**PR-05. AVANCES EN LA IDENTIFICACIÓN DE LEVADURAS CON**

**POTENCIALIDADES DE USO COMO ACTIVADORAS DE LA FERMENTACIÓN**

**RUMINAL.**

**Yoandra Marrero1, Juana Galindo1, Niurca González1, Elizabeth Martín2, Yamicela**

**Castillo3, Oscar Ruiz3, Eduviges Burrola3, Everardo González3, Luiz C. Basso4 y Carlos**

**Augusto Rosa5**

**1 Dpto de Fisiología, Instituto de Ciencia Anima (ICA), Carretera Central Km 47 1/2 ,**

**San José de las Lajas, La Habana, Cuba. 2Laboratorio de Microbiología Molecular,**

**Corporación Colombina de Investigación Agropecuaria (CORPOICA), Colombia. 3**

**Facultad de Zootecnia, Universidad Autónoma de Chihuahua (UACH), México.**

**4Escuela superior de Agricultura Luiz de Quiroz (ESALQ), USP, Brasil. 5**

**Departamentito de Microbiología, Instituto de Ciencias Biológicas, (UFMG), Brasil**

**ymarrero@ica.co.cu**

**Presentado en el III° Congreso Internacional de Producción Animal Tropical**

**La Habana, Cuba, noviembre 2010**

**Resumen:**

El empleo de levaduras en la producción de animales rumiantes constituye una alternativa

para sustituir el empleo de antibióticos promotores del crecimiento. En el mercado mundial

existen múltiples productos con levaduras que se comercializan a altos precios y que muchas veces no producen el efecto deseado en animales que consumen dietas fibrosas como los de nuestra región. En los últimos 8 años Cuba desarrolló una metodología para el aislamiento de levaduras resistentes a las condiciones ruminales y demostró los efectos positivos de las mismas en la población de microorganismos ruminales, la degradabilidad in vitro de la MS y la producción de leche. Además logró la identificación molecular de las cepas aisladas con lo que se comprobó que ninguna pertenece al género Saccharomyces. Para el desarrollo de gran parte de los resultados contó con la colaboración de instituciones de Colombia, México y Brasil que se sumaron a las investigaciones en este campo con importantes resultados para la región. El presente trabajo tiene como objetivo exponer los avances alcanzados por Cuba en los últimos 4 años de trabajos conjuntos e interacción, donde se han aprovechado las fortalezas de las instituciones participantes y además se prepararan a nuevos jóvenes investigadores en el empleo de técnicas de avanzada.

**Palabras claves:** Levaduras, aditivos, rumen.

**INTRODUCCIÓN**

El empleo de levaduras en la producción de animales rumiantes constituye una alternativa

para substituir el empleo de antibióticos promotores del crecimiento. La adición de estos

microorganismos a la dieta ejerce efectos favorables en la población microbiana y en los

indicadores fermentativos del rumen y como consecuencia, mejora la salud y la productividad de los animales.

En el mercado mundial existen múltiples productos que se utilizan cepas comerciales de la

levadura Saccharomyces cerevisiae como activadoras de la fermentación ruminal. Estos se

comercializan a altos precios y muchas veces no producen el efecto deseado en animales que consumen dietas fibrosas como los de las regiones tropicales.

Sin embargo, no existen abundantes trabajos que muestren la utilización de otros géneros de levaduras con estos fines. Cuba ha trabajado durante 8 años en el desarrollo de un aditivo a base de levaduras nativas que demuestren potencial para su empleo como aditivos y resulte competitivo en el mercado internacional. Para ello cuenta con una colección de cepas aisladas del ambiente ruminal y se demostró mediante un medio selectivo que las mismas no pertenecían al género Saccharomyces. También se encontró que todas las cepas presentaron mayor potencialidad de uso para activar la fermentación de **C. nlemfuensis** (pasto estrella) cuando se compararon con S.cerevisiae y un control sin levaduras, en un experimento in vitro.

En cuanto a esto, no se debe perder de vista que varias especies de levaduras resultan

patógenas para el hombre. De ahí la importancia de la identificación de las mismas, sobre

todo si se quiere emplear como aditivos para animales. Para lograr dicha identificación se

emplean disímiles técnicas dentro de las que se pueden mencionar las bioquímicas, enzimáticas, cromogénicas, fluorogénica, inmunológicas y más recientemente los métodos

moleculares.

Por lo anterior el presente trabajo tiene como objetivo exponer los avances alcanzados por

Cuba en los últimos 4 años de conjunto con varias instituciones de la región donde se

emplearon diferentes técnicas para la identificaron las cepas de levaduras aisladas del

ecosistema ruminal.

**MATERIALES Y MÉTODOS**

Los trabajos de identificación de las cepas se llevaron a cabo en: los laboratorios de la

Facultad de Zootecnia de la Universidad Autónoma de Chihuahua, en el laboratorio de

Química del Departamento de Ciencias Biológicas del a Escuela Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ), Universidad de Sao Paolo, (Brasil) y en el Departamento de

Microbiología, Instituto de Ciencias Biológicas, (UFMG), Brasil.

Cariotipaje: Una pequeña porción (1 a 4 mg) de las colonias individuales de cada cepa fueron tratadas con enzimas líticas conforme al protocolo de Blondin & V´ezinhet (1988).

Los DNAs intactos fueron separados en gel de agarosa mediante electroforesis de campo pulsado (PFGE) modalidad TAFE (transverse alternating field electrphoresis) con el empleo de equipamiento Gene-Line (Beckman) ajustado a 170 mA por 4 horas y pulsos de 4 segundos, seguido de 150 mA por 18 horas con pulsos de 60 segundos, conforme lo descrito por Basso et al., 2008.

**Extracción de ADN**

Se tomaron 2 asadas de las colonias puras de la cepa cultivadas en agar, extracto de malta

(DIFCO) y se disolvieron en 1 mL de agua inyectable dentro de un micro tubo de 1.5 mL y

se centrifugó a 15000 rpm; el sobrenadante se descartó y la pastilla se resuspendió en 293 Μl de EDTA 5 mM. A esta suspensión se le adicionó agregó 10 μL de liticasa (Sigma) y se

incubó a 37° C por 60 min para obtener los esporoblastos. Posteriormente se utilizó el kit de extracción de ADN “PureLinkTM Genomic DNA Mini Kits” (Invitrogen).La calidad del ADN se observó en gel de agarosa al 1% teñido en bromuro de etidio a 10 mg/ mL y se visualizó con luz ultravioleta en el fotodocumentador Mini Bis Pro (Bio- Imaging Systems).

Identificación moleculra de levaduras: Para ello se realizaron dos procedimientos que tuvieron en común la extracción y amplificación del ADN pero se diferenciaron en la región del ADN que se amplificó. En el primero se emplearon oligonucleótidos que permiten amplificar la región variable V5 del gen rADN18S y el segundo se emplearon oligonucleótidos que amplificaron para la región D1D2 de la subunidad mayor de rADN23S.

**Procedimiento 1 (México)**

Análisis de las secuencias: El producto de PCR se limpió utilizando el kit “Wizard ® SV Gel and PCR Clean-Up System” (Promega) de acuerdo a con las especificaciones del proveedor.

Los productos de PCR purificados se enviaron para su secuenciación automática en el equipo ABI PRIMS® 3100 Genetic Analyzer (Perkin Elmer) a la unidad de diagnóstico y análisis molecular del Instituto Nacional de Salud Pública ubicado en la ciudad de Cuernavaca Morelos, Méx. El análisis de la secuencia se realizó a través de una búsqueda heurística en el programa Blast del NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov).

**Procedimiento 2 (Brasil)**

La identificación se realizó por la secuenciación de la región D1D2 de la subunidad mayor de rDNA utilizando los oligonucleótidos NL-1 (5’- GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3’) y NL-4 (5’-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3’) según Lachance et al., (1999). La reacción de PCR se realizó en un volumen final de 50 μL y que contenía 5 μL de tampón de PCR High fidelity 10X, 2 μL de MgSO4 50mM, 2 μL de dNTP 10 mM (0,2 mM cada), 1 μL de los primers NL1 y NL4 a 10 pmol-1 (MWG Biotech), 1 a 5 μL de DNA, 0,2 μL de Taq DNA polimerase 1 U/μL (Platinum ® Taq DNA Polymerase High Fidelity) y agua DPEC q.s.p. 50 μL.

Las reacciones de PCR se colocaron en un termociclador PCR Express (Thermo Hybaid),

bajo el siguiente programa: desnaturalización inicial a 95º C por 5 min, seguido por 35 ciclos de 15s a 94º C, 25 s a 54º C, 20 s a 68º C, y finalmente 10 min a 68º C Los productos de PCR se analizaron por electroforesis en gel de agarosa 1%, en con amortiguador TBE 0.5X teñidos con bromuro de etidio a 10 mg/ mL, y se visualizaron con luz ultravioleta y fotografiados por el sistema de foto-documentación de gel (Vilber Lourmat, France). Los productos de PCR generados se purificaron y secuenciaron utilizando el DYEnamicTM (Amersham Biosciences, USA) en combinación con el sistema de secuenciamiento automatizado MegaBACETM 1000.

**RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

Un total de 20 cepas de levaduras aisladas del ecosistema ruminal, que demostraron

potencialidad para su empleo como activadoras de la fermentación ruminal bajo condiciones in vitro, fueron caracterizadas mediante la técnica de cariotipaje. Los resultados mostraron que el perfil electroforético de las cepas era diferente al de la cepa de S. cerevisiaeque se incluyó como patrón. Además las cepas se pudieron dividir en 6 grupos según la similitud de sus perfiles que coinciden con las características morfológicas de las colonias. Lo anterior reafirmó los resultados de pruebas bioquímicas realizadas al cepario con anterioridad donde se empleó medio selectivo para la detección de levaduras no Saccharomyces. Se concluyó que las 20 cepas en estudio no pertenecen a dicho género y se reafirma la utilidad de la técnica de cariotipaje para la caracterización de levaduras aisladas de diferentes ecosistemas.

Con el empleó del procedimiento 1 se obtuvo como resultado que la cepa **Levica 25** tuvo un 100 % de homología entre 98 cepas pertenecientes a 16 especies de levaduras del género

Candida, dentro de las que se encuentra Candida tropicalis. Por su parte, con el procedimiento 2 se obtuvo que la cepa **LEVICA-25** posee entre un 96 y 97 % de máxima identidad entre 99 cepas de la especie Candida tropicalis.

Con estos resultados se decidió emplear el segundo procedimiento para el resto de las cepas

de levaduras que conforman la colección del ICA. La tabla 1 muestra los resultados con más de un 95 % de máxima identidad con las especies correspondientes. De las 7 cepas 6

corresponden al género Pichia y de ellas 6 a la especie Pichia guillermondii. Se identificaron 5 cepas como Issatchenkia orientalis y sólo una como Rodotorula mucilaginosa. Las cepas 14, 16 y 20 no pudieron ser identificadas por problemas en la secuencia que se obtuvo. Las cepas identificadas fueron conservadas en un medio de cultivo específico para condiciones de congelación que permitirá una mejor preservación del cepario para los estudios futuros que se prevén.

La identificación de **LEVICA-25** como Candida tropicalis requerirá de estudios de

patogenicidad teniendo en cuenta que se puede emplear en la nutrición animal y que fue

aislada de un ecosistema muy específico que pudo provocar alguna variación en el genoma.

Por otra parte se podría realizar estudios de diferenciación a nivel de cepa. Para ello será

necesaria la realización de otros métodos de identificación más específicos y complejos que

presuponen la secuenciación total del ADN de la cepa.

**BIBLIOGRAFIAS**

Blondin, B. e Vézinhet F. (1988), Identification de souches de levures oenologiques par leurs

caryotypes obtenus em électrophorèse en champ pulsé. Révue Française d’Oenoligie, v.28,

p.7-11.

Lachance, M. A., Bowles, J. M., Starmer, W. T., Barker, J. S. F. 1999. Kodamaea

kakaduensis and Candida tolerans, two new yeast species from Australian Hibiscus flowers.

Canadian Journal Microbiology 45: 172-177.