y disposición ayudarnos en cualquier cuestión necesitada. A mi compañera de equipo, Fernanda Zendejas, con quien trabajé durante toda mi carrera y aprendí muchas cosas no solo en el ámbito académico y fortalecí la habilidad de trabajo en equipo, por su apoyo, muchas gracias.

María Fernanda Zendejas Barragán

El PAP de Programa de Desarrollo Tecnológico para la Sustentabilidad Ambiental Energética y Alimentaria - Biorrefinerías avanzadas en el escenario de Biocontrol me permitió introducirme un poco a los problemas a los que se enfrentan los agricultores cuando sus cultivos se ven infectados por algún patógeno, debido a que al ir recalentando las muestras de árboles frutales o de las *berries* pude observar que gran parte de estos frutos estaban contaminados por algún tipo de hongo que era lo que muchas veces aceleraba el tiempo de descomposición. Pero el problema no acaba en la contaminación de patógenos en campos si no que se extiende a contaminaciones en el traslado, en el lugar de almacenamiento y en los mismos centros de distribución lo que llega a provocar un gran desperdicio de alimentos y grandes pérdidas económicas sobre todo para los productores. Conocer un poco más de cerca esta problemática me permitió sensibilizarme y preguntarme como desde mi carrera puedo contribuir a evitar todas perdidas alimentarias y al hacerlo traer un beneficio para aquellas personas, ya sean agricultores, comerciantes y transportistas, cuya economía se ve afectada.

Por otra parte, el PAP en trabajar con el aislamiento de microorganismo de algunas bebidas artesanales fue interesante, porque si bien sabía que estas bebidas suelen tener varios microorganismos en su composición, conocer la verdadera carga microbiana que contiene fue muy interesante, esto me hizo preguntarme en donde se lleva a cabo la fermentación de dichas bebidas y las diferencias de procesos de los productores para que cada bebida tenga su propio sabor.

En particular del escenario de Biocontrol tuve la oportunidad de poner en práctica y reforzar algunas de las técnicas de microbiología y biología molecular aprendidas a lo largo de la carrera, esto me ayudo a darme cuenta de que verdaderamente estas son las áreas a las que me gustaría dedicarme debido al potencial que tiene para la Biotecnología y para la sociedad, me emociono mucho trabajar en esta área.

Finalmente me gustaría expresar mi agradecimiento al Dr. Arana por permitirme formar parte del PAP, específicamente del área de Biocontrol, agradezco su consejo y apoyo, así como el del Dr. Segura. Agradezco también a mi compañera Fernanda Flores con quien formé equipo en el PAP y a lo largo de la carrera, y con quien aprendí muchas cosas no solo del ámbito académico. Disfrute mucho este PAP y agradezco todo lo aprendido.

3.2 Aprendizajes logrados

María Fernanda Flores Rodríguez

En el PAP Programa de Desarrollo Tecnológico para la Sustentabilidad Ambiental Energética y Alimentaria Biorrefinerías avanzadas en el escenario de Biocontrol, pude aplicar todo el conocimiento adquirido, tanto teórico como práctico, que adquirí durante mi carrera. Desde la investigación de técnicas y establecimiento de protocolos; esto con la investigación de literatura, comprensión de artículos, tesis y documentos realizados por distintos compañeros en otros semestres, para lograr una comprensión y familiarización con los temas a tratar, la identificación de problemas sociales y sus posibles soluciones y escenarios; porque es importante la investigación y aplicación de Biocontrol, sus beneficios y beneficiados, como fortalecimiento de las técnicas adquiridas en distintas materias; como ejemplo la preparación y esterilización de medios comúnmente usados como el YPD a uno que era nuevo en mi experiencia, que es el WL. Volver a practicar técnicas fundamentales de Microbiología para el aislamiento de cepas; técnica de estriado, extensión por placa, tinciones y esterilización de materiales, entre otros. La metodología de PCR-FRLP y Digestión enzimática, que debido a pandemia tuve poca oportunidad de llevar a cabo en el momento de cursar la materia correspondiente, pero en el PAP pude practicar y familiarizarme con ello, siendo sumamente satisfactorio. Como el uso de equipos y herramientas, con una previa orientación, pero que sin duda enriqueció aún más mi aprendizaje, que será sumamente valioso en mi ámbito laboral. Así mismo, el continuo uso de buenas prácticas de laboratorio; las cuales no solo me benefician a mí y aportan una

responsabilidad preciada en cualquier trabajo, sino el respeto por mis compañeros de laboratorio como todas las personas que trabajan en ellos.

Durante mi trabajo enfrentamos distintos retos. El primero; fue decidir de donde obtendríamos muestras para aislar, tomando en cuenta los trabajos anteriores. Decidimos primeramente el uso de bebidas fermentadas que no habían sido utilizadas, como de algunas frutas, siendo una opción muestras directas de los árboles, pero desgraciadamente no tuvimos los resultados esperados ya que el Huerto de ITESO, actualmente no tienen en crecimiento y los que se encuentran en campus, son pocos o no era temporada. Por lo que continuamos con la búsqueda de muestras, algunas veces obteníamos crecimiento de distintos microorganismos, pero al realizar el primer tipo de identificación, esto por su morfología con ayuda de un microscopio, nos dábamos cuenta que no eran levaduras y en ocasiones semanas de trabajo no obteníamos una cepa exitosamente aislada. También existió la limitación por la falta de reactivos, lo que en su momento llegó a ser preocupante por la cuestión del tiempo, pero con una buena organización, aun cuando llego casi en las últimas semanas del semestre, esto pudo realizarse sin problemas. Con ello también me di cuenta de mi manejo del estrés y frustración, porque era algo que nadie teníamos control de ello, por lo que fue algo que fortalecí y me dejo un gran aprendizaje; lo fundamental que es saber trabajar en equipo, tener la confianza de los conocimientos propios y la organización y manejo de los tiempos. Ya que con ello pudimos obtener los resultados esperados, sin llegar a un momento sumamente estresante o desagradable para nosotras.

También nos encontramos con otro problema ajeno a nuestro control; la limitación de uso de espacios y equipos. Debido a la pandemia que hoy en día vivimos, no se puede tener una gran cantidad de alumnos en áreas cerradas y también no se tiene una cantidad ilimitada de equipos y reactivos para cada persona, es por ello la importancia de respetar y cuidar de los laboratorios y reglamentos establecidos, para no afectar trabajos ajenos e incomodar a las personas que nos ayudan a ser futuros Ingenieros con buenas bases y valores.

Estoy muy satisfecha con lo aprendido y trabajado en este PAP, porque no solo me benefició a nivel académico sino a nivel personal, pude adquirir en mi último semestre la confianza necesaria para poder seguir creciendo en otros ámbitos, y sin duda valorar y apreciar más todo el trabajo que se tiene tras una investigación.

María Fernanda Zendejas Barragán

En el PAP de Programa de Desarrollo Tecnológico para la Sustentabilidad Ambiental Energética y Alimentaria - Biorrefinerías avanzadas en el escenario de Biocontrol pude poner en práctica los conocimientos que adquirí a lo largo de la carrera, principalmente algunas técnicas de microbiología como lo fueron la preparación de medios de cultivo, las diferentes técnicas de inoculación de microorganismo, técnicas de tinción para diferenciación de microorganismos entre algunas otras. Así mismo reforcé técnicas de biología molecular como la realización de la PCR-RFLP, programación de un termociclador, realización de electroforesis y digestiones enzimáticas. El haber podido poner en práctica estas técnicas me ayudo a darme cuenta de algunos errores o aciertos que tuve la primera vez que realicé dichas técnicas y me ayudaron a mejorar mi trabajo y organización en laboratorio.

Trabajar en el PAP también me permitió aumentar mi nivel de tolerancia a la frustración debido a que hubo ocasiones en las que las cosas no salían como esperábamos y era necesario repetir algún procedimiento. Me di cuenta también que soy capaz de poner los conocimientos adquiridos en práctica y desarrollar nuevos conocimientos. Me sirvió como experiencia para comprender un poco más el área de experimentación e investigación y que estas áreas necesitan de mucha paciencia ya que las cosas usualmente no resultan como esperamos en el primer intento.

Me encuentro satisfecha de lo que aprendí en este PAP, es algo que aporta mucho a mi carrera, a mi experiencia y a mi persona. Me agrada haber ayudado a aumentar el cerapio del ITESO para que de esta forma los estudiantes que vienen tengan más opciones de microorganismos para la realización de sus proyectos.

