



**ESPE**  
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS  
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA  
AGRICULTURA**

**CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

**TESIS PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE INGENIERO  
EN BIOTECNOLOGÍA**

**TEMA: “CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA, FISIOLÓGICA Y  
MOLECULAR DE LEVADURAS DE LA COLECCIÓN DE  
LEVADURAS QUITO-CATÓLICA, AISLADAS DE UN SISTEMA  
GLACIAR EN LA ISLA GREENWICH EN LA PENÍNSULA  
ANTÁRTICA”.**

**AUTOR: DAVID FERNANDO ILLESCAS FLORES**

**DIRECTOR: ALMA KOCH, M. Sc.**

**CODIRECTOR: ANDRÉS IZQUIERDO, Ph. D.**

**SANGOLQUÍ, MARZO DEL 2015**

## LEGALIZACIÓN DE FIRMAS

ELABORADO POR:

---

David Fernando Illescas Flores

COORDINADORA DE LA CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

---

Dra. María Augusta Chávez

SECRETARIO ACADÉMICO

---

Abg. Vinicio Zabala.

Lugar y fecha: \_\_\_\_\_

## CERTIFICACIÓN

Alma Koch, M.Sc.

Andrés Izquierdo, Ph. D.

### **Certifican:**

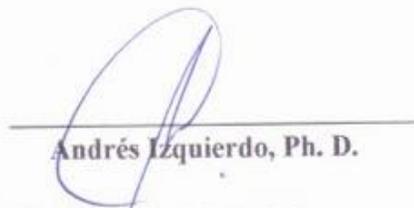
Que el trabajo titulado “CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA, FISIOLÓGICA Y MOLECULAR DE LEVADURAS DE LA COLECCIÓN DE LEVADURAS QUITO-CATÓLICA, AISLADAS DE UN SISTEMA GLACIAR EN LA ISLA GREENWICH EN LA PENÍNSULA ANTÁRTICA”, realizado por DAVID FERNANDO ILLESCAS FLORES ha sido guiado y revisado periódicamente y cumple las normas estatutarias establecidas por la ESPE, en el Reglamento de Estudiantes de la UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS - ESPE.

El mencionado trabajo consta de un documento empastado y un disco compacto el cual contiene los archivos en formato portátil de Acrobat (pdf). Autorizan a DAVID FERNANDO ILLESCAS FLORES que lo entregue a Dra. MARÍA AUGUSTA CHÁVEZ, en su calidad de Coordinadora de la Carrera.

Sangolquí, Marzo del 2015.

  
Alma Koch, M.Sc.

DIRECTOR

  
Andrés Izquierdo, Ph. D.  
CODIRECTOR

## DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD

David Fernando Illescas Flores

Declaro que:

El proyecto de grado denominado “CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA, FISIOLÓGICA Y MOLECULAR DE LEVADURAS DE LA COLECCIÓN DE LEVADURAS QUITO-CATÓLICA, AISLADAS DE UN SISTEMA GLACIAR EN LA ISLA GREENWICH EN LA PENÍNSULA ANTÁRTICA”, ha sido desarrollado con base a una investigación exhaustiva, respetando derechos intelectuales de terceros, conforme las citas que constan al pie de las páginas correspondientes, cuyas fuentes se incorporan en la bibliografía. Consecuentemente este trabajo es de mí autoría.

En virtud de esta declaración, me responsabilizo del contenido, veracidad y alcance científico del proyecto de grado en mención.

Sangolquí, Marzo del 2015.



---

David Fernando Illescas Flores

## AUTORIZACIÓN

Yo David Fernando Illescas Flores

Autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas-ESPE la publicación, en la biblioteca virtual de la Institución el trabajo “CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA, FISIOLÓGICA Y MOLECULAR DE LEVADURAS DE LA COLECCIÓN DE LEVADURAS QUITO-CATÓLICA, AISLADAS DE UN SISTEMA GLACIAR EN LA ISLA GREENWICH EN LA PENÍNSULA ANTÁRTICA”, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi exclusiva responsabilidad y autoría.

Sangolquí, Marzo del 2015.



---

David Fernando Illescas Flores

## **DEDICATORIA**

A mis padres que han sido un ejemplo de trabajo duro, constancia y emprendimiento; su apoyo y su amor han sido un impulso enorme en mi vida.

A mis hermanos John y Estefany que han estado junto mí, con su apoyo incondicional en mis estudios y en mi vida.

A mi querida novia Karen Mishel Benalcázar León, su amor me ha enseñado lo maravilloso de la vida y lo importante de levantarse después de una caída.

**David Fernando Illescas Flores**

## AGRADECIMIENTOS

A Dios por todas las bendiciones derramadas para culminar con éxito mi carrera, haber puesto en mi camino personas maravillosas y guiarme en los peores momentos.

A mis padres por su constante apoyo en mi vida estudiantil, impulsándome siempre a nuevos retos y experiencias.

A mis hermanos por su compañía en mis trabajos, pruebas y exámenes, siempre un aliento para seguir adelante.

A mi querida novia Karen Mishel Benalcázar León que me ha acompañado en la culminación de esta meta, su amor siempre está conmigo sin importar el tiempo. Mil gracias por aparecer en mi vida.

A mis amigos del cole: Javier, Yumi, Edgar, David y Teku, que a la distancia siempre he sentido su apoyo y sus buenos deseos en todo ámbito de mi vida.

A mis queridos amigos: Chintolo, New, Ponce, Anita, Sambo, Daniel, Cari y Adri, que han estado en todas las etapas de este aprendizaje académico y de vida que se llama Universidad. Siempre se quedarán en mi memoria las carcajadas, los juegos, las fugas, las farras, los viajes, las lágrimas, las amanecidas estudiando, los deberes prestados, las pruebas estresantes y su respectiva resignación, en fin todos los recuerdos que hicieron de estos 6 años algo inolvidable.

A mis amigos memorables: Natalie, Katy-chica, Juanfi, Andre, Chikitin, Estefy L, Stepby T, Estefy U, Evelina, Cindy, Dianita, Eve Cum y Mariu, que han compartido millón de momentos en la universidad y fuera de ella, siempre en mi corazón y con una gran sonrisa al recordarles.

A los nuevos y grandes amigos que llegaron al final de la carrera: Mijito, Llave, Salomita, Cris, Johanita, Andresiwiris, Alejo, Paulo e Inesita, que llegaron para convertirse en personas muy valiosas.

A mis amigos y tutores del laboratorio Carito, Berni, Moni, Pame y Andre, porque con su apoyo pude culminar con éxito mi tesis y además disfrutar de un ambiente de camaradería y trabajo único.

Al Ph. D. Javier Carvajal y M. Sc, Patricia Portero que han guiado constantemente el desarrollo académico de mi tesis, me han compartido sus conocimientos, me han acogido en el laboratorio y me han apoyado incondicionalmente. Muchas gracias por la oportunidad.

A Almita y al Ph. D. Andrés Izquierdo por su compañía en el correcto desarrollo de mi tesis, sus conocimientos han aportado sustancialmente en el logro de esta meta.

A la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, por financiar el proyecto cuyos resultados fueron parte de mi tesis, su asistencia económica y física fue indispensable para culminar con éxito esta investigación.

**David Fernando Illescas Flores**

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

LEGALIZACIÓN DE FIRMAS .....	ii
CERTIFICACIÓN .....	iii
DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD .....	iv
AUTORIZACIÓN.....	v
DEDICATORIA .....	vi
AGRADECIMIENTOS .....	vii
ÍNDICE DE CONTENIDOS .....	ix
LISTADO DE FIGURAS .....	xi
LISTADO DE CUADROS .....	xii
LISTADO DE ANEXOS .....	xiii
LISTADO DE ABREVIATURAS .....	xiv
RESUMEN.....	xv
ABSTRACT .....	xvi
1. CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN .....	1
1.1 Formulación del problema .....	1
1.2 Justificación del problema.....	2
1.3 Objetivos de la investigación .....	4
1.3.1 Objetivo general.....	4
1.3.2 Objetivos específicos .....	4
1.4 Marco Teórico.....	5
1.4.1 Levaduras: características principales.....	5
1.4.1.1 Phylum Ascomycetes .....	9
1.4.1.2 Phylum Basidiomycetes .....	9
1.4.2 Biodiversidad de levaduras .....	10
1.4.2.1 Índices de medición de biodiversidad de levaduras.....	13
1.4.3 Diversidad de levaduras en la Antártica.....	15
1.4.4 Taxonomía e identificación de levaduras.....	17

1.4.5 Levaduras aplicadas a la biotecnología.....	21
2. CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS .....	24
2.1 Toma de muestras y aislamiento de levaduras .....	24
2.2 Descripción morfológica y pruebas fisiológicas .....	26
2.3 Identificación de levaduras por técnicas moleculares .....	28
2.3.1 Extracción de ADN genómico .....	28
2.3.2 PCR-ITS .....	28
2.3.3 RFLP-ITS .....	29
2.3.4 PCR del dominio D1/D2 del segmento 26S ADNr.....	30
2.3.5 Sistema de purificación (Gen Clean) .....	30
2.3.6 Envío de muestras a secuenciar y análisis bioinformático.....	31
2.4 Análisis ecológico y distribución de las levaduras .....	32
3. CAPÍTULO 3: RESULTADOS.....	33
3.1 Caracterización macroscópica y microscópica .....	33
3.2 Caracterización fisiológica.....	36
3.3 Caracterización molecular.....	39
3.4 Diversidad de levaduras .....	42
4. CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN .....	45
4.1 Caracterización macroscópica y microscópica .....	45
4.2 Caracterización fisiológica.....	48
4.3 Identificación de especies y caracterización molecular .....	49
4.4 Diversidad de levaduras e Índices de diversidad .....	52
5. CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES .....	59
6. CAPÍTULO 6: RECOMENDACIONES.....	62
7. CAPÍTULO 7: BIBLIOGRAFÍA .....	63
8. CAPÍTULO 8. ANEXOS .....	73

## LISTADO DE FIGURAS

Figura 1. Puntos de muestreo: Estación 1, 2, 3 y 4 (sustrato glaciar). Estación 6, 7, 8 y 9 (sustrato líquido).....	24
Figura 2. A) Proceso de filtración de una muestra de agua colectada del Río Culebra en la Península Antártica. B) Siembra de los filtros muestreados en placas de agar YM.....	25
Figura 3. Características morfológicas de las colonias de levaduras aisladas en placas de agar.....	26
Figura 4. Resultado de las diferencias en la características macroscópicas de los aislados CLQCA-ANT-097 y CLQCA-ANT-105, correspondientes a <i>Cryptococcus victoriae</i> .....	34
Figura 5. Caracterización microscópica de la reproducción asexual por gemación acropetal del aislado CLQCA-ANT-105, correspondiente a <i>Cryptococcus victoriae</i> . Se utilizó un microscopio de contraste de fase, con una cámara adaptada y magnificación con un lente 100X.....	36
Figura 6. Árbol filogenético basado en el análisis de las secuencias del dominio D1/D2 del segmento 26S del RNA ribosómico de los 101 aislados de levaduras identificados. La nomenclatura del árbol determinada como CLQCA ANT corresponden a los aislados de levaduras identificadas previamente en Blastn, r representa a las secuencias de referencia reportada por otros autores y * representa a la especie tipo. Los valores de bootstrap corresponden a 1000. Se utilizó el modelo de Kimura de dos parámetros, teniendo en cuenta una probabilidad de agrupamiento verdadero mayor de 50% como válida para el modelo utilizando el programa Mega. Los números de acceso del NCBI están en paréntesis.....	41
Figura 7. Diversidad de los 101 aislados de levaduras colectados de un sistema glaciar en la isla Greenwich en la Península Antártica, durante el verano austral del año 2012.....	43

**LISTADO DE CUADROS**

Cuadro 1. Parámetros de evaluación de los resultados para las pruebas de asimilación de carbohidratos.....	27
Cuadro 2. Parámetros de evaluación de los resultados para las pruebas de fermentación de carbohidratos.....	28
Cuadro 3. Características morfológicas de las 101 colonias de las levaduras identificadas, evaluadas después de siete días de incubación a 25°C.....	34
Cuadro 4. Características microscópicas de las 13 colonias representativas de las levaduras identificadas, evaluadas después de tres días de incubación a 25°C.....	35
Cuadro 5. Perfiles de asimilación de azúcares de los 101 aislados de levaduras identificados. Los resultados fueron evaluados después de 21 días de incubación a 25°C.....	37
Cuadro 6. Perfiles de fermentación de azúcares de los 101 aislados de levaduras identificados. Los resultados fueron evaluados después de 21 días de incubación a 25°C.....	38
Cuadro 7. Tamaño en bp (Pares de bases) de los productos de PCR y los fragmentos de restricción del 5.8S-ITS de los 9 aislados representativos de las levaduras identificadas.....	39
Cuadro 8. Resumen del análisis en BLAST de los productos de PCR, del dominio D1/D2 del segmento 26S del RNA ribosómico, de los 9 aislados representativos de las levaduras identificadas.....	40
Cuadro 9. Distribución de los aislados de levaduras colectados de un sistema glaciar en la isla Greenwich en la Península Antártica, durante el verano austral del año 2012.....	43

## LISTADO DE ANEXOS

Anexo 1. Fotografías de la morfología de las colonias representativas de las levaduras identificadas tomadas después de siete días de incubación a 25°C. Fotografías tomadas con una cámara Sony semi profesional.....	73
Anexo 2. Fotografías microscópicas de las levaduras representativas identificadas tomadas después de tres días de incubación a 25°C. Se utilizó un microscopio de contraste de fase, adaptado a una cámara y magnificación con un lente 100X.....	77
Anexo 3. Fotografías en gel de agarosa al 0.8% teñido con bromuro de etidio, de los productos de PCR y los fragmentos de restricción del 5.8S-ITS de los aislados representativos de las levaduras identificadas.....	82
Anexo 4. Resumen del análisis de los productos de PCR, del dominio D1/D2 del segmento 26S del RNA ribosómico, de los aislados de las levaduras identificadas. Se utilizó el software Blastn y el programa Megablast.....	87
Anexo 5. Tabla de validación de los índices de diversidad con un 95% de confianza con un bootstrap calculado en base a 10000 iteraciones utilizando el programa PAST.....	92

## LISTADO DE ABREVIATURAS

**PCR:** Reacción en Cadena de la Polimerasa.

**PCR-ITS:** Reacción en Cadena de la Polimerasa del Espaciador Transcrito Interno

**RFLP-ITS:** Polimorfismo de la Longitud de Fragmentos de Restricción del Espaciador Transcrito Interno.

**ITS:** Espaciador Transcrito Interno

**ADN:** Ácido desoxirribonucleico.

**ANDr:** Ácido desoxirribonucleico ribosomal.

**UV:** Ultra violeta

**ARN:** Ácido ribonucleico.

**pb:** pares de bases.

**ATP:** Adenosin tri-fosfato

**UFC:** Unidades formadoras de colonias

**CoQ:** Coenzima Ubiquinona

**YM:** Medio de levaduras

**YNB:** Base nitrogenada de levaduras

**pH:** Potencial hidrógeno

**CLQCA:** Colección de Levaduras Quito-Católica

**ANT:** Antártica

## RESUMEN

En la presente investigación 101 aislados de levaduras, conservados en de la Colección de Levaduras Quito-Católica (código de referencia CLQCA-ANT), se caracterizaron e identificaron. Las muestras fueron colectadas de un sistema glaciar en la isla Greenwich en la Península Antártica. Es sistema glaciar está conformado por un glaciar, un riachuelo, una laguna y las aguas costaneras en las que desborda la laguna. Se evaluaron las características microscópicas de las células, las características de los cultivos, los perfiles fisiológicos de asimilación y fermentación de azúcares, los análisis moleculares para su identificación taxonómica y la diversidad de la comunidad a través de los índices de Shannon y Simpson. Los 101 aislados de levaduras se clasificaron dentro de siete géneros: *Rhodotorula*, *Leucosporidium*, *Guehomyces*, *Cryptococcus*, *Candida*, *Cystofilobasidium* y *Debaryomyces* mediante el análisis de las secuencias del dominio D1/D2 del segmento 26S del RNA ribosómico y los perfiles de restricción generados a partir de la técnica PCR-RFLPs del ITS. Además se determinó nueve especies, una de las cuales representa una especie aún no descrita del género *Rhodotorula* catalogada como CLQCA-ANT-002; su secuencia está depositada en el GenBank con el número de acceso HE994140.1. También se determinó en base a referencias científicas las posibles aplicaciones biotecnológicas de los diferentes aislados de levaduras caracterizadas.

**Palabras Clave:** Levaduras, PCR-RFLPs, Sistema glaciar, Índice de Shannon y Simpson, Aplicaciones biotecnológicas.

## ABSTRACT

101 isolates of yeasts, preserved at The Quito-Católica Yeast Collection (reference code CLQCA-ANT), were characterized and identified. The isolates were collected from a glacier system located in the Greenwich Island in the Antarctic Peninsula. The glacier system is composed by a glacier, a stream, a lagoon and the seashore waters where the lagoon overflows. Cells microscopic characteristics, culture characteristics, physiological profiles in the assimilation and fermentation of sugars, molecular analysis for taxonomic identification and diversity of the community with Shannon and Simpson index were evaluated. The isolates were distributed among seven genera: *Rhodotorula*, *Leucosporidium*, *Guehomyces*, *Cryptococcus*, *Candida*, *Debaryomyces* and *Cystofilobasidium*, through the sequence analysis of D1/D2 domain of the 26S ribosomal RNA segment and the ITS restriction profiles generated from the PCR-RFLP technology. Also nine yeasts species were identified and one of them represents an undescribed species of *Rhodotorula* genus, named as CLQCA-ANT-002; its sequence is deposited in the GenBank under accession number HE994140.1. The potential biotechnological applications of the characterized yeast isolates were determined in the scientific literature.

**Keywords:** Yeast, PCR-RFLPs, Glacier system, Shannon and Simpson index, Biotechnological applications.

## 1. CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

### 1.1 Formulación del problema

La Colección de Levaduras Quito Católica (CLQCA) tiene como principal objetivo el estudio de la biodiversidad y conservación *ex situ* de levaduras en el Ecuador. En la colección se mantienen conservados alrededor de 3200 aislados de las cuatro regiones del país y de la región Antártica. Algunos de estos aislados corresponden a especies no descritas aún por la ciencia. El trabajo continuo que involucran procesos de recolección de aislados de muestras, identificación macro y microscópica, evaluación de pruebas fisiológicas e identificación molecular a nivel de especie, ha permitido hasta la fecha describir nuevas especies de levaduras en el Ecuador como: *Candida carvajalis*, *Candida theae*, *Saturnispora quitensis*, *Wickerhamomyces arborarius*, *Kasachstania yasuniensis*, *Saccharomycopsis fodiens*, *Candida ecuadorensis* y *Kodamaea transpacífica* (Carvajal, et al., 2011).

Los métodos de análisis y caracterización han cambiado constantemente en el estudio científico de las levaduras. En principio se realizaba descripciones básicas de la morfología y se aplicaba varias pruebas fisiológicas, posteriormente se introdujeron pruebas bioquímicas, que incluso en la actualidad son de enorme importancia en el campo industrial, hasta llegar a la era de la genómica con la secuenciación de genes ribosomales para la identificación de especies (Verdugo & González, 2008; Robert, et al., 2006). Con los estudios de Kurtzman y Robnett (1998), “*Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences*”, y de Fell, et al. (2000), “*Biodiversity and systematics of Basidiomycetous yeast as determined by large-subunit rDNA D1/D2 domain sequence analysis*” se determinaron los lineamientos para la identificación molecular de levaduras y con ello se completaría una plataforma sobre la cual se desarrollaron múltiples estudios en la caracterización de levaduras, aisladas de diferentes ambientes naturales (Kurtzman & Fell, 2006).

Las levaduras son ubicuas y es posible encontrarlas en el suelo, aire, agua salina o ácida, en el intestino de animales, como agentes patógenos, asociados a plantas, en piezas arqueológicas e incluso en ambientes extremos como en los glaciares, conservadas por miles de años (Knowlton, et al., 2013; Carvajal, et al., 2011).

Varias investigaciones han centrado sus estudios en la caracterización de levaduras de ecosistemas glaciares, sus estrategias adaptativas frente a factores abióticos extremos como las bajas temperaturas, presión, salinidad y alta radiación UV, y su potencial uso biotecnológico (Buzzini, et al., 2012); la diversidad de levaduras aisladas de lagos en la Patagonia, síntesis de compuestos foto protectores y enzimas extracelulares (Brandao, et al., 2011); análisis microbiológicos en secciones de hielo de miles de años de antigüedad y su relación con diferentes factores abióticos (Knowlton, et al., 2013; Uetake, et al., 2011); y estudios en la diversidad y bioprospección de hongos aislados de comunidades de macroalgas en la Antártida y la producción de compuestos bioactivos (Gondinho, et al., 2013). La caracterización de levaduras es la base para el desarrollo de trabajos ecológicos, de biodiversidad y posibles aplicaciones científico-prácticas de estos microorganismos.

## **1.2 Justificación del problema**

Desde mediados del siglo XX la importancia científica en el estudio de la biodiversidad se basó en la generación y medición de hipótesis comprobables, así como de su relevancia económica y la preocupación por la masiva pérdida de la diversidad de especies en el mundo. Se estima que tan solo el 8% de la biodiversidad del planeta es conocida, y en el caso de las levaduras, el 99% de su abundancia potencial no ha sido descrita todavía, es por eso que a nivel mundial existen enormes esfuerzos en la caracterización de la biodiversidad de levaduras y su potencial uso biotecnológico (Lachance, 2006).

La biodiversidad de levaduras está ligada a diferentes factores bióticos y abióticos que potencian o coartan su estabilidad, por este motivo una innumerable

cantidad de especímenes de levaduras pueden perderse, en especial aquellas que están ligadas a ecosistemas u organismos específicos, y amenazados por condicionantes ambientales o humanas (Martini, 1992).

En el estudio de la biodiversidad de diferentes sustratos y ecosistemas: el aislamiento de levaduras para su posterior conservación *ex situ*, el análisis morfológico, fisiológico, bioquímico y molecular, pueden convertirse en la plataforma sobre la cual se desarrollen repositorios y colecciones de germoplasma, con diferentes aplicaciones biotecnológicas (Robert, et al., 2006). Las categorías ecológicas en las cuales se puede estudiar la biodiversidad de las levaduras están asociadas a elementos tecnológicos (yogurt, cerveza, vino, etc.), interacción benéfica/patógena con animales y humanos, y superficies naturales (Martini, 1992). El estudio de cada categoría ecológica posee un valor potencial para el mejor entendimiento y desarrollo científico e industrial, por ejemplo el estudio de la biodiversidad de levaduras en viñedos contribuye al progreso de la industria del vino (Pretorius, et al., 1999), el estudio de la diversidad de levaduras metilotróficas en la fermentación alcohólica contribuyen a dilucidar las rutas metabólicas para la generación de metanol y las enzimas relacionadas (Negruta, et al., 2010), el estudio de la biodiversidad de levaduras aisladas de diferentes sustratos para identificar y seleccionar las cepas más aptas para el uso como probióticos (Tiago, et al., 2009), entre otros estudios de biodiversidad son el primer paso para el desarrollo tecnológico y científico en diferentes áreas de desarrollo.

Los estudios científicos de la biodiversidad de levaduras en la zona Antártica incluyen: i) el análisis de secciones de hielo, que tienen miles de años de antigüedad, con el fin de entender la evolución, la variación de la diversidad y ecología microbiana a través del tiempo, con respecto a diferentes factores abióticos (Knowlton, et al., 2013; Ma, et al., 2000), ii) el aislamiento y caracterización de levaduras con la capacidad de producir diferentes enzimas extracelulares, micosporinas y carotenoides (Buzzini, et al. 2012; Brandao, et al., 2011; Vaz, et al., 2010), el análisis de las diferentes estrategias adaptativas a nivel genotípico y

fenotípico, para enfrentar los factores extremos propios de la región Antártica (Cimerman, et al., 2003).

Es evidente el impacto del estudio de la biodiversidad y ecología de levaduras en la zona Antártica, su importancia radica en el mejor entendimiento de los procesos de adaptación y evolución microbiana, así como en los potenciales usos biotecnológicos a partir de la caracterización fisiológica y molecular de los aislados. El presente estudio está enfocado en la biodiversidad y ecología de levaduras, aisladas de un sistema glaciar en la isla Greenwich en la Península Antártica, y una revisión bibliográfica de los potenciales usos biotecnológicos de las cepas caracterizadas y conservadas dentro de la Colección de levaduras Quito-Católica.

### **1.3 Objetivos de la investigación**

#### **1.3.1 Objetivo general**

Caracterizar morfológica, fisiológica y molecularmente las levaduras de la Colección de Levaduras Quito-Católica, aisladas de un sistema glaciar en la isla Greenwich en la Península Antártica.

#### **1.3.2 Objetivos específicos**

- Determinar las características morfológicas y fisiológicas de las levaduras de la Colección de Levaduras Quito-Católica, aisladas de un sistema glaciar en la Península Antártica.
- Identificar molecularmente las levaduras de la Colección de Levaduras Quito-Católica, aisladas de un sistema glaciar en la Península Antártica.
- Determinar los índices de diversidad de Shannon y de Simpson de las levaduras de la Colección de Levaduras Quito-Católica, aisladas de un sistema glaciar en la Península Antártica.

## 1.4 Marco Teórico

### 1.4.1 Levaduras: características principales

Las levaduras son microorganismos eucariotas que pertenecen al reino Fungi, específicamente al Phylum Basidiomycota y Ascomycota, son predominantemente unicelulares, aunque algunas especies de levaduras pueden desarrollar formaciones multicelulares denominadas pseudohifas, e incluso formar hifas verdaderas como en el caso de *Candida albicans* (Kurtzman & Piskur, 2006). Las levaduras pueden definirse como hongos que predominantemente tienen una reproducción asexual por gemación o fisión, con estadios sexuales que no están encerrados en cuerpos fructíferos y cuyo crecimiento corresponde generalmente a células individuales (Kurtzman, et al., 2011).

Las levaduras presentan una gran diversidad con respecto a su tamaño, forma, color y textura, incluso colonias de células provenientes de una misma cepa pueden presentar heterogeneidad morfológica. El tamaño celular de las levaduras puede variar de 3  $\mu\text{m}$  a 50  $\mu\text{m}$  de longitud y de 1  $\mu\text{m}$  a 10  $\mu\text{m}$  de ancho, dependiendo de la especie. La forma de las levaduras también puede variar enormemente incluyendo estructuras ovoides, esféricas, semi esféricas, apiculadas, curvas, triangulares, ojivales, filamentosas y elongadas (Wiley & Sons, 1998).

Las levaduras como toda célula eucariota poseen las estructuras subcelulares típicas, que incluye el citoesqueleto, un núcleo y varios organelos como el retículo endoplasmático, el aparato de Golgi, mitocondrias y microcuerpos (peroxisomas y glioxisomas); como las plantas posee vacuola y una pared celular rígida que rodea la membrana plasmática (Van der Klei, et al., 2011).

El núcleo contiene el material genético de la célula, está rodeado por una doble membrana y una envoltura nuclear externa con numerosos complejos de poros nucleares. El citoesqueleto está conformado principalmente por filamentos de actina y tubulina, está relacionado con la morfogénesis, la polaridad celular y el transporte

intercelular. La vacuola de las levaduras actúa como los lisosomas de las células animales, interviene en la degradación de los componentes celulares por medio de la autofagia, también es importante en los procesos de osmoregulación y el almacén de iones, aminoácidos y polifosfatos; está conformada por un lumen rodeado por una membrana simple, tiene un carácter ácido y en su interior posee hidrolasas encargadas de la degradación (Van der Klei, et al., 2011).

El retículo endoplasmático (RE) está conformado por una compleja red de membranas, parte del RE es continuo a la envoltura nuclear y el resto se encuentra en la periferia celular; el RE interviene en la biosíntesis de lípidos y el transporte de proteínas celulares. Las mitocondrias son organelos que están conformadas por cuatro sub compartimentos, la membrana exterior con porinas, la membrana interna con numerosas invaginaciones (crestas), el espacio inter membrana y la matriz; estos organelos son responsables de la síntesis de ATP en el crecimiento aeróbico celular. Los microcuerpos están conformados por una matriz proteínica rodeados por una membrana simple; están relacionados a una gran variedad de rutas metabólicas aunque predominantemente están encargados del metabolismo de compuestos carbonados y fuentes de nitrógeno (Van der Klei, et al., 2011).

Las levaduras para su metabolismo celular necesitan fuentes de carbono orgánico, fuentes de nitrógeno mineral u orgánico, vitaminas y otros factores de crecimiento. El metabolismo de las levaduras se refiere a los procesos anabólicos y catabólicos de nutrientes, la regulación enzimática de las rutas metabólicas, la regulación bioquímica de la fermentación y la respiración celular. En las rutas anabólicas es necesario un consumo de energía, incluyen procesos de reducción y la biosíntesis de componentes celulares, mientras las rutas catabólicas incluyen procesos oxidativos para generar energía principalmente en forma de ATP (Rodrigues, et al., 2006).

En las rutas metabólicas que toman las levaduras para generar y consumir energía existe una gran divergencia y aunque para su actividad celular pueden

utilizar diferentes fuentes de carbono, preferiblemente utilizan azúcares, los cuales pueden ser monosacáridos como la glucosa, la fructosa, la galactosa y la manosa o disacáridos como la sacarosa y la maltosa. Aunque las levaduras pueden utilizar una vasta cantidad de rutas metabólicas para obtener energía de las fuentes de carbono y energía disponibles, las condiciones ambientales serán determinantes en el metabolismo celular (Rodríguez, et al., 2006; Wiley & Sons, 1998).

Las levaduras se pueden clasificar metabólicamente, con respecto al proceso de generación de energía, como levaduras no fermentativas por ejemplo *Rhodotorula glutinis*, fermentativas obligadas como *Candida slooffii* y fermentativas facultativas, que dependiendo de las condiciones de crecimiento, el tipo de azúcar y la disponibilidad de oxígeno pueden seguir rutas metabólicas exclusivas de la respiración celular, un metabolismo fermentativo o una combinación de ambas, a este grupo pertenecen la mayor parte de las levaduras conocidas (Rodríguez et al., 2006).

En el metabolismo de las levaduras la presencia de oxígeno facilita la asimilación de carbohidratos para producir biomasa y CO<sub>2</sub>, en cambio cuando el oxígeno está ausente o en cantidades reducidas las levaduras empiezan un metabolismo anaerobio o fermentativo, proceso en el cual se produce etanol y una menor cantidad de biomasa. También el oxígeno es fundamental en la síntesis de ácido nicotínico y esteroides (Uribe, 2007).

Las levaduras requieren diferentes nutrientes para asegurar la viabilidad celular y el correcto funcionamiento de las diferentes rutas anabólicas y catabólicas. El nitrógeno es fundamental y es incorporado en forma de ión amonio para la síntesis de aminoácidos. El fósforo es necesario para la síntesis de fosfatos, hexosas y triosas, y también en la producción de etanol. El potasio estimula la respiración y la fermentación, además es efector de múltiples enzimas y catión regulador. El magnesio es requerido como cofactor enzimático, facilita la síntesis de ácidos grasos, interviene en el transporte celular de fósforo y participa en la regulación enzimática de

las ATPasas de las membranas. Finalmente el calcio es fundamental en el crecimiento celular, manteniendo la integridad de la pared y la membrana citoplasmática (Uribe, 2007).

Las levaduras son las únicas formas de vida que pueden sobrevivir tanto en su forma haploide, células con un solo set de cromosomas (16 cromosomas en el caso de *Saccharomyces cerevisiae*), o en su forma diploide con dos sets de cromosomas. El tamaño de las células haploides y diploides varía en dependencia de la fase de crecimiento y de las especie, por ejemplo en *Saccharomyces cerevisiae* el diámetro esférico de una célula haploide es de 4  $\mu\text{m}$ , mientras el diámetro elipsoidal de una célula diploide es de 5 por 6  $\mu\text{m}$  aproximadamente. Además en algunas especies de levaduras las células diploides se organizan en formaciones denominadas pseudohifas, que son células más elongadas, donde las células madre e hijas se ubican una tras otra (Scheneiter, 2004).

La reproducción vegetativa o asexual de las levaduras generalmente se da por gemación, proceso en el que las células hijas inician como una protuberancia de la célula madre, seguida por una división nuclear, la formación de un septo y finalmente la separación total de la célula madre; generalmente cada célula madre no forma más de 30 células hijas, y su edad puede ser determinada por el número de cicatrices en la pared celular (Scheneiter, 2004). Otra forma menos común de reproducción vegetativa es la fisión de levaduras que se produce por la formación de un septo que constriñe la célula hasta formar dos células hijas de igual tamaño e igual carga de material genético. Por otra parte, la reproducción sexual de las levaduras inicia con la conjugación de dos células haploides reproductivamente compatibles, con un tipo de célula sexual  $\alpha$  + otra célula sexual  $\alpha$ , donde es necesario una sincronización de los ciclos celulares en respuesta a factores hormonales, posteriormente se produce la fusión de las membranas y la cariogamia lo que produce una célula diploide. El cigoto diploide puede seguir un ciclo mitótico de reproducción en condiciones óptimas de crecimiento, pero en condiciones

desfavorables se puede inducir un proceso de meiosis y esporulación que resulta en la formación de cuatro esporas haploides (Conde, 2007; Wiley & Sons, 1998).

#### **1.4.1.1 Phylum Ascomycetes**

Las levaduras que pertenecen a los ascomicetes forman un grupo monofilético y comprende alrededor de 1000 especies, son filogenéticamente muy diversas y recientemente han sido catalogadas dentro de 14 linajes en base a múltiples análisis de secuenciación. Los diferentes linajes del Phylum Ascomycota comprenden cuatro clases: Neoelectomycetes, Pneumocystidomycetes, Schizosaccharomycetes y Taphrinomycetes (Roberts & Oliver, 2010).

Las levaduras ascomicetes pueden diferenciarse de otros taxones en relación a características morfológicas, fisiológicas y ultra estructurales, en correspondencia a análisis filogenéticos determinados por secuenciación de genes. Generalmente los ascomicetes presentan una división celular por gemación multi lateral, gemación bipolar y fisión, perfiles determinados en la composición de ácidos grasos de cadena larga en la pared celular, presentan en el contenido de ADN nuclear una composición mol% G+C del 30-50% y una reacción negativa con diazonio azul B (Kurtzman, et al., 2011).

#### **1.4.1.2 Phylum Basidiomycetes**

Los basidiomicetos pueden presentar un estado haploide levaduriforme alternativo con un estado dicariótico hifal, es decir que este Phylum es dimórfico. Las especies de levaduras reconocidas, pertenecientes al Phylum Basidiomycetes están dentro de tres diferentes subphylum: Pucciniomycotina con sus clases Puccinomyces, Mixiomycetes, Agaricostilbomycetes, Cystobasidiomycetes y Microbotryomycetes Agaricomycotina con su clase Tremellomycetes, y Ustilaginomycotina con sus clases Ustilaginomycetes y Exobasidiomycetes (Kurtzman, et al., 2011).

Estas especies son consideradas económica, médica y tecnológicamente de mucha importancia, lo que ha potenciado el interés en el entendimiento de su biodiversidad y ecología para su explotación biotecnológica. El estado levaduriforme usualmente empieza con la germinación de la basidiospora y termina al iniciar el estado dicariótico, en las levaduras telomórficas, y su ciclo de vida incluyen sistemas heterotálicos y homotálicos (Kurtzman, et al., 2011; Fell, et al., 2000).

Las levaduras anamórficas pueden ser designadas dentro del Phylum Basidiomycota en relación a una serie de características morfológicas, fisiológicas y ultra estructurales. Presentan una reacción positiva con diazonio azul B, en el contenido de ADN nuclear una composición mol% G+C del 50-70%, contienen ácido pirofosfatídico, presentan actividad ureasa, y se diferencian en la composición bioquímica de la pared celular y las cápsulas de polisacáridos (Kurtzman, et al., 2011).

#### **1.4.2 Biodiversidad de levaduras**

La palabra biodiversidad ha tenido múltiples significados para los científicos, Gaston en 1996 realizó una revisión de varias definiciones, concluyendo que es una expresión abstracta ligada a las diferentes variaciones de la vida en el planeta. Artículos académicos relacionados a la biodiversidad de levaduras aparecieron hace 15 años aproximadamente, haciendo alusión a estudios en ecología y taxonomía. En 1992 la Convención en Diversidad Biológica define la Biodiversidad como “La variabilidad entre los organismos vivos de diferentes sustratos, incluyendo entre otros el terrestre, el marino, los diferentes sistemas acuáticos y los complejos ecológicos de los cuales son parte; esto incluye la diversidad entre especies, dentro de la misma especie y entre los ecosistemas (Carvajal, et al., 2011; Lachance, 2006).

Los estudios en la biodiversidad se basan en la descripción, análisis y la preservación de los especímenes, para esto es indispensable un sistema de

conservación óptimo que proporcione estabilidad a las características morfológicas, fisiológicas, bioquímicas y genéticas a lo largo del tiempo. El desarrollo de técnicas microbiológicas estériles para la purificación y adopción de cultivos puros de levaduras comerciales, para la industria cervecera hacia 1900, fue una innovación crucial para el uso industrial de levaduras y como herramienta fundamental para la conservación de la biodiversidad; a través de estas colecciones de levaduras se presenta la oportunidad para la investigación y análisis de especímenes previamente conservados, desarrollo de catálogos, programas de mejoramiento y uso de cepas de interés biotecnológico. Además las colecciones de levaduras brindan facilidades como centros de información científica, proveen de cursos y entrenamiento práctico para el desarrollo de la ciencia y la industria (Robert, et al., 2006).

La biodiversidad de una comunidad microbiana en la naturaleza representada por las levaduras, cumple un papel fundamental en la transformación de nutrientes en los procesos de descomposición y se relacionan íntimamente con otros organismos con acciones mutualistas, parásitas, competidoras y patógenas. La ubiquidad de levaduras en las diferentes regiones del planeta está relacionada a su diversidad, especificidad de hábitat, relaciones de dependencia con otros organismos y su forma de propagarse. En el ámbito ecológico la biodiversidad de levaduras se enfoca en la descripción de las formas de propagación, análisis de sustratos, interrelaciones con otros organismos y su influencia en el hábitat (Starmer & Lachance, 2011).

Las levaduras están distribuidas en casi todos los ambientes del planeta con la capacidad de ofrecer las condiciones mínimas de crecimiento o conservación; están adaptadas a diversos climas, altitudes, sustratos y condiciones geográficas. Las categorías ecológicas en las cuales se puede estudiar la biodiversidad de las levaduras son: i) asociadas con elementos tecnológicos (yogurt, cerveza, vino, etc.) ii) asociadas con la salud de animales y iii) asociadas con superficies naturales (Martini, 1992); por ejemplo se puede encontrar levaduras en la estratósfera, en fragmentos glaciares, en las profundidades marinas, diferentes tipos de suelos, en

diferentes causas de agua, en los intestinos de vertebrados e invertebrados y en otros ambientes de condiciones extremas. Algunas especies de levaduras parecen estar restringidas a nichos específicos o asociadas con un hospedero particular, lo cual pone de manifiesto su potencial extinción en base a su relación de dependencia (Carvajal, et al., 2011; Lachance, 2006).

La biodiversidad dentro de una comunidad de levaduras puede variar en dependencia de la biogeografía, lo que hace referencia a que una comunidad puede verse afectada por el área, los mecanismos de dispersión y la historia climática de la región, así como también en dependencia de lo que se conoce como normas de ocupación de nicho, relacionado a las propiedades intrínsecas de las especies con respecto al hábitat y otros miembros de la comunidad. Un ejemplo de este efecto es el estudio de la biodiversidad de levaduras ascomicetes asociadas a ecosistemas dependientes de los insectos (Lachance, et al., 2003).

Además de la biodiversidad de levaduras con respecto a la biogeografía y normas de nicho, también existe diversidad entre especies y dentro de la misma especie, efecto que es potenciado por el marcado dinamismo molecular con respecto a cambios adaptativos del medio. La tasa alta de mutación de las levaduras, por ejemplo para un gen de *Saccharomyces cerevisiae* es de  $10^{-10}$ /par de bases/generación, da como resultado una gran variabilidad de cepas de levaduras dentro de una misma especie (Roberts & Oliver, 2010).

Dentro de una misma especie también existe una gran variabilidad, por ejemplo el estudio y secuenciación de más de 70 aislados de levaduras de *Saccharomyces cerevisiae*, reveló por lo menos cuatro linajes distintos separados geográficamente, con una variabilidad considerable dentro de cada uno. Así también, al analizar las cepas utilizadas comercialmente se encontró variabilidad genómica, hibridación cruzada entre diferentes cepas y diversidad en el número de copias de ciertos genes de diferentes sub-especies; características determinadas en base a la selección

artificial. La misma proyección se puede realizar acerca de las levaduras todavía no estudiadas o descritas (Roberts & Oliver, 2010).

El estudio de la biodiversidad de levaduras a nivel intra e inter específico está recién comenzando, a pesar de los enormes avances en la aplicación de técnicas de biología molecular, es por esto que los esfuerzos en la identificación, caracterización y preservación de los aislados son indispensables como plataforma de aplicación biotecnológica y reservas permanente de material genético (Carvajal, et al., 2011; Lachance, 2006).

#### **1.4.2.1 Índices de medición de biodiversidad de levaduras**

La medición de la biodiversidad es comúnmente usada para determinar la estabilidad (a mayor diversidad mayor estabilidad) dentro de un ecosistema en base a la cantidad y variación de organismos en un área específica, con respecto a tres componentes: diversidad genética, de especies y de ecosistemas. Las comunidades más estables presentan una gran cantidad de individuos que están distribuidos uniformemente dentro de tamaños poblacionales normales. La medición de la biodiversidad debe preocuparse de la evaluación de la riqueza biológica (identificación de todos los taxones en un ecosistema), la significación implícita en el espacio a estudiar, la unidad de medida y la elección del índice de medida adecuado (Allen, et al., 2009; Jhosmar, 2009).

Una baja diversidad de especies sugiere: éxito relativamente bajo de especies en un hábitat, condiciones ambientales estresantes con pocos nichos ecológicos donde solo organismos específicos están adaptados, redes alimenticias relativamente simples y cambios ambientales que probablemente tienen serios efectos en la comunidad. En cambio, una diversidad alta de especies sugiere: una mayor cantidad de especies exitosas, un ambiente menos hostil con más nichos para las especies,

redes de alimento complejas y un menor cambio en el ecosistema con respecto a variaciones climáticas (Bouza & Covarrubias, 2005).

Los científicos ambientales utilizan una variedad de métodos para comparar la biodiversidad de diferentes ecosistemas y monitorear las fluctuaciones en los programas de conservación. En términos cuantitativos, la diversidad de especies presenta dos componentes: la riqueza que hace referencia al número de especies en la comunidad y la dominancia que hace referencia a la distribución de los individuos entre las especies (Allen, et al., 2009; Jhosmar, 2009).

Uno de los métodos más populares es utilizar la abundancia relativa de diferentes especies por medio del Índice de Simpson, expresado por la siguiente fórmula:

$$\text{Índice de Simpson: } D = 1 - \sum_{i=1}^s p_i^2$$

Donde  $p$  es la proporción ( $n/N$ ) de individuos de una especie particular ( $n$ ) dividido para el número total de especies en una comunidad ( $N$ ),  $\sum$  es la sumatoria de los elementos y  $s$  es el número de individuos.  $D$  toma valores de 0 a 1, donde 1 representa diversidad infinita y 0 representa diversidad nula en un área determinada (Nagendra, 2002). El índice de Simpson depende de la cantidad de categorías que es posible reconocer y proporciona una idea de la homogeneidad de la comunidad considerando que un sistema es más diverso mientras haya una distribución más equitativa y una dominancia baja (Jhosmar, 2009).

Otro método utilizado es el índice de Shannon que se basa en la teoría de la información, expresado con la siguiente fórmula:

$$\text{Índice de Shannon } H = - \sum_{i=1}^s p_i \ln(p_i)$$

Donde  $p$  es la proporción ( $n/N$ ) de individuos de una especie particular ( $n$ ) dividido para el número total de especies en una comunidad ( $N$ ),  $\sum$  es la sumatoria de los elementos,  $\ln$  es el logaritmo natural y  $s$  es el número de individuos. En la mayoría de ecosistemas naturales  $H$  toma valores entre 1 y 5, aunque excepcionalmente puede haber casos que presenten valores superiores (arrecifes de coral) o inferiores (zonas desérticas). Este índice toma en cuenta los dos componentes de la biodiversidad: riqueza y abundancia, pero limita sus resultados al comparar ecosistemas con diferenciales de riqueza muy grandes (Kerckhoff, 2010).

### **1.4.3 Diversidad de levaduras en la Antártica**

Cerca del 80% de la biósfera del planeta se encuentra periódica o permanentemente a temperaturas bajas los 5°C, se incluyen las profundidades marinas, los desiertos y los glaciares. Los sistemas glaciares comprenden conformaciones complejas de mares y lagos helados, casquetes y capas de hielo continentales, y de tierra congelada (Buzzini, et al., 2012).

La Antártica es el sistema glaciar más extenso con 14.000.000 Km<sup>2</sup> y el 99% de su superficie está cubierta por nieve, considerado uno de los hábitats más extremos no solo por su temperatura sino también por presentar un ambiente muy seco, vientos intensos y radiación solar elevada en la temporada de verano. A pesar de las condiciones ambientales en la Antártica, la región hospeda de formas de vida como bacterias, hongos, invertebrados pequeños, líquenes, mamíferos y aves que han desarrollado diferentes estrategias adaptativas, genotípicas y fenotípicas para sobrevivir a bajas temperaturas, alta salinidad y alta radiación solar. Los microorganismos psicrófilos que habitan estos ecosistemas definen los límites más bajos de temperatura a los cuales puede desarrollarse la vida (Clarke, et al., 2012; Shivaji & Prasad, 2009).

El continente Antártico está cubierto casi completamente por una vasta capa de hielo de aproximadamente 4 km de ancho, donde existe un gran número de lagos que se localizan generalmente en áreas costeras. Los lagos en la Antártica se caracterizan por temperaturas bajas continuas, niveles bajos de radiación fotosintética activa anualmente y bajas concentraciones de nutrientes inorgánicos como nitrógeno y fósforo. Pocas especies están adaptadas a sobrevivir en estas condiciones extremas que contienen truncadas redes de alimento muy simplificadas (Pearce & Laybourn, 2012).

En estos ambientes de frío extremo se han desarrollado microorganismos extremófilos, denominados psicrófilos, cuyo crecimiento óptimo está definido a una temperatura de 15°C, una temperatura máxima no mayor a 20°C y una temperatura mínima de hasta 0°C, y también microorganismos psicrotolerantes que pueden adaptarse a temperaturas de hasta 0°C pero cuyo crecimiento óptimo está entre los 20-30°C. En la Antártica ambos tipos de microorganismos están relacionados a procesos de degradación de materia orgánica y en los diferentes ciclos de los nutrientes esenciales en la criósfera (Buzzini, et al., 2012; García, et al., 2007). El estudio de los microorganismos psicrófilos y psicrotolerantes define los límites de temperatura inferiores para el desarrollo de la vida y pueden ser utilizados como modelos biológicos para entender los sistemas enzimáticos de adaptación al frío extremo. Más aún, tanto las bacterias como las levaduras aisladas de diferentes sustratos de la zona Antártica han sido estudiadas con respecto a sus características de crecimiento, distribución ecológica e importancia taxonómica, simultáneamente con un análisis de sus posibles usos biotecnológicos (Shivaji & Prasad, 2009).

La biodiversidad de levaduras y hongos filamentosos en ecosistemas antárticos aumenta en relación a viabilidad biológica de agua y energía, lo que es un factor determinante en la actividad microbiana (Cimerman, et al., 2003). Además el hielo glacial conforma una matriz de protección para la preservación de microorganismos por periodos largos de tiempo y proporcionan registros de evolución microbiana y

diversidad ancestral (Li-Jun, et al., 2000). De hecho se han recuperado microorganismos viables de capas de hielo que datan de 150000 de años en el pasado (Knowlton, et al., 2013).

Las levaduras conforman un grupo muy versátil de microorganismos que presentan un perfil nutricional heterogéneo y están adaptadas a hábitats con condiciones extremas naturales o artificiales; la zona Antártica no podía ser la excepción y se ha encontrado diversidad de levaduras en diferentes aislados (Buzzini, et al., 2012). Algunas de las adaptaciones que les han permitido a estos microorganismos desarrollarse y sobrevivir bajo condiciones ambientales extremas han sido la composición particular de ácidos grasos insaturados en sus membranas (50% al 90%) presente en géneros como *Torulopsis*, *Leucosporidium*, *Cryptococcus* y *Candida*; la síntesis de proteínas de shock térmico y/o la acumulación de trealosa como en *Makria frígida* y *Leucosporidium scottii* (Shivaji & Prasad, 2009).

Las levaduras aisladas e identificadas en la Antártida pertenecen a 70 especies (13 ascomycetes y 57 basidiomycetes) y otras especies levaduriformes como *Aureobasidium pullulans*. La mayor parte de los aislados muestran una distribución uniforme, han sido recolectadas principalmente del suelo antártico, con una abundancia que varía desde 5 hasta  $10^5$  UFC g<sup>-1</sup>. La variación estacional de temperaturas, la viabilidad de agua, algunos factores químicos y físicos como la conductividad eléctrica, aparentemente provocan cambios en la abundancia y distribución de las levaduras (Knowlton, et al., 2013; Buzzini, et al., 2012).

#### **1.4.4 Taxonomía e identificación de levaduras**

Las reglas para la taxonomía levaduras y otros hongos están bajo la autoridad del Código Internacional de Nomenclatura Botánica, cuya última adaptación fue realizada en el 2005; en este código se describe la plataforma para la organización taxonómica y define que para la publicación de nuevas especies es esencial la

determinación y descripción de las características que le distinguen de un taxón previamente descrito. Entre los organismos vivos solo los hongos pueden presentar dos nombres válidos en base a su estado sexual, anamórfico o asexual y telomórfico o sexual, esto se debe a que en muchos hongos no se ha determinado su estado sexual, o en su defecto no se ha identificado claramente si una especie particular en su estado anamórfico es la misma que otra especie en su estado telomórfico (Kurtzman, et al., 2011).

La taxonomía ha sido la base para identificar y clasificar a las especies, al principio usando descripciones morfológicas y/o fisiológicas, y actualmente utilizando técnicas de biología molecular (Verdugo & González, 2008). En los primeros trabajos científicos, la identificación de levaduras y otros hongos se realizaba en base a sus características fenotípicas, por ejemplo: fermentación de azúcares, crecimiento en varios compuestos orgánicos y la presencia de ciertos caracteres morfológicos. Aunque la descripción fenotípica puede ser usada para definir ciertas especies de levaduras en muchos casos, el uso de herramientas moleculares ha demostrado que varios de los resultados en base a estas descripciones son incorrectos; convirtiendo las comparaciones moleculares en un eje de la taxonomía de levaduras (Kurtzman & Piskur, 2006; Kurtzman & Fell, 2006).

Los criterios morfológicos y fisiológicos en la identificación de levaduras requieren varias repeticiones y la aplicación de hasta unas cien pruebas o caracteres distintos. Entre ellos podemos mencionar la determinación del estado sexual o asexual, presencia de homo y heterotalismo, tamaño, aspecto macroscópico, asimilación de compuestos nitrogenados, termotolerancia, pruebas de asimilación y fermentación de azúcares, análisis de patrones de isoenzimas, cromatografía de ácidos grasos de cadena larga de la pared celular, entre otros. La ambigüedad en muchas de estas pruebas está determinada por la variabilidad de los criterios morfológicos y fisiológicos, en dependencia de las condiciones de cultivo y adaptaciones al medio (Linares & Solís, 2007; Orberá, 2004).

A pesar de la variabilidad fenotípica de las levaduras, existen características químicas y fisiológicas que contribuyen su taxonomía (Prillinger, et al., 2011). La Quimiotaxonomía incluye la caracterización de la composición de carbohidratos de la pared celular, coenzima Q, electroforesis enzimática y el análisis de ácidos grasos. Además múltiples estudios en los patrones de electroforesis de enzimas pueden utilizarse en la taxonomía de levaduras para diferenciar entre géneros y especies (Prillinger, et al., 2011).

El análisis de secuencias de ADN y otros métodos de biología molecular se han convertido en herramientas indispensables para la identificación de levaduras. Entre las principales técnicas tenemos: estudios cuantitativos de reasociación de ADN nuclear, comparación de secuencias de genes, reconocimiento de especies mediante análisis filogenético de multigenes y métodos moleculares rápidos para la identificación y cuantificación (Kurtzman, et al., 2011). Puntualmente las principales técnicas moleculares que se utilizan en la taxonomía de levaduras son: la secuenciación de genes ribosomales, el análisis del ADN polimórfico amplificado aleatoriamente (RAPD), el análisis del polimorfismo de la longitud de fragmentos de restricción (RFLP), el análisis del polimorfismo de simple nucleótido (SNP), el análisis del polimorfismo de la longitud de fragmentos amplificados (AFLP), análisis con microsatélites, electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización (PCR-DGGE), citometría de flujo y PCR en tiempo real (Segura, et al., 2010; Verdugo & González, 2008).

La secuenciación de genes ribosomales 5.8S, 18S y 26S es el método más utilizado porque ofrece resultados precisos y con alta resolución para la identificación de especies (Martorell, 2005). En 1998 Kurtzman y Robnett secuenciaron los dominios variables 1 y 2 (D1/D2) del segmento 26S del RNA ribosómico de todas las cepas de ascomicetes conocidas hasta entonces y pudieron establecer un método rápido para la identificación de especies descritas, para la resolución de nuevas especies y para establecer las bases filogenéticas de las

levaduras; este trabajo fue complementado por el estudio de Fell en el 2000 con levaduras basidiomicetas (Kurtzman & Fell, 2006). La disponibilidad, en base a trabajos previos, de secuencias de la región D1/D2 del segmento 26S del ARN ribosómico guardadas en bases de datos como GenBank, hace de esta técnica una herramienta rápida y confiable para la identificación de especies de levaduras (Martorell, 2005).

La técnica de RFLP se utiliza comúnmente para la identificación y filogenia de levaduras, utilizando la región rDNA 5.8S y los espaciadores transcritos internos ITS1 e ITS2. La región correspondiente al ITS1 e ITS2 separados por el segmento 5.8S, presentan una alta variabilidad en la zona de los ITS, que permite la resolución a nivel inter específico. La variante de esta técnica conocida como RFPL-PCR es la más utilizada, en ésta por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se amplifican unos fragmentos específicos de ADN que luego son tratados con endonucleasas de restricción, con el fin de obtener determinados perfiles de restricción para cada especie analizada. La variabilidad de las secuencias determina fragmentos de distintos tamaños que pueden ser revelados mediante electroforesis en gel de agarosa (Verdugo & González, 2008; Kurtzman & Fell, 2006).

La filogenia se encarga del estudio del desarrollo evolutivo de un grupo de organismos en base al análisis de la información proporcionada por la resolución de secuencias de ADN. Las relaciones filogenéticas entre las levaduras y otros tipos de hongos se pueden resolver a partir del análisis de la divergencia entre las secuencias de genes. La mayoría de análisis utilizan secuencias del ADN ribosomal, sin embargo las secuencias de otros genes pueden ser utilizados, sin reportarse variabilidad en los resultados. La utilización de genes múltiples en el análisis filogenético confiere a los resultados mayor congruencia y soporte científico; por ejemplo Kurtzman y Bobnett (2003) analizaron las relaciones filogenéticas entre 80 especies del “complejo *Saccharomyces*”, combinando análisis del 18S y 26S del ADNr con el análisis de los genes del factor de elongación 1- $\alpha$  y citocromo oxidasa

II, concluyendo que es un método eficaz para la resolución de clados. Sin embargo, el análisis filogenético basado en un gen del ADNr ha establecido muchas de las relaciones aceptadas entre los hongos (Kurtzman & Piskur, 2006).

Análisis filogenéticos han reportado que ascomycetes y basidiomycetes son taxa emparentados y que los zygomycetes representan una línea basal relativamente cercana en el tiempo. La divergencia de una especie en el tiempo se basa en la estimación del reloj molecular; por ejemplo las sustituciones específicas en la región del ADNr varían entre los linajes, lo cual puede determinar la variabilidad en la estimación de la divergencia de especies en el tiempo. Además, el desarrollo evolutivo de las levaduras está influenciado al menos por dos mecanismos moleculares: la duplicación total del genoma y la transferencia horizontal de genes (Kurtzman & Piskur, 2006).

La combinación tanto de técnicas moleculares, descripciones morfológicas y pruebas fisiológicas son la base para la correcta identificación y caracterización de aislados de levaduras, que finalmente serán preservados ex situ en colecciones biológicas, como la Colección de Levaduras Quito Católica, constituyendo repositorios de germoplasma y plataformas de aplicación biotecnológica (Carvajal, et al., 2011).

#### **1.4.5 Levaduras aplicadas a la biotecnología**

Históricamente la fermentación de bebidas y comida ha sido el pilar fundamental del uso biotecnológico de las levaduras, los registros más antiguos hacen referencia a la producción de bebidas fermentadas utilizadas en los rituales de la cultura mesopotámica hace seis mil años a.C. En el siglo XIX con el descubrimiento del metabolismo microbiano empezó una nueva era en la utilización de microorganismos en diferentes bioprocesos, y en el siglo XX con el desarrollo de la genómica, producción de proteínas recombinantes, ingeniería metabólica y la biología sintética; el campo de aplicación biotecnológica de las levaduras se ha ampliado enormemente (Mattanovich, et al., 2014; Buzzini, et al., 2012).

El uso tradicional de *Saccharomyces cerevisiae* se ha consolidado como una herramienta importante no solo a nivel industrial sino también como la base científica en el estudio de los sistemas biológicos y la genómica funcional (Botstein & Fink, 2011). Sin embargo, en la actualidad se han identificado alrededor de 1500 especies de levaduras, denominadas levaduras no convencionales (NCYs de sus siglas en inglés), consideradas como un potencial recurso genético y biotecnológico; estos microorganismos representan una alternativa en el uso de diferentes sustratos, formación de productos metabólicos y rutas de regulación enzimática con diversas aplicaciones (Buzzini, et al., 2012).

La biodiversidad genética, metabólica y enzimática de las levaduras puede aprovecharse en el campo de la industria, la medicina, la agricultura y la remediación ambiental. Actualmente la plataforma de aplicación biotecnológica de las levaduras se desarrolla en tres líneas de investigación: i) la producción de metabolitos como etanol para su uso como biocombustible, ácidos orgánicos, compuestos fenólicos como flavonoides, carotenoides, lípidos, polisacáridos extracelulares, policétidos e isoprenoides con aplicaciones farmacéuticas; ii) la producción de proteínas recombinantes como la insulina y el antígeno para hepatitis B; y iii) complejos catalíticos celulares para la producción de cefalosporinas y esteroides. También se utilizan las levaduras como probióticos y agentes terapéuticos, como control biológico de cultivos y como agentes de bioremediación de colorantes, aceites y compuestos aromáticos (Mattanovich, et al., 2014; Buzzini, et al., 2012; Hatoum, et al., 2012).

Los estudios de biodiversidad en diferentes ecosistemas ofrecen un variado potencial de aplicaciones biotecnológicas. El estudio de la biodiversidad de levaduras en zonas glaciares, como la Antártica, presenta diferentes aplicaciones en relación a las características de adaptación estructurales, metabólicas y genéticas de las levaduras aisladas de estos ambientes extremos. La bioprospección de biomoléculas, aisladas a partir de levaduras termo tolerantes, como enzimas,

pigmentos, ácidos grasos poli insaturados, entre otras, es importante en base a su capacidad única de adaptación y supervivencia a bajas temperaturas (Shivaji & Prasad, 2009).

Entre las principales aplicaciones biotecnológicas tenemos la producción de enzimas adaptadas a rangos bajos de temperatura como proteasas, lipasas y xilanasas. La alta actividad de las enzimas psicrófilas ofrece un beneficio económico directo aplicado a la industria, por ejemplo las lipasas (CAL-A y CAL-B) obtenidas a partir de la levadura *Pseudozyma antarctica*, tienen una aplicación directa en la preparación de aminas ópticamente activas, hidrólisis de ácidos y ésteres, síntesis de poli ésteres y de triglicéridos. También se ha reportado la producción de xilanasas, mananasas, glucosidasas y endoglucanasas aisladas a partir de *Cryptococcus adeliensis*, así como proteasas extracelulares examinadas en *Candida humicola*, serín-proteinasas en *Leucosporidium antarcticum*, entre otras(Shivaji & Prasad, 2009).

Otros estudios han reportado la aplicación biotecnológica de las levaduras en la producción de ácidos grasos insaturados, producción de compuestos foto protectores como carotenoides y micosporinas (Vaz, et al., 2010), y como biocontrol para enfermedades postcosecha (Vero, et al., 2012). Además, algunas especies del género *Rhodotorula* y *Cryptococcus* tienen la capacidad de degradar ciertos compuestos aromáticos e hidrocarburos, es decir que pueden ser utilizados como agentes en la biorremediación de aguas, otras levaduras en cambio, se han utilizado en la remoción de nitratos en aguas de con temperaturas de hasta 5°C, y además como modelos biológicos para estudiar la interrelación entre los radicales libres, antioxidantes y el daño celular por la radiación UV(Hughes & Bridge, 2010; Shivaji & Prasad, 2009; Libkind, et al., 2006).

## 2. CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 Toma de muestras y aislamiento de levaduras

El muestreo fue realizado por el Ph. D., Javier Carvajal en el verano austral del 2012, durante la 15<sup>ta</sup> expedición del Instituto Ecuatoriano Antártico, Base "Pedro Vicente Maldonado", que se encuentra en la Isla Greenwich, latitud  $62^{\circ} 27' 36''$  S y longitud  $59^{\circ} 44' 54''$  O. Las muestras fueron tomadas de un sistema glaciar formado por un glaciar, un río denominado Río Culebra, una laguna y las aguas costaneras donde desemboca la laguna; en ocho puntos diferentes. En cada punto se tomó tres muestras (Figura 1).

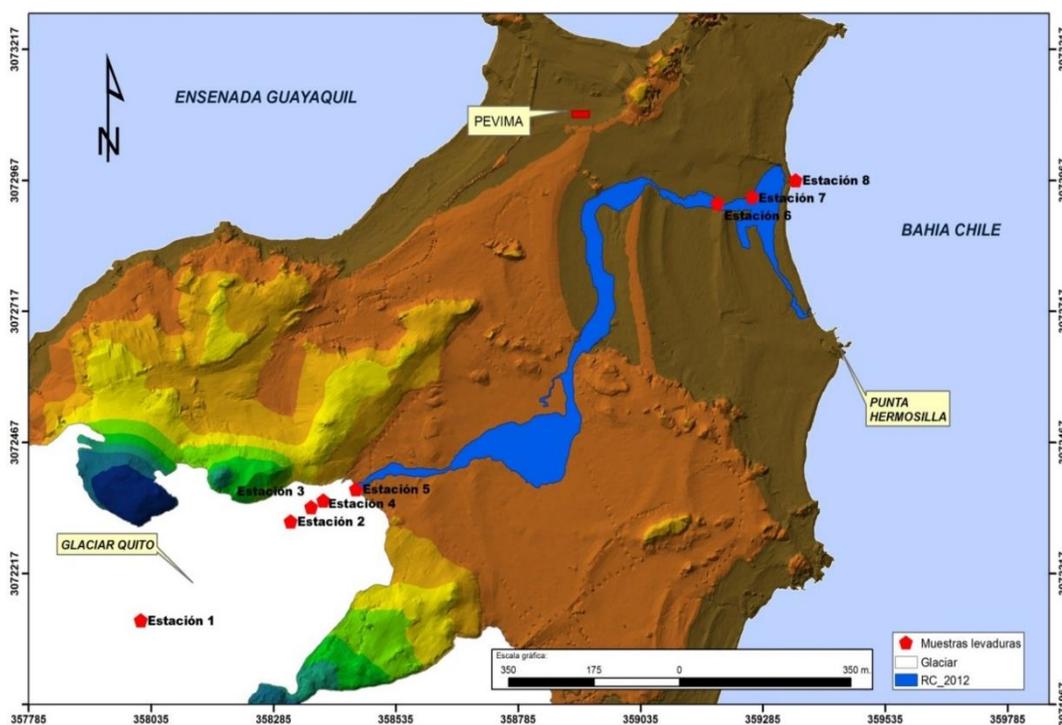
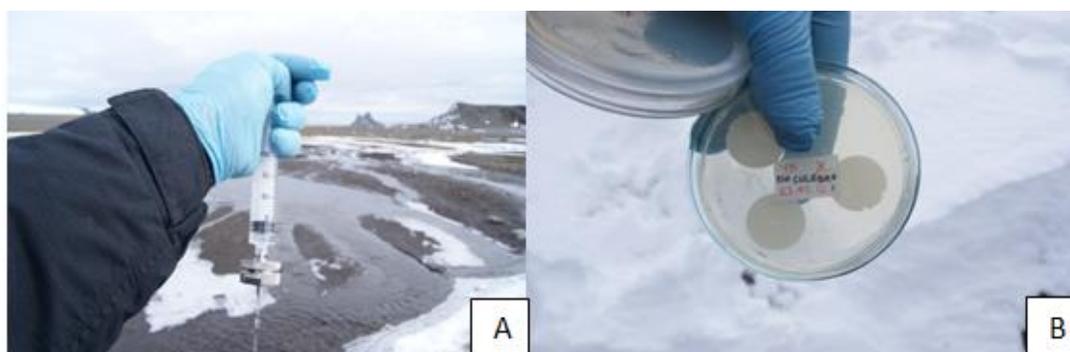


Figura 1. Puntos de muestreo: Estación 1, 2, 3 y 4 (sustrato glaciar). Estación 6, 7, 8 y 9 (sustrato líquido).

Fuente: (Carvajal, 2012).

Las muestras de agua se recogieron en botellas estériles y las muestras de hielo se colectaron del subsuelo a una profundidad de 30 cm, siguiendo condiciones de trabajo asépticas en los procesos. En el campo las muestras colectadas fueron filtradas con membranas Millipore de 0.45  $\mu\text{m}$  de diámetro, en cada punto de muestreo se cultivaron los filtros en placas de agar MMS (10 g/L de glucosa, 2 g/L de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 2 g/L de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.5 g/L  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.1 g/L de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  y 1 g/L de extracto de levadura) y YM (extracto de levadura 0,3%, extracto de malta 0,3%, peptona 0,5%, glucosa 1% y agar 2%), se transportaron al centro de investigación y se incubaron a 9°C y 20°C respectivamente (Figura 2). Las muestras se aislaron, se conservaron en medio YPD (20 g/L de glucosa, 20 g/L de peptona, 10 g/L de extracto de levadura y 15 g/L de agar) líquido con 15% de glicerol y se trasladaron manteniendo el sistema de frío a la Colección de Levaduras Quito-Católica de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Finalmente fueron repicadas, se verificó la pureza de los aislados en medio YM y posteriormente fueron conservadas nuevamente a -80°C en medio YPD líquido con 15% de glicerol. (Buzzini, et al., 2012; Cimerman, et al., 2003).



**Figura 2. A) Proceso de filtración de una muestra de agua colectada del Río Culebra en la Península Antártica. B) Siembra de los filtros muestreados en placas de agar YM.**

## 2.2 Descripción morfológica y pruebas fisiológicas

La caracterización morfológica incluyó la descripción macroscópica y microscópica de las colonias aisladas. La caracterización y fotografía microscópica fue realizada después de tres días de incubación a 25°C, utilizando un microscopio Olympus BX51 de contraste de fase con una cámara digital adaptada, con un lente de magnificación 100X; se determinó el diámetro, la forma y el tipo de reproducción asexual (según el sitio de gemación) de las levaduras. La caracterización macroscópica incluyó un registro fotográfico de la morfología de la colonia después de ocho días de incubación a 25°C, utilizando una cámara Sony alfa 230, y el registro del tipo de margen, elevación, superficie, textura, color y brillo de las colonias aisladas (Figura 3).

<b>MARGEN</b>					
	ENTERA	ONDULADA	LOBADA	RIZOIDE	
<b>ELEVACIÓN</b>					
	PLANA	CÓNCAVA	CONVEXA	UMBILICADA	
<b>SUPERFICIE</b>	LISA	RUGOSA	PLEGADA	RÍGIDA	FILAMENTOSA
<b>BRILLO</b>	BRILLANTE	OPACA			
<b>TEXTURA</b>	MUCOSA	BUTIROSA	FRIABLE		
<b>COLOR</b>	AMARILLA	BLANCA	CREMA	ROSADA	ROJA

**Figura 3. Características morfológicas de las colonias de levaduras aisladas en placas de agar.**

**Fuente: (Portero & Paredes, 2011).**

En la caracterización fisiológica se realizaron pruebas de asimilación y fermentación de nueve azúcares (glucosa, xilosa, maltosa, galactosa, lactosa, sacarosa, rafinosa, celobiosa y almidón soluble) en una solución al 2% de cada uno, a excepción de la rafinosa que estuvo presente en una solución al 4%, y 0,67% de

YNB como fuente de nitrógeno. Cada solución fue filtrada con una membrana Millipore de 0,22  $\mu\text{m}$  y se colocó 5 mL en un tubo de ensayo con campana de Durham invertida (Vincent, et al., 2011).

Los aislados de levaduras fueron sembrados en YM agar e incubados a 25°C por tres días, se cogió una colonia representativa y se disolvió en 1 mL de agua destilada estéril, se inoculó 50  $\mu\text{L}$  de la solución en cada sustrato analizado (prueba por duplicado en cada solución de azúcar), se incubó a 25°C y finalmente se evaluó la asimilación y fermentación a los 3, 7, 14 y 21 días después de la incubación (Cuadro 1 y Cuadro 2).

Los resultados registrados de asimilación de azúcares se basaron en la turbidez de la solución, como un indicador del crecimiento de las levaduras; esta prueba se fundamentó en describir la asimilación con: +++, ++, + o -, según la turbidez de cada tubo con respecto al control. Los resultados de fermentación de azúcares se establecieron conforme a la generación de  $\text{CO}_2$  en la campana de Durham; esta prueba se basó en la descripción de la fermentación con: +++ si la campana estaba completamente llena, ++ si estaba llena hasta la mitad, + si estaba llena 1/3 de la campana o - si no se generó gas (Vincent, et al., 2011). Todos los resultados se registran en una tabla y se comparan con los perfiles de asimilación y fermentación abajo descritos, los posibles resultados son: positivo fuerte, positivo retardado, positivo lento, positivo débil y negativos.

**Cuadro 1. Parámetros de evaluación de los resultados para las pruebas de asimilación de carbohidratos.**

<b>Simbología</b>	<b>Resultado</b>	<b>Descripción</b>
<b>+</b>	Positivo	Lectura: +++ o ++ en una semana.
<b>L</b>	Positivo retardado (latente)	Lectura: +++ o ++ rápida en dos semanas.
<b>S</b>	Positivo lento	Lectura: +++ o ++ durante la tercera semana.
<b>W</b>	Positivo débil	Lectura: +.
<b>-</b>	Negativo	

**Cuadro 2. Parámetros de evaluación de los resultados para las pruebas de fermentación de carbohidratos.**

<b>Simbología</b>	<b>Resultado</b>	<b>Descripción</b>
<b>+</b>	Positivo fuerte	Lectura: campana Durham se llena en una semana.
<b>L</b>	Positivo retardado (latente)	Lectura: campana Durham se llena rápidamente después de una semana.
<b>S</b>	Positivo lento	Lectura: campana Durham se llena lentamente después de dos semanas.
<b>W</b>	Positivo débil	Lectura: campana Durham no se llena completamente.
<b>-</b>	Negativo	

### 2.3 Identificación de levaduras por técnicas moleculares

#### 2.3.1 Extracción de ADN genómico

En micro tubos de 1,5 mL con 0,4 g de microesferas de vidrio (425-600  $\mu\text{m}$  de diámetro) se añadió 500  $\mu\text{L}$  de buffer de lisis (Tris 50 mM, NaCl 250 mM, EDTA 50 mM a un pH=8, SDS 0.3%) y se autoclavaron los tubos. Utilizando puntas estériles se agregó suficiente cantidad de biomasa, de cada aislado de levadura, en cada tubo con buffer de lisis, los tubos se agitaron 3 min en un vortex y se incubaron 1 h a 65°C, utilizando una incubadora Thermo Scientific 1-690. Posteriormente los tubos se agitaron nuevamente 3 min en el vortex y se colocaron en la centrífuga (Sorvall® RMC 14) durante 30 min a 8500 rpm. Finalmente el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo, se realizó la medición de la concentración y pureza de ADN por espectrofotometría a 260/280 nm utilizando el equipo Nanodrop y se conservó el ADN a -20°C (Olson & Morrow, 2012; Libkind, et al., 2003).

#### 2.3.2 PCR-ITS

Para la amplificación de la región ITS mediante PCR, se utilizaron los primers sintéticos ITS1 (5' -TCC GTA GGT GAA CCT GCG G- 3') e ITS4 (5' -TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC- 3'). La reacción de PCR se realizó en un volumen final de 50  $\mu\text{L}$  que incluyó: 24,6  $\mu\text{L}$  de H<sub>2</sub>O destilada y autoclavada, 10uL de Buffer

GoTaq® 5X, 3 µL de MgCl<sub>2</sub> 25mM, 4 µL Mix dNTPs 10 mM, 3 µL de primer ITS1 5 µM, 3 µL de primer ITS4 5 µM, 4 µL de GoTaq® polimerasa 5 U/ µL y 5 µL del ADN extraído y diluido (Zarzoso, et al., 1999).

El ADN fue amplificado en un termociclador TC-412 (Techne), programado de la siguiente forma: una desnaturalización inicial de 5 min a 94°C, seguido por 40 ciclos de 1 min de desnaturalización a 93°C; 2 min de annealing a 55°C; 2 min de extensión a 72°C, y una extensión final de 10 min a 72°C (Zarzoso, et al., 1999).

El producto de PCR se evidenció mediante electroforesis en geles de agarosa al 0,8%, corridos a 100V durante 30 min y en cada pocillo del gel se dispensó 4 µL del producto de PCR.

### **2.3.3 RFLP-ITS**

En esta técnica se empleó tres endonucleasas de restricción: HhaI (secuencia de reconocimiento 5´ CGC CC), HaeIII (secuencia de reconocimiento 5´ GG CC) y HinfI (secuencia de reconocimiento 5´ GANT C).

La reacción de digestión fue realizada a un volumen final de 15 µL que incluyó: 5 µL del Mix para RFLP-PCR (2 µL de buffer de reacción REact 2 10X, 2.2 µL de H<sub>2</sub>O destilada y autoclavada y 0,8 µL de enzima de restricción 10 U/µL) y 10 µL del producto de PCR-ITS (Zarzoso, et al., 1999).

El mix de RFLP-ITS se incubó a 37°C durante 12 h, utilizando una incubadora Thermo Scientific 1-690, y el producto se evidenció mediante electroforesis en geles de agarosa al 0,8%, corridos a 85V durante 2 h. Se incluyó en cada gel un marcador de peso molecular de 100bp, el producto de PCR-ITS, el producto de digestión con HhaI, el producto de digestión con HaeIII y el producto de digestión con HinfI, para cada aislado de levadura, con el fin de identificar el patrón molecular de cada especie y compararlo con diferentes publicaciones y reportes científicos.

#### **2.3.4 PCR del dominio D1/D2 del segmento 26S ADNr**

Para la amplificación del dominio D1/D2 del segmento 26S se emplearon los primers sintéticos NL1 (5' –GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAC - 3') y NL4 (5' –GGTCCGTGTTTCAAGACGG - 3'). La reacción de PCR se realizó en un volumen final de 50 µL que incluyó: 31,6 µL de H<sub>2</sub>O destilada y autoclavada, 10 µL de Buffer GoTaq® 5X, 1 µL Mix dNTPs 10 mM, 1 µL de primer ITS1 5 µM, 1 µL de primer ITS4 5 µM, 0,4 µL de GoTaq® polimerasa 5 U/µL y 5 µL del ADN extraído y diluido (Libkind, et al., 2003).

El ADN fue amplificado en un termociclador TC-412 (Techne), programado de la siguiente forma: una desnaturalización inicial de 10 min a 95°C, seguido por 30 ciclos de 30 seg de desnaturalización a 94°C; 45 seg de annealing a 60°C; 45 seg de extensión a 72°C, y una extensión final de 10 min a 72°C (Libkind, et al., 2003).

El producto de PCR se evidenció mediante electroforesis en geles de agarosa al 0,8%, corridos a 100V durante 30 min y en cada pocillo del gel se dispensó 4 µL del producto de PCR.

#### **2.3.5 Sistema de purificación (Gen Clean)**

El producto de PCR-26S se purificó mediante el sistema SV Gel and PCR Clean-up Wizard, siguiendo el siguiente método: se añadió igual volumen de Membrane Binding Solution a la reacción de PCR, se insertó la minicolumna de SV en el tubo de colección, se transfirió la mezcla preparada a la minicolumna ensamblada, se incubó a temperatura ambiente por 1 min, se centrifugó a 11500 rpm por 1 min, se eliminó el líquido del tubo colector y se re ensambló la columna.

En cada columna se agregó 700 µL de Membrane Wash Solution, se centrifugó a 11500 rpm por 1 min, se eliminó el líquido del tubo colector y se re ensambló la columna. Se repitió este paso utilizando 500 µL de Membrane Wash Solution. Se eliminó el líquido del tubo colector, se centrifugó la columna ensamblada por 1 min con la tapa de la microcentrífuga abierta.

Cuidadosamente se transfirió la minicolumna a un tubo limpio de 1,5 mL y se añadió a la misma 25  $\mu$ L de agua libre de nucleasas, se incubó a temperatura ambiente y se centrifugó a 11500 rpm por 1 min. Este proceso se repitió hasta obtener 50  $\mu$ L de solución de ADN, se realizó la medición de la concentración y pureza de ADN por espectrofotometría a 260/280 nm, utilizando el equipo Nanodrop, y se conservó el ADN a  $-20^{\circ}\text{C}$  (Olson & Morrow, 2012).

### **2.3.6 Envío de muestras a secuenciar y análisis bioinformático**

La secuenciación del producto de PCR purificado de las muestras, que tenía una concentración de ADN entre 15 y 50 ng/ $\mu$ L y una pureza de 1.7 a 2.1 por espectrofotometría a 260/280 nm, se realizó a través de la empresa MACROGEN en Korea. Las secuencias de los aislados en formato .ab1forward y reverse fueron alineadas usando el programa Geneious Trial 8.1.2 para obtener una secuencia consenso con un porcentaje de identidad del 70% en adelante. Las secuencias consenso obtenidas se compararon con aquellas incluidas en la base de datos GenBank usando la herramienta BLAST (BASIC LOCAL ALIGNMENT SEARCH TOOL), el software Blastn y el programa Megablast.; la identificación de las especies de los aislados de levaduras correspondió a un mínimo de 99% de identidad, el mejor valor del parámetro de puntuación total y máxima, y una alineación significativa estadísticamente basada en el parámetro E (e-value de 0,0).

Utilizando el programa Geneious Trial 8.1.2 se alinearon y ubicaron las secuencias uniformemente, se creó un documento que contenía toda la información de los alineamientos y se agregó una secuencia de referencia y otra de la especie tipo para cada especie de levadura identificada, según lo reportado por otros estudios. Todas estas secuencias se alinearon nuevamente utilizando el programa Mega 6.06 y se guardó la información en formato fasta. Posteriormente se eliminó los fragmentos de alineamiento ambiguo utilizando el programa GBlocks 0.91b. Las secuencias

obtenidas se registraron en un block de notas y este archivo se abrió con el programa Mega 6.06 y se guardó en formato mega para su posterior uso.

En el programa Mega 6.06, en base al archivo generado, se construyó un árbol filogenético de los aislados identificados y de referencia, en base a una prueba de máxima verosimilitud, con un bootstrap de 1000, utilizando el modelo de Kimura de dos parámetros y teniendo en cuenta una probabilidad de agrupamiento verdadero mayor de 50% como válida para el modelo.

#### **2.4 Análisis ecológico y distribución de las levaduras**

Los aislados fueron categorizados según el sustrato del cual se tomó la muestra (sustrato glaciar o líquido). La diversidad de especies aisladas de sustratos glaciares y líquidos fue evaluada en términos de riqueza y dominancia, en base a dos índices de diversidad, el índice de Shannon  $H = -\sum_{i=1}^S p_i \ln(p_i)$  y el índice de Simpson  $D = 1 - \sum_{i=1}^S p_i^2$ , donde  $p_i$  es la proporción de individuos de cada especie de la comunidad. La diversidad de las especies de levaduras aisladas se evaluó en base al índice de Shannon y de Simpson con un 95% de confianza con un bootstrap calculado en base a 10000 iteraciones. El análisis de los resultados se realizó con el software PAST 3.05, en la ventana principal se ubicaron en columna los individuos de cada taxón identificado, posteriormente se seleccionó la pestaña Índices de diversidad y el software determinó en una tabla los valores de los índices y finalmente se realizó el análisis con los valores de referencia y estudios parecidos.

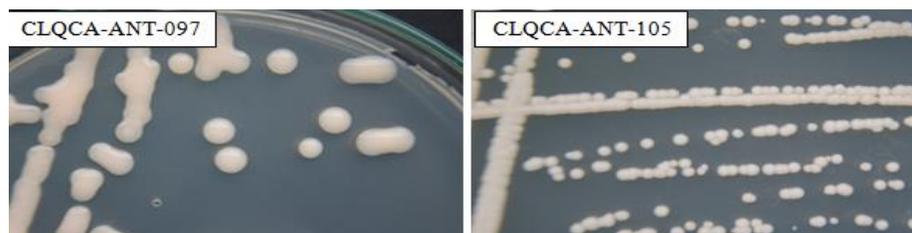
### 3. CAPÍTULO 3: RESULTADOS

A partir de los 101 aislados conservados en de la Colección de Levaduras Quito-Católica (código de referencia CLQCA-ANT), colectados de un sistema glaciar en la isla Greenwich en la Península Antártica durante el verano austral del 2012, mediante el uso de pruebas morfológicas, fisiológicas y moleculares, las levaduras se caracterizaron, clasificaron dentro de siete géneros y se identificaron nueve especies: *Rhodotorula* sp., *Rhodotorula laryngis*, *Leucosporidium scottii*, *Guehomyces pullulans*, *Cryptococcus victoriae*, *Candida sake*, *Cystofilobasidium infirmominiatum*, *Debaryomyces hansenii* y *Candida zeylanoides*.

#### 3.1 Caracterización macroscópica y microscópica

En términos generales los 101 aislados de levaduras presentaron una pequeña variabilidad en las características morfológicas de las colonias después de ocho días de incubación a 25°C. La mayoría de los aislados mostraron un borde entero, elevación convexa, superficie lisa, textura mucoide y brillante; la característica más variable fue el color ya que aproximadamente un 29% de los aislados presentaron un color rosado/rojo mientras el resto exhibieron una coloración blanca-beige (Anexo 1).

Las características morfológicas de los 101 aislados fueron correspondientes con la especie identificada a la cual pertenecen, es decir que todos los aislados de una especie presentaron el mismo perfil morfológico de la colonia, a excepción de *Cryptococcus victoriae* que mostró dos perfiles característicos con respecto a la descripción macroscópica de los aislados CLQCA-ANT-097 comparado a los aislados CLQCA-ANT-105 y CLQCA-ANT-041 en relación a la textura, color y brillo de las colonias (Figura 4 y Cuadro 3).



**Figura 4. Resultado de las diferencias en la características macroscópicas de los aislados CLQCA-ANT-097 y CLQCA-ANT-105, correspondientes a *Cryptococcus victoriae*.**

**Cuadro 3. Características morfológicas de las 101 colonias de las levaduras identificadas, evaluadas después de siete días de incubación a 25°C.**

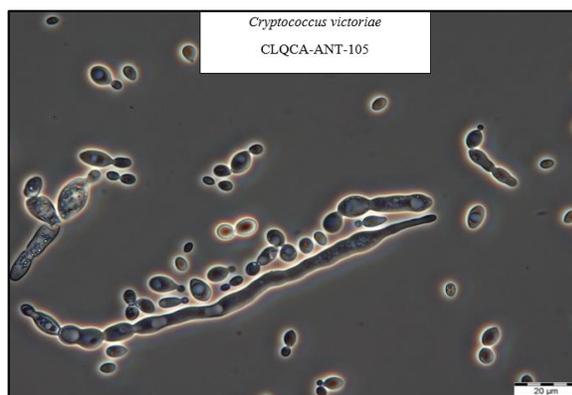
Número de aislados	Especie	Margen	Elevación	Superficie	Textura	Color	Brillo
5	<i>Candida sake</i>	Entera	Convexa	Lisa	Butirosa	Blanca	Opaca
1	<i>Candida zeylanoides</i>	Entera	Convexa	Lisa	Butirosa	Blanca	Opaca
1	<i>Cryptococcus victoriae</i> CLQCA-ANT-097	Entera	Convexa	Lisa	Mucoide	Blanca/rosa	Brillante
2	<i>Cryptococcus victoriae</i> CLQCA-ANT-105 y 041	Entera	Convexa	Lisa	Butirosa	Beige	Opaca
1	<i>Cystofilobasidium infirmominiatum</i>	Entera	Convexa	Lisa	Mucoide	Rosada/roja	Brillante
6	<i>Debaryomyces hansenii</i>	Entera	Convexa	Lisa	Butirosa	Blanca	Opaca
2	<i>Guehomyces pullulans</i>	Rizoide	Umbilicada	Filamentosa	Butirosa	Beige	Opaca
56	<i>Leucosporidium scottii</i>	Entera	Convexa	Lisa	Mucoide	Blanca	Brillante
5	<i>Rhodotorula laryngis</i>	Entera	Convexa	Lisa	Mucoide	Rosada/roja	Brillante
22	<i>Rhodotorula</i> sp.	Entera	Convexa	Lisa	Mucoide	Rosada/roja	Brillante

Las características microscópicas de los aislados de levaduras fueron variables a nivel intra e inter específicos, incluyeron estructuras globosas, subglobosas, elipsoidales, ovoides y en pocos casos elongadas, con un rango de longitud de 4 a 16  $\mu\text{m}$  y un ancho de 4 a 10  $\mu\text{m}$  aproximadamente; donde *Guehomyces pullulans* representó la especie de levadura de mayor tamaño. También existió variabilidad en las características microscópicas de los 101 aislados, referente a la forma de reproducción asexual según el sitio de gemación, e incluyó tipos monoplares,

bipolares y multipolares de base estrecha y ancha (Cuadro 4 y Anexo 2). Sólo el aislado CLQCA-ANT-105, correspondiente a *Cryptococcus victoriae*, se diferencia por presentar una gemación acropetal, es decir la formación sucesiva de células hijas en hilera a partir de una célula madre en el vértice (Figura 5).

**Cuadro 4. Características microscópicas de las 13 colonias representativas de las levaduras identificadas, evaluadas después de tres días de incubación a 25°C.**

Código	Especie Número de especies	Ancho	Longitud	Forma	Tipo de gemación (sitio)
CLQCA- ANT-048	<i>Candida sake</i> (5)	6-7 µm	6-7 µm	Globosa	Multipolar de base estrecha
		6-7 µm	11-15 µm	Elongadas	Multipolar de base estrecha
CLQCA- ANT-072	<i>Candida zeylanoides</i> (1)	5-6µm	6-7µm	Subglobosa	Monopolar de base estrecha
CLQCA- ANT-105	<i>Cryptococcus victoriae</i> (3)	4-10 µm	7-14 µm	Ovoide	Bipolar de base estrecha y ancha
CLQCA- ANT-007	<i>Cystofilobasidium infirmominatum</i> (1)	4-5 µm	9-10 µm	Elipsoidal	Monopolar de base estrecha
CLQCA- ANT-082	<i>Debaryomyces hansenii</i> (6)	4-9 µm	4-9 µm	Globosa	Multipolar de base estrecha
CLQCA- ANT-073	<i>Guehomyces pullulans</i> (2)	4-7 µm	9-16 µm	Elipsoidal/Ovoide	Monopolar de base estrecha y ancha
CLQCA- ANT-003	<i>Leucosporidium scottii</i> (30)	4-5 µm	5-6 µm	Subglobosa	Monopolar de base estrecha
CLQCA- ANT-017	<i>Leucosporidium scottii</i> (26)	4-8 µm	4-8 µm	Globosa	Multipolar de base estrecha
CLQCA- ANT-077	<i>Rhodotorula laryngis</i> (3)	5-6 µm	6-7 µm	Subglobosa	Monopolar de base estrecha
CLQCA- ANT-099	<i>Rhodotorula laryngis</i> (2)	6-7 µm	9-11 µm	Ovoide	Monopolar de base estrecha
CLQCA- ANT-057	<i>Rhodotorula</i> sp. (10)	5-6 µm	7-8 µm	Subglobosa	Monopolar de base estrecha
CLQCA- ANT-059	<i>Rhodotorula</i> sp. (5)	5-6 µm	10-13 µm	Ovoide	Monopolar de base estrecha
CLQCA- ANT-119	<i>Rhodotorula</i> sp. (7)	4-5 µm	8-9 µm	Ovoide	Monopolar/Bipolar de base estrecha



**Figura 5. Caracterización microscópica de la reproducción asexual por gemación acropetal del aislado CLQCA-ANT-105, correspondiente a *Cryptococcus victoriae*. Se utilizó un microscopio de contraste de fase, con una cámara adaptada y magnificación con un lente 100X.**

### **3.2 Caracterización fisiológica**

En las pruebas de asimilación de azúcares, de los 101 aislados de levaduras caracterizados, existió variabilidad en los resultados a nivel intra e inter específico. (Cuadro5).

Todos los aislados de levaduras caracterizados pudieron asimilar glucosa y sacarosa, a excepción de CLQCA-ANT-025, CLQCA-ANT-053 y CLQCA-ANT-081 que presentaron asimilación negativa para glucosa y CLQCA-ANT-065 que presentó asimilación negativa para sacarosa, además sólo *Candida sake* y *Debaryomyces hansenii* mostraron asimilación positiva para estos azúcares (10% del total de aislados); mientras el 88% del total de los aislados tuvieron una asimilación débil o lenta de glucosa y sacarosa. Estos resultados evidenciaron que la mayoría de las levaduras caracterizadas presentan un metabolismo lento en su crecimiento celular.

Únicamente *Cryptococcus victoriae* (CLQCA-ANT-105) y *Debaryomyces hansenii* (CLQCA-ANT-061) exhibieron asimilación lenta y débil para lactosa respectivamente, siendo ésta azúcar la menos asimilable. También existió

variabilidad en las pruebas de asimilación de los aislados CLQCA-ANT-097 comparado a los aislados CLQCA-ANT-105 y CLQCA-ANT-041, ambos correspondientes a *Cryptococcus victoriae*.

**Cuadro 5. Perfiles de asimilación de azúcares de los 101 aislados de levaduras identificados. Los resultados fueron evaluados después de 21 días de incubación a 25°C.**

<b>Especie/número de aislados</b>	<b>GLU</b>	<b>XIL</b>	<b>MAL</b>	<b>GAL</b>	<b>LAC</b>	<b>SAC</b>	<b>RAF</b>	<b>CEL</b>	<b>ALM</b>
<i>Candida sake</i> (5)	+	+/L/W	+	L/W/-	-	+/L	+/W/-	S/W/-	+/L/-
<i>Candida zeylanoides</i> (1)	W	-	W	-	-	W	-	W	W
<i>Cryptococcus victoriae</i> (3)	W/S	W/-	S/-	S/W	S/-	W	-	W/-	W
<i>Cystofilobasidium infirmominiatum</i> (1)	W	-	-	-	-	W	-	-	-
<i>Debaryomyces hansenii</i> (6)	+	+/L/W	+	+	W/-	+/S	+/L	+/L/S	+/L
<i>Guehomyces pullulans</i> (2)	S/W	-	W	W/-	-	W	S/W	S/-	W/-
<i>Leucosporidium scottii</i> (56)	S/W	-	W/-	-	-	L/S/W	W/-	L/W/S/-	S/W/-
<i>Rhodotorula laryngis</i> (5)	S/W/-	-	-	-	-	S/W	-	-	-
<i>Rhodotorula sp.</i> (22)	S/W/-	-	-	-	-	S/W	-	-	L/W/-

**Nota:**+, asimilación positiva; L, asimilación retardada; S, asimilación lenta; W, asimilación débil; -, asimilación negativa. GLU, Glucosa; XIL, Xilosa; MAL, Maltosa; GAL, Galactosa; LAC, Lactosa; SAR, Sacarosa; RAF, Rafinosa; CEL, Celobiosa; ALM, Almidón soluble.

En las pruebas de fermentación de azúcares, de los 101 aislados de levaduras caracterizados, existió homogeneidad intra e inter específica, a excepción de *Candida sake* que mostró la capacidad de fermentar glucosa, maltosa, sacarosa y rafinosa (Cuadro 6).

Además los aislados de levadura identificados como *Candida sake* presentaron un perfil de asimilación y fermentación positivo para varios azúcares, con crecimiento celular óptimo y producción de CO<sub>2</sub> en la campana de Durham dentro de los primeros tres días de incubación a 25°C, siendo la especie metabólicamente más activa. En cambio, los aislados de levaduras identificados como *Rhodotorula laryngis* mostraron un perfil de asimilación y fermentación negativo o débil para la mayoría de azúcares, siendo la especie metabólicamente menos activa.

**Cuadro 6. Perfiles de fermentación de azúcares de los 101 aislados de levaduras identificados. Los resultados fueron evaluados después de 21 días de incubación a 25°C.**

<i>Especie/número de aislados</i>	<i>GLU</i>	<i>XIL</i>	<i>MAL</i>	<i>GAL</i>	<i>LAC</i>	<i>SAC</i>	<i>RAF</i>	<i>CEL</i>	<i>ALM</i>
<i>Candida sake</i> (5)	+/L	-	+/L/S/	-	-	+/W	+/-	-	-
<i>Candida zeylanoides</i> (1)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Cryptococcus victoriae</i> (3)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Cystofilobasidium infirmominiatum</i> (1)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Debaryomyces hansenii</i> (6)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Guehomyces pullulans</i> (2)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Leucosporidium scottii</i> (56)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Rhodotorula laryngis</i> (5)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Rhodotorula sp.</i> (22)									

**Nota:**+, fermentación positiva; L, fermentación retardada; S, fermentación lenta; W, fermentación débil; -, fermentación negativa. GLU, Glucosa; XIL, Xilosa; MAL, Maltosa; GAL, Galactosa; LAC, Lactosa; SAR, Sacarosa; RAF, Rafinosa; CEL, Celobiosa; ALM, Almidón soluble.

### 3.3 Caracterización molecular

La caracterización molecular de los 101 aislados de levaduras, mediante la técnica PCR-RFLPs del ITS, determinó nueve patrones de restricción diferentes utilizando las endonucleasas de restricción HaeIII, HhaI y HinfI (Cuadro 6 y Anexo 3). Estos resultados fueron coherentes con respecto al análisis en Blastn de los productos de PCR del dominio D1/D2 del segmento 26S del RNA ribosómico, que determinó que los 101 aislados están clasificados dentro de siete géneros correspondientes a nueve especies: *Rhodotorula* sp., *Rhodotorula laryngis*, *Leucosporidium scottii*, *Guehomyces pullulans*, *Cryptococcus victoriae*, *Candida sake*, *Cystofilobasidium infirmominiatum*, *Debaryomyces hansenii* y *Candida zeylanoides* (Cuadro 7 y Anexo 4). Además el análisis de las secuencias determinó que *Rhodotorula* sp. representa una especie aún no descrita y su secuencia está depositada en el GenBank con el número de acceso HE994140.1.

**Cuadro 7. Tamaño en bp (Pares de bases) de los productos de PCR y los fragmentos de restricción del 5.8S-ITS de los 9 aislados representativos de las levaduras identificadas.**

Código CLQCA	Especie / Número de especies	ITS	Hha I	Hae III	Hinf I
ANT-048	<i>Candida sake</i> (5)	480	240+240	480	240+240
ANT-072	<i>Candida zeylanoides</i> (1)	640	300+300	440+200	320+320
ANT-105	<i>Cryptococcus victoriae</i> (3)	550	270+280	410+140	280+270
ANT-007	<i>Cystofilobasidium infirmominiatum</i> (1)	610	250+250+110	520+90	290+240+80
ANT-067	<i>Debaryomyces hansenii</i> (6)	630	300+300	410+120+90	320+300
ANT-043	<i>Guehomyces pullulans</i> (2)	610	300+210+100	510+100	330+280
ANT-003	<i>Leucosporidium scottii</i> (56)	580	330+250	490+100	290+200+90
ANT-099	<i>Rhodotorula laryngis</i> (5)	590	510+80	590	310+280
ANT-002	<i>Rhodotorula</i> sp. (22)	590	510+80	590	350+240

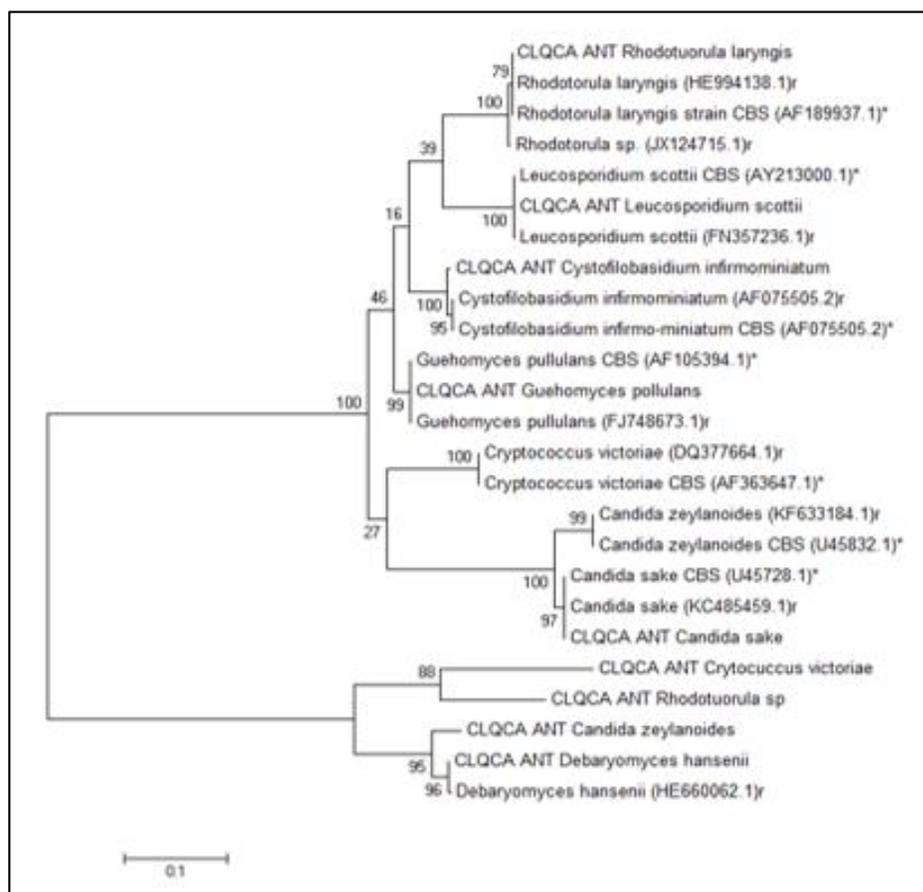
El producto de amplificación de PCR de la región 5.8S-ITS mostró una variación entre 480bp para *Candida sake* y 640bp para *Candida zeylanoides*, con pequeñas diferencias según la especie a excepción de *Rhodotorula laryngis* y *Rhodotorula* sp., que presentaron 590 bp aproximadamente. Además el análisis del polimorfismo de la longitud de fragmentos de restricción de la región 5.8S-ITS determinó nueve patrones de restricción representativos de cada especie, que permitió clasificar correctamente a los aislados que presentaban un 99% de identidad con respecto a las secuencias de dominio D1/D2 del segmento 26S del RNA ribosómico tanto con *Rhodotorula laryngis* como con *Rhodotorula* sp.

**Cuadro 8. Resumen del análisis en BLAST de los productos de PCR, del dominio D1/D2 del segmento 26S del RNA ribosómico, de los 9 aislados representativos de las levaduras identificadas.**

Código CLQCA	Especie / Número de especies	AC GenBank	% identidad	Especie próxima/AC GenBank	% identidad
ANT-066	<i>Candida sake</i> (5)	KC485459.1	100	<i>Candida sake</i> FJ515221.1	99
ANT-072	<i>Candida zeylanoides</i> (1)	KF633184.1	100	<i>Candida zeylanoides</i> JX441613.1	199
ANT-105	<i>Cryptococcus victoriae</i> (3)	JX188144.1	100	<i>Cryptococcus victoriae</i> AM160647.1	99
ANT-007	<i>Cystofilobasidium infirmominiatum</i> (1)	JX188154.1	99	<i>Cystofilobasidium infirmominiatum</i> DQ645523.1	99
ANT-069	<i>Debaryomyces hansenii</i> (6)	JX124720.1	100	<i>Debaryomyces hansenii</i> FR686593.2	100
ANT-043	<i>Guehomyces pullulans</i> (2)	FJ748673.1	100	<i>Guehomyces pullulans</i> EU637078.1	100
ANT-003	<i>Leucosporidium scottii</i> (56)	JX296532.1	100	<i>Leucosporidium scottii</i> FN357236.1	100
ANT-099	<i>Rhodotorula laryngis</i> (5)	HE994138.1	99	<i>Rhodotorula laryngis</i> EU194448.1	99
ANT-047	<i>Rhodotorula</i> sp. (22)	HE994140.1	100	<i>Rhodotorula</i> sp. JX124715.1	99

**Nota:** AC, Código de acceso

La evaluación de los productos de PCR del dominio D1/D2 del segmento 26S del RNA ribosómico de los 101 aislados de levaduras mediante el programa Blastn, comparadas con la base de datos de nucleótidos del NCBI, determinó nueve especies diferentes con una significación estadística del alineamiento (valor-e de 0.0), con la puntuación más alta de cobertura y un porcentaje de identidad del 99% y 100%, independiente de la especie analizada.



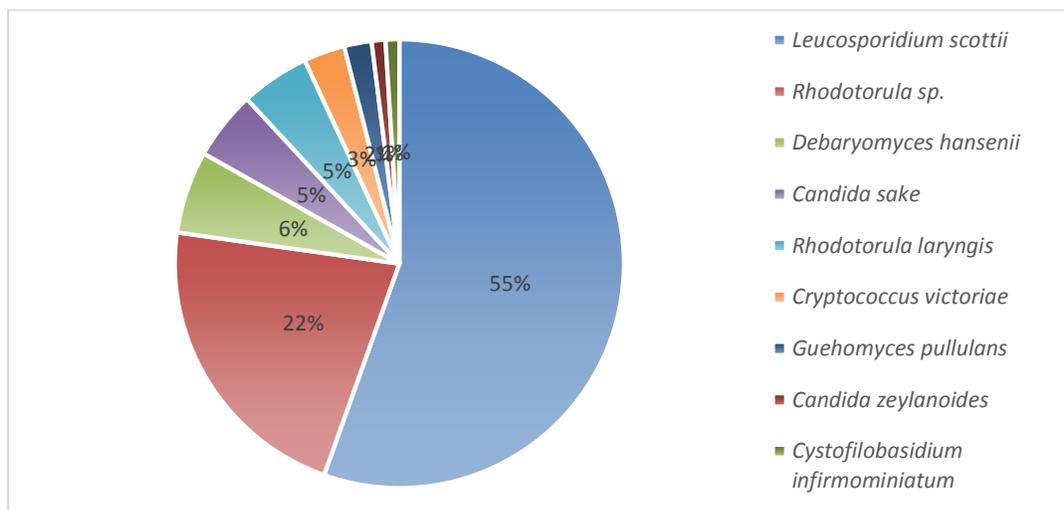
**Figura 6.** Árbol filogenético basado en el análisis de las secuencias del dominio D1/D2 del segmento 26S del RNA ribosómico de los 101 aislados de levaduras identificados. La nomenclatura del árbol determinada como CLQCA ANT corresponden a los aislados de levaduras identificadas previamente en Blastn, r representa a las secuencias de referencia reportada por otros autores y \* representa a la especie tipo. Los valores de bootstrap corresponden a 1000. Se utilizó el modelo de Kimura de dos parámetros, teniendo en cuenta una probabilidad de agrupamiento verdadero mayor de 50% como válida para el modelo, utilizando el programa Mega. Los números de acceso del NCBI están en paréntesis.

Las relaciones filogenéticas del dominio D1/D2 del segmento 26S del RNA ribosómico de los aislados de levaduras con respecto a las secuencias de referencia y de especie tipo, permitió establecer que la mayoría de especies identificadas se ubican dentro de su grupo correspondiente, a excepción de *Rhodotorula* sp., *Cryptococcus victoriae* y *Candida zeylanoides* que aparecen en ramas separadas del árbol. Todas las secuencias de referencia y especie tipo se ubican dentro de un mismo taxa y se consideraron aceptables las probabilidades de relación mayores al 50% (Figura 6).

### 3.4 Diversidad de levaduras

De los 101 aislados de levaduras identificados, aproximadamente el 89% de las especies correspondieron a Phylum Basidiomycetes, que incluyeron las clases Myrobotryomycetes, Tremellomycetes y Cystobasidiomycetes y estuvieron representados por *Rhodotorula* sp., *Cystofilobasidium infirmominiatum*, *Rhodotorula laryngis*, *Leucosporidium scottii*, *Guehomyces pullulans* y *Cryptococcus victoriae*; mientras el 11% correspondieron a especies del Phylum Ascomycetes, que incluyó la clase Saccharomycetes y estuvieron representados por *Candida sake*, *Debaryomyces hansenii* y *Candida zeylanoides*. Además existió diferencia en la frecuencia y especies de levaduras aisladas del sistema glaciar muestreado, formado por un glaciar, un río denominado Río Culebra, una laguna y las aguas costaneras donde desemboca la laguna (Figura 7).

Las especies de levaduras identificadas que se encontraron en una mayor proporción en el área de colecta fueron *Rhodotorula* sp., y *Leucosporidium scottii* con un 22.77% y 54.45% respectivamente del total de la población. Además el 45.5% de los aislados procedieron de un sustrato sólido (fragmentos de glaciar) y el 54.5% de un sustrato líquido (agua de la laguna, de la costa y del Río Culebra) con cierta variabilidad en las especies representativas aisladas de cada sustrato (Cuadro 9).



**Figura 7. Diversidad de los 101 aislados de levaduras colectados de un sistema glaciar en la isla Greenwich en la Península Antártica, durante el verano austral del año 2012.**

**Cuadro 9. Distribución de los aislados de levaduras colectados de un sistema glaciar en la isla Greenwich en la Península Antártica, durante el verano austral del año 2012.**

Especie	Sustrato glaciar (hielo)			Sustrato líquido				% del total de aislados
	Glaciar	Total de aislados	% del total de aislados	Río Culebra	Laguna	Aguas costeras	Total de aislados	
<i>Candida sake</i>	4	4	3,96	1			1	0,99
<i>Candida zeylanoides</i>	1	1	0,99					0
<i>Cryptococcus victoriae</i>			0	1	2		3	2,97
<i>Cystofilobasidium infirmominiatum</i>			0		1		1	0,99
<i>Debaryomyces hansenii</i>	5	5	4,95		1		1	0,99
<i>Guehomyces pullulans</i>	2	2	1,98					0
<i>Leucosporidium scottii</i>	22	22	21,78	10	19	4	33	32,67
<i>Rhodotorula laryngis</i>	3	3	2,97		1	1	2	1,98
<i>Rhodotorula sp.</i>	9	9	8,91	4	8	2	14	13,86
<b>Total</b>	<b>46</b>	<b>46</b>	<b>45,54</b>	<b>16</b>	<b>32</b>	<b>7</b>	<b>55</b>	<b>54,46</b>

Además, la biodiversidad de la comunidad de levadurascolectadas de un sistema glaciar en la isla Greenwich en la Península Antártica, durante el verano austral del año 2012, fue cuantificada mediante los índices de diversidad de Shannon y de Simpson.

Índice de Shannon:  $1.407 \pm 0.179$  (desviación estándar).

Índice de Simpson:  $0.642 \pm 0.077$  (desviación estándar).

Calculados con un 95% de confianza y con un bootstrap en base a 10000 iteraciones, el número dado de iteraciones corresponde a número de muestras aleatorias, cada una con la misma cantidad de individuos totales que la muestra original conservando las probabilidades proporcionales de la abundancia original de los taxones. El análisis de los resultados se realizó con el software PAST 3.05 (Anexo 5).

## 4. CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN

En la caracterización e identificación de levaduras es fundamental conocer las propiedades morfológicas y fisiológicas de los aislados. También es indispensable para la identificación la secuenciación de uno o dos genes como por ejemplo los genes ribosomales y citocromo oxidasa II, alternativamente o en conjunción con alguna técnica de diagnóstico rápida como RFLPs (Vincent, et al., 2011).

### 4.1 Caracterización macroscópica y microscópica

La variación en las características macroscópicas y microscópicas de las levaduras aisladas de diferentes ambientes puede ser muy amplia. Con respecto a las características macroscópicas están en dependencia no sólo del medio de cultivo en el cual se siembran las levaduras, sino también en relación al patrón de gemación, al tamaño y la forma de las células que componen la colonia (Van der Klei, et al., 2011). La variación natural en las características microscópicas depende del citoesqueleto, la arquitectura de la pared celular, el condicionamiento ambiental, los antecedentes genéticos y un mecanismo de regulación enzimática que se encarga del monitoreo del tamaño y forma de las levaduras durante su ciclo celular (quinasas dependientes de ciclinas). En el caso de las levaduras que se reproducen por fisión, este mecanismo ocurre durante la fase G<sub>2</sub>, mientras en las levaduras que se reproducen por gemación su control ocurre en la fase G<sub>1</sub> (Marshall, et al., 2012).

La bibliografía reporta que la mayor parte de las levaduras presentan una coloración blanca-beige, además pueden presentar coloraciones anaranjadas y rojas características de algunos géneros como *Rhodospodium*, *Sporidiobolus*, *Rhodotorula* y *Cystofilobasidium*; la coloración está relacionada a la síntesis de pigmentos carotenoides como  $\beta$ -caroteno (Vincent, et al., 2011).

Con respecto del género *Rhodotorula*, *Leucosporidium*, *Cryptococcus* y *Cystofilobasidium* cabe mencionar que el crecimiento mucoide de las mismas está

relacionado a la segregación de polisacáridos extracelulares que condicionan la encapsulación celular (Vincent, et al., 2011).

En términos generales, las levaduras del género *Rhodotorulase* caracterizan por presentar formas celulares subglobosas, ovoides, elipsoides o elongadas durante la reproducción asexual, que puede ser por gemación polar o multilateral y algunas tienen la capacidad de sintetizar pigmentos amarillos y rojos; éstas características coinciden con la caracterización de los aislados correspondientes al género *Rhodotorula* en el presente trabajo (Anexo 2d-2e). Además se reporta en éste género el desarrollo de pseudo hifas o hifas verdaderas, aunque no se evidenció ninguna de estas estructuras en los aislados estudiados (Sampaio, 2011).

Las levaduras del género *Cystofilobasidium* se caracterizan por presentar formas celulares elipsoides u ovoides durante la reproducción asexual, que predominantemente es por gemación polar y algunas especies presentan pigmentos anaranjados o rosados (Anexo 2b). La especie identificada como *Cystofilobasidium infirmominiatum* se ajusta a estas características (Sampaio & Paul, 2011).

Las levaduras del género *Candida* se caracterizan por presentar formas celulares globosas, elipsoidales, cilíndricas o elongadas y ocasionalmente ojivales y triangulares durante la reproducción asexual, que es por gemación polar holoblástica; éstas características están presentes en los aislados identificados como *Candida sake* y *Candida zeylanoides* (Anexo 2a). Aunque, el carácter holoblástico de la gemación, referente a la disposición de las capas de la pared celular, no se pudo definir por microscopía de contraste de fase (Lachance, et al., 2011).

Las levaduras del género *Cryptococcus* se caracterizan por presentar formas celulares elipsoides, esferoidales, ovoides o elongadas durante la reproducción asexual, que generalmente es por gemación multilateral o polar; los aislados identificados como *Cryptococcus victoriae* presentan características que se ajustan perfectamente a las reportadas (Anexo 2b). Además algunos autores reportan que éste género puede desarrollar pseudo hifas o hifas verdaderas y una gemación

enteroblástica, características que no fueron evidenciadas en los aislados analizados (Fonseca, et al., 2011).

Las levaduras del género *Debaryomyces* se caracterizan por presentar formas celulares globosas, ovoides o lenticulares durante la reproducción asexual, que es por gemación multilateral (Anexo 2c); las características macroscópicas y microscópicas investigadas se ajustan a los aislados identificados como *Debaryomyces hansenii* (Suzuki, et al., 2011).

Las levaduras del género *Guehomyces* se caracterizan por presentar formas celulares ovoides o cilíndricas durante la reproducción asexual, que es por gemación polar y enteroblástica (Anexo 2c); las características mencionadas están descritas en los aislados identificados como *Guehomyces pullulans* (Fell & Guého-Kellerman, 2011).

Finalmente las levaduras del género *Leucosporidium* se caracterizan por presentar formas celulares elipsoidales, ovoides o elongadas durante la reproducción asexual, que es por gemación polar (Anexo 2c). Además se reporta que este género puede desarrollar pseudo hifas o hifas verdaderas que no se evidenciaron en los aislados analizados de *Leucosporidium scottii*, pero si hubo coincidencia con las características microscópicas identificadas (Sampaio & Fell, 2011).

Las características morfológicas y microscópicas pueden variar a nivel intra e inter específico, especialmente cuando numerosas cepas son parte del mismo estudio, lo cual explica la variabilidad en las formas reproductivas y celulares, además de la diferencia en la descripción de las colonias de los aislados CLQCA-ANT-097 comparado a los aislados CLQCA-ANT-105 y CLQCA-ANT-041, correspondientes a *Cryptococcus victoriae*, en relación a la textura, color y brillo de las colonias. Más aún, aunque no se conoce con exactitud como la presión evolutiva condiciona los caracteres morfológicos de las levaduras, se ha determinado que ciertos reguladores del ciclo celular (CDC28) son esenciales para determinar las

variaciones en el tamaño, forma y arreglo celular que también afectarán la morfología de las colonias (Lee, et al., 2011).

La comprensión de como las variaciones genéticas naturales afectan las complejas redes enzimáticas y la acumulación de fenotipos celulares, como por ejemplo las características macroscópicas y microscópicas de aislados específicos, se basa en la delección de genes no esenciales. Un estudio sugiere que 500 de estos genes son los encargados de mantener en diferente proporción la estabilidad en los caracteres fenotípicos, aunque aún se desconoce el mecanismo por lo cual aislados eliminan ciertos genes para generar morfologías específicas, es un hecho la variabilidad que proporciona este condicionamiento genético (Yang, et al., 2014).

#### **4.2 Caracterización fisiológica**

Las levaduras son consideradas como un grupo metabólico complejo y altamente heterogéneo a nivel intra e inter específico, como se evidenció en los resultados presentados. Es claro que las variantes en el metabolismo de las levaduras están relacionada al nicho ecológico que habitan y a la diversidad de componentes o rutas de regulación metabólicas que pueden seguir. Pueden existir diferencias en el sistema de transporte de azúcares, la fosforilación de hexosas, la localización intracelular de ciertas proteínas y en la regulación enzimática de las rutas de glicólisis y el ciclo del ácido tricarboxílico, en dependencia de la especie y las condiciones de cultivo (Flores, et al., 2000).

La fermentación de azúcares en las levaduras está casi siempre relacionada con la asimilación y producción de biomasa, pero el caso contrario no es factible, es decir muchas levaduras tienen la capacidad de asimilar varios tipos de azúcares pero no necesariamente tienen la capacidad de fermentar los mismos (Vincent, et al., 2011). Este hecho se evidenció en los resultados presentados ya que la mayoría de

aislados de levaduras tienen cierta capacidad para asimilar azúcares pero no para fermentarlos.

Los resultados obtenidos evidencian que los monosacáridos como glucosa o galactosa y los disacáridos como sacarosa o maltosa son los azúcares que se asimilan en mayor proporción por las levaduras, lo cual está ampliamente reportado por múltiples investigadores (Rodríguez, et al., 2006).

Los resultados de asimilación débil y de fermentación negativa reportados para la mayoría de aislados de levaduras caracterizados, difieren de los estudios de Kurtzman, et al., (2011), ya que reportan una asimilación positiva fuerte o latente para las especies identificadas. *Candida sake* es la única especie que presentó una asimilación y fermentación comparable a los estudio de Kurtzman, et al., (2011) probablemente por su alta adaptabilidad y ocurrencia en diferentes sustratos.

La diferencia en los resultados de fermentación y asimilación de azúcares con respecto a los resultados reportados por otros investigadores, está relacionada al hábitat de los aislados caracterizados. Las bajas temperaturas de la Antártica influyen en la fluidez de la membrana, reducen de la afinidad de las enzimas por su sustrato, disminuyen de la tasa de energía y reacción, y aumentan la viscosidad del agua. Estos factores condicionan el metabolismo celular de las levaduras induciendo un perfil de asimilación y fermentación lento (Amato & Christner, 2009).

### **4.3 Identificación de especies y caracterización molecular**

Diversas investigaciones en la Antártica han colectado, caracterizado e identificado levaduras viables utilizando diferentes técnicas moleculares como MSP-PCR, ITS-PCR y la secuenciación de la región correspondiente a los espaciadores transcritos internos ITS1 e ITS2, así como del dominio D1/D2 del segmento 26S del RNA ribosómico; dos de estas técnica fueron también empleadas en el presente

estudio para la caracterización e identificación de los aislados de levaduras con resultados satisfactorios (Vaz, et al., 2010).

La región correspondiente a los espaciadores transcritos internos ITS1 e ITS2 separados por el gen 5.8S, presentan una alta variabilidad en la zona de los ITS, que permite la resolución a nivel inter específico, pudiendo discriminar levaduras filogenéticamente cercanas (Kurtzman & Piskur, 2006). La variante de esta técnica RFPL-PCR permite obtener determinados perfiles de restricción para cada especie analizada, donde la variabilidad de las secuencias amplificadas determina fragmentos de distintos tamaños que pueden ser revelados mediante electroforesis en gel de agarosa, como se evidenció en los resultados presentados (Verdugo & González, 2008).

Diferentes autores han publicado los tamaños (en pares de base) de los fragmentos de los perfiles de restricción de una gama de levaduras, refiriéndose como un método rápido de diagnóstico. Las enzimas HhaI, HaeIII y HinfI son las más utilizadas y aunque se ha reportado divergencia en los tamaños de los fragmentos, el patrón general de restricción es el mismo. Por ejemplo en los resultados descritos, el perfil de restricción de *Candida sake* tiene una variabilidad de 10bp con respecto a lo reportado con otros autores, pero conserva el patrón de corte. Esta divergencia probablemente se deba a las condiciones en las que se realizó la corrida de los fragmentos, es decir la concentración de agarosa del gel, el voltaje en la electroforesis e incluso el tipo y concentración del buffer utilizado puede crear variabilidad en los resultados (Segura, et al., 2010).

En los perfiles de restricción de *Debaryomyces hansenii* y *Candida zeylanoides* también existe una diferencia de 10 a 15bp en los fragmentos reportados, pero el patrón de restricción de las enzimas es el mismo (Granchi, et al., 1999; Zarzoso, et al., 1999). Con respecto a *Rhodotorula laryngis*, *Leucosporidium scottii*, *Guehomyces pullulans*, *Cryptococcus victoriae* y *Cystofilobasidium infirmominiatum* no se encontró información de referencia para comparar los patrones de restricción

obtenidos. Las imágenes de los geles de electroforesis, así como los tamaños de los perfiles de restricción para estas especies están depositados en la página web <http://www.cnib.com.ec/index.php/es/clqca-catalogo>, que corresponde al catálogo de la Colección de Levaduras Quito-Católica, como referente de información para otras investigaciones.

A pesar de la resolución para discriminar una especie de otra con la aplicación de la técnica PCR-RFLPs, la secuenciación de genes ribosómicos 5.8S, 18S y 26S es el método de diagnóstico más utilizado para la caracterización de levaduras porque ofrece resultados precisos y con alta resolución para la identificación de especies. (Martorell, 2005). Todos los aislados de levadura identificados presentaron como mínimo un 99% de similitud después del alineamiento con sus especies relacionadas en el GenBank; de hecho una sustitución de seis nucleótidos o más (1%) en la región amplificada podría corresponder a un aislado de diferente especie, aunque pueden existir varias excepciones como *Saccharomyces pastorianus* y *Saccharomyces bayanus* que presentan un 100% de similitud en el análisis de la región del dominio D1/D2 del segmento 26S del RNA ribosómico a pesar de representar especies diferentes. Un análisis complementario con otra técnica molecular es indispensable en la identificación de levaduras (Kurtzman, et al., 2011).

La resolución molecular que proporciona el ITS en muchas ocasiones es mayor a la que ofrece los resultados del dominio D1/D2, como por ejemplo para los géneros *Bensingtonia* y *Kondoa*; pero el caso contrario también es factible por ejemplo en especies del género *Trichosporon* que presenta una resolución menor con el ITS (Kurtzman & Fell, 2006). En el presente estudio los aislados identificados como *Rhodotorula* sp. también tienen un 99% de similitud con *Rhodotorula laryngis*, pero se pudo discriminar una especie de otra en base al respaldo de la información proporcionada por los RFLPs, y también por la colaboración del National Collection of Yeast Culture en Norwich-Inglaterra que fue el ente encargado de complementar los estudios en *Rhodotorula* sp., y además concluir que representa una especie aún

no descrita. Actualmente su secuencia está depositada en el GenBank con el número de acceso HE994140.1, la evaluación y registro fue realizada por James S., Nueno-Palop C., Bond C., Roberts I., Carvajal Barriga, E., yPortero P., en el 2012 y mediante el estudio presente se respaldaron y complementaron los resultados.

El árbol filogenético generado a partir del análisis de la región del dominio D1/D2 del segmento 26S del RNA ribosómico determinó un soporte relativamente fuerte (mayor al 70%) con respecto a la relación entre las levaduras identificadas y las de referencia, aunque no se puede hablar de una confianza dentro de los grupos analizados. Es necesario considerar que sólo la utilización de genes múltiples en el análisis filogenético confiere a los resultados mayor congruencia y soporte científico para discriminar un grupo de otro (Kurtzman & Piskur, 2006).

El modelo de máxima verosimilitud puede utilizarse apropiadamente para reconstruir las relaciones entre secuencias que se encuentra separadas en la línea del tiempo, como los Ascomycetes y Basidiomycetes, ya que corrige los múltiples eventos de mutaciones que puedan ocurrir en estas secuencias (Marck & Lewis, 2003). Este modelo fue aplicado en el presente trabajo obteniéndose buenos resultados.

#### **4.4 Diversidad de levaduras e Índices de diversidad**

La diversidad y adaptación de las levaduras a ambientes de extremo frío está correlacionada con la adaptación a sus condiciones limitantes de vida, es decir la alta presión hidrostática, el estrés osmótico y oxidativo, la alta radiación solar y la actividad de agua (Brandao, y otros, 2011). Los principales mecanismos adaptativos que les han permitido a las levaduras colonizar estos ambientes son: el incremento de la fluidez de membranas, síntesis de proteínas anti-congelantes y de shock-térmico, la modulación de la cinética enzimática y la síntesis de otros compuestos protectores (Buzzini & Margesin, 2014).

En una revisión de las levaduras psicrófilas aisladas de diferentes hábitats glaciares en el mundo, Buzzini, et al., (2012) menciona que en la región Antártica se han identificado 70 especies diferentes (incluye las nueve especies identificadas en esta investigación), 13 ascomycetes y 57 basidiomycetes, donde el principal género encontrado ha sido *Cryptococcus*, 25% del total de aislados. Los resultados en el presente estudio muestran también que existe mayor proporción de basidiomycetes aunque los géneros predominantes son *Rhodotorula* y *Leucosporidium*, con un 23% y un 55% respectivamente.

*Candida sake* ha sido aislada de diferentes sustratos y no parece tener una asociación específica a un hábitat determinado, cabe indicar que se ha encontrado a esta especie en el océano antártico lo que sugiere una capacidad adaptabilidad a ambientes fríos. Se ha estudiado el uso potencial de estas levaduras como biocontrol en la post cosecha de frutas con resultados positivos (Lachance, et al., 2011), específicamente en el control de *Botrytis cinerea* en uvas con resultados comparables al tratamiento con fungicidas (Cañamas, et al., 2011); como un agente inmunoestimulante en camarón *Fenneropenaeus indicus* contra el virus del síndrome de la mancha blanca (Sajeevan, et al., 2006).

Los aislados de levaduras que se han identificado como *Candida zeylanoides* fueron encontrados en asociación con animales de sangre caliente, específicamente especies marinas (Lachance, et al., 2011) y también se han aislado de muestras de suelo y agua de la Antártica (Vaz, et al., 2010). Se ha estudiado su uso biotecnológico en el tratamiento de aguas residuales de la industria textil (Abioye, et al., 2014); y para la producción de eritritol y D-manitol como saborizantes en la industria alimenticia (Hatorri & Suzuki, 1974).

*Cryptococcus victoriae* ha sido aislada ampliamente en la región Antártica y en Alaska, pero diversos estudios han encontrado representantes de esta especie en asociaciones con flores, en agua marina, en suelos forestales, entre otros ambientes naturales; lo que demuestra la variabilidad en la adaptación de esta especie (Fonseca,

Boekhout, & Fell, 2011). Estudios en el potencial biotecnológico de *Cryptococcus victoriae* han demostrado actividad celulasa a bajas temperaturas (Vaz, et al., 2010); producción de pectinasa, glucanasa y quitinasas extracelulares con aplicaciones industriales (Bogaert, et al., 2009); y la síntesis de lipasas, celulasas y gelatinasas con una actividad enzimática a 4°C (Loperela, et al., 2012).

*Cystofilobasidium infirmominiatum* ha sido aislada de las profundidades del océano antártico, es característica de aguas heladas con temperaturas de 0°C a 4°C y en asociaciones con zooplancton (Sampaio P., 2011). En algunas especies del género *Cystofilobasidium* se ha reportado: la síntesis de enzimas poli galacturonasas con la capacidad de degradar compuestos de pectina a bajas temperaturas (Choudhary & Johri, 2009 ); como agentes antagonistas para el manejo de enfermedades post cosecha en limón (Liu, et al., 2013); y como levadura oleaginosa para la producción de biodiesel (Pereyra, et al., 2014).

*Debaryomyces hansenii* es una levadura ampliamente distribuida en ambientes marinos, en el suelo, asociados a plantas y prevalente en productos con alto contenido de sal como el queso (Suzuki, et al., 2011). *Debaryomyces hansenii* presenta un potencial biotecnológico en diversas áreas como: la acumulación de lípidos para la producción de biodiesel, surfactantes y saborizantes; la implementación de procesos fermentativos de bajo costo para la producción de biomasa en base a contaminantes gracias a su capacidad de osmoregulación; para el mantenimiento de condiciones asépticas en procesos de fermentación ya que es capaz de sintetizar toxinas contra varias especies de levaduras; en la síntesis de enzimas  $\beta$ -glucosidasas, esterases e inulinasas de uso industrial (Johnson & Echavarri-Erasun, 2011); en los procesos de fermentación de salchichas y carnes; en la síntesis de xilitol a partir de xilosa o madera hidrolizada en la industria alimenticia (Aggarwal & Mondal, 2009); y en la síntesis de toxinas activas contra *C. albicans* en el control de infecciones (Banjara, 2014).

*Guehomyces pullulans* es una levadura que se ha encontrado en diferentes sustratos, en asociaciones con plantas, en heces de cerdos, infecciones nasales en gatos, y por supuesto en regiones Antárticas. Ha sido estudiada por su potencial enzimático en la degradación de compuesto de desecho de la industria; en la producción de B-galactosidasa para la hidrólisis de lactosa, con usos en la industria alimenticia y farmacéutica (Song, et al., 2010); y como agente de biocontrol en la post cosecha de peras (Fell & Guého-Kellerman, 2011).

*Leucosporidium scottii* es considerada una levadura psicrotolerante que ha sido aislada de diferentes sustratos en la región Antártica, que incluye secciones de hielo y suelo, lagunas y agua marina; lo cual corresponde con los resultados de esta investigación. Es característica de ambientes fríos y templados; se ha encontrado en asociaciones con algas marinas, suelos forestales de Slovakia y en ríos contaminados de USA y Canadá (Sampaio & Fell, 2011). Estudios en el potencial biotecnológico de *Leucosporidium scottii* han demostrado: actividad hidrolasa, pectinasa y proteasa a un pH de 7 y bajas temperaturas (Vaz, et al., 2010); su utilización como agente control para el manejo de enfermedades post cosecha de manzana (Vero, et al., 2012); y su factibilidad como levadura oleaginosa para la producción de biodiesel (Pereyra, et al., 2014).

En la actualidad seis cepas de *Rhodotorula laryngis* han sido aisladas y estudiadas, cuatro de ellas se han recuperado de secciones de hielo y de aguas marinas, lo que dificulta definir su sustrato. En el presente estudio fue aislada tanto de fragmentos de glaciares como de agua de laguna y de la costa, información que complementa las investigaciones realizadas hasta ahora (Sampaio P., 2011). Además varias investigaciones se han realizado acerca del potencial biotecnológico de las levaduras que pertenecen al género *Rhodotorula*, como candidatos para la biorremediación de componentes aromáticos (Choudhary & Johri, 2009 );en la síntesis de carotenoides como toruleno y  $\beta$ -caroteno para la industria farmacéutica como antioxidantes o pigmentos en la industria alimenticia; producción de lípidos

para biodiesel (Zhang, et al., 2014); y en la síntesis de polisacáridos extracelulares con aplicaciones alimenticias por su afinidad con el agua y su viscosidad (Bogaert, et al., 2009).

Los géneros correspondientes a *Rhodotorula* y *Cystofilobasidium* se caracterizan por su capacidad para sintetizar compuestos foto-protectores como carotenoides y micosporinas que contribuyen a incrementar la viabilidad celular bajo condiciones de estrés ambiental como la alta radiación UV (Vaz, et al., 2010). De hecho, los microorganismos adaptados a altas radiaciones pueden ser utilizados como un potencial biomarcador para determinar la variación histórica de radiación UV en la Antártica en el marco del cambio climático; esta hipótesis se basa en los estudios de Libkind, et al.,(2006) que sugieren que la concentración de carotenoides sintetizados está relacionada directamente con los niveles de radiación UV, y los estudios de Knowlton, et al.,(2013) que determinaron la capacidad de supervivencia de las levaduras pigmentadas que datan de más de 150000 años en el pasado.

Además se ha reportado que en la región Antártica la ocurrencia de levaduras adaptadas a ambientes fríos, se han aislado mayoritariamente de maderas y algas en descomposición (22%), de muestras de suelo (51%), del agua marina y de lagos (11%) y de secciones de hielo un (5%), entre otros sustratos con menos incidencia (Buzzini & Margesin, 2014). Aunque en el presente estudio no se muestrearon los dos sustratos reportados con mayor porcentaje, si se encontró cierta diversidad de especies tanto en las secciones de hielo como en los sustratos líquidos colectados, trabajo que complementa la información científica disponible.

La composición de la comunidad, de las especies de levaduras aisladas de la Península Antártica, está definida tanto por la biogeografía como por las reglas de ocupación de nicho. Las especies *Rhodotorula laryngis*, *Leucosporidium scottii*, *Cryptococcus victoriae* y *Cystofilobasidium infirmominiatum* son especies características de ambientes fríos que incluye océanos, lagos, capas de hielo y suelo congelado; sus características intrínsecas componen un modelo de adaptación,

interacción y ocupación de hábitat específico. Mientras *Candida sake*, *Debaryomyces hansenii*, *Guehomyces pullulans* y *Candida zeylanoides* son levaduras con una ocurrencia más variable de sustratos, probablemente afectada en mayor medida por la biogeografía de la región Antártica, como es la dispersión por vientos, antecedentes históricos y antropogénicos, la asociación a heces de animales, asociación a algas, entre otros (Vaz, et al., 2010; Lachance, et al., 2003).

La diversidad de una comunidad de levaduras medida en términos de riqueza y dominancia proporciona información cuantificable a través de los índices de Shannon y Simpson. El índice de Shannon obtenido de  $1.407 \pm 0.179$  está en el límite inferior de los valores de referencia, lo que nos permite determinar que la comunidad de levaduras tiene una composición con una uniformidad y riqueza muy baja, es decir existe poca variabilidad representada por las nueve especies identificadas y con una dominancia amplia de dos especies: *Rhodotorula* sp., y *Leucosporidium scottii*; donde probablemente su dominancia es efecto de las condiciones abióticas y adaptativas de estos microorganismos en la Antártica.

Además el índice de Simpson reportado de  $0,642 \pm 0.077$  indicaría una diversidad media de la comunidad estudiada, hecho que probablemente se debe a que este índice toma en cuenta más la riqueza de las especies que la dominancia en la comunidad. Cabe enfatizar que la reproducción y validación de estos índices está en dependencia del muestreo estadístico y la identificación de todos los taxa presentes en la comunidad, por lo tanto los índices reportados son una referencia científica de la biodiversidad de la región Antártica (Kerkhoff, 2010). Además no se encontraron registros de otros estudios que caractericen los índices de biodiversidad de levaduras en regiones antárticas, que puedan utilizarse como un referente de información para comparar los resultados obtenidos en esta investigación.

Pero comparativamente Brandao et al.,(2011) en un estudio de biodiversidad de levaduras aisladas de lagos de la Patagonia, encontró índices de Shannon y de Simpson superiores,  $2.5 \pm 0.22$  y  $0.85 \pm 0.6$  respectivamente. La información

presentada supone una riqueza y uniformidad de especies de levaduras mayor en la comunidad patagónica, lo cual está respaldado por las 35 especies identificadas sin un porcentaje amplio de dominancia de ninguna de ellas. Finalmente la cuantificación de la diversidad de levaduras dentro de una comunidad a pesar de estar condicionada por diversos factores puede ser un referente para entender el desenvolvimiento de estos microorganismos en el ecosistema Antártico.

## 5. CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES

- Los 101 aislados de levaduras fueron caracterizados, identificados y clasificados dentro de siete géneros correspondientes a nueve especies: *Rhodotorula* sp., *Rhodotorula laryngis*, *Leucosporidium scottii*, *Guehomyces pullulans*, *Cryptococcus victoriae*, *Candida sake*, *Cystofilobasidium infirmominiatum*, *Debaryomyces hansenii* y *Candida zeylanoides*.
- En la mayoría de los aislados analizados existe poca variabilidad en la descripción de las colonias de levaduras, además se determinó que *Cryptococcus victoriae* presentó variabilidad morfológica inter-especie ya que se definieron dos perfiles morfológicos diferentes.
- La forma celular, el tamaño, y el tipo reproducción asexual según el sitio de gemación varía significativamente a nivel intra e inter específica en todos los aislados de levaduras identificados.
- Se determinó divergencia metabólica en la asimilación de azúcares, donde la mayoría de levaduras presentan una asimilación débil de glucosa y sacarosa, evidencia de un metabolismo lento de las levaduras estudiadas y determinado por la condiciones de adaptación al hábitat antártico.
- Los perfiles de fermentación fueron más homogéneos, con resultados negativos para todas las especies de levaduras excepto *Candida sake* que presentó fermentación positiva de cuatro azúcares (glucosa, maltosa, sacarosa y rafinosa).

- La identificación molecular mediante la técnica PCR-RFLPs del ITS, determinó nueve patrones de restricción diferentes utilizando las endonucleasas de restricción HaeIII, HhaI y HinfI. Estos resultados fueron respaldados por los análisis de las secuencias del dominio D1/D2 del segmento 26S del RNA ribosómico, que determinó que los nueve patrones se correlacionan con las nueve especies identificadas.
- Las imágenes de los geles de electroforesis, así como el tamaño de los perfiles de restricción de las nueve especies identificadas están depositados en la página web <http://www.cnib.com.ec/index.php/es/clqca-catalogo>, que corresponde al catálogo de la Colección de Levaduras Quito-Católica, como referente de información para otras investigaciones.
- El análisis de las secuencias del dominio D1/D2 del segmento 26S del RNA ribosómico y de los patrones de restricción determinó que *Rhodotorula* sp., representa una especie aún no descrita por la ciencia y su secuencia está depositada en el GenBank con el número de acceso HE994140.1. Esta información es respaldada y complementada por los estudios realizados por el National Collection of Yeast Culture en Norwich-Inglaterra que fue el ente encargado de complementar la investigación y llegar a la conclusión taxonómica de la especie.
- En general la diversidad de una comunidad de levaduras medida en términos de riqueza y dominancia a través de los índices de Shannon ( $1.407 \pm 0.179$ ) y Simpson ( $0,642 \pm 0.077$ ) determinaron una composición con una uniformidad y riqueza muy bajas.
- Las especies de levaduras identificadas, en el contexto de su hábitat, tienen potenciales aplicaciones biotecnológicas en el manejo post cosecha de frutos, en la producción de enzimas termo tolerantes a bajas temperaturas, en la

descomposición de compuestos contaminantes, en la industria alimenticia, de combustibles y farmacéutica.

## 6. CAPÍTULO 6: RECOMENDACIONES

- Se puede complementar la información de la caracterización de los aislados de levaduras en base a pruebas bioquímicas que determinen directamente sus potenciales usos biotecnológicos.
- Para la construcción de un árbol filogenético con un fuerte soporte estadístico es necesario tomar en cuenta las secuencias de otros genes como 18S, 5.8S y del ITS.
- Los estudios de diversidad requieren la complementación de nuevas investigaciones en regiones antárticas para darle mayor significancia a los resultados.
- En necesario considerar otros índices de diversidad que puedan complementar la información de la riqueza y dominancia de las especies que conforman una comunidad microbiológica.
- La composición de la comunidad de levaduras debe definirse también por la biogeografía que componen principalmente factores de dispersión mecánica, antropogénicos y por asociaciones con animales, así como también por las reglas de ocupación de nicho determinadas por las propiedades biológicas intrínsecas de cada especie.
- La evaluación de los usos biotecnológicos en la producción de enzimas termo tolerantes se debe potenciar mediante el uso de pruebas cinéticas.

## 7. CAPÍTULO 7: BIBLIOGRAFÍA

- Abioye, O., Mustapha, O., & Aransiola, S. (2014). Biological Treatment of Textile Effluent Using *Candida zeylanoides* and *Saccharomyces cerevisiae* Isolated from Soil. *Hindawi*, 1-3.
- Aggarwal, M., & Mondal, A. (2009). *Debaryomyces hansenii* : An Osmotolerant and Halotolerant Yeast. En T. Satyanarayana, & G. Kunze, *Yeast Biotechnology: Diversity and Applications* (págs. 97-98). USA: Springer.
- Allen, B., Kon, M., & Bar-Yam, Y. (2009). A New Phylogenetic Diversity Measure Generalizing the Shannon Index and Its Application to Phyllostomid Bats. *The American Naturalist*, 1-3.
- Amato, P., & Christner, B. (2009). Energy Metabolism Response to Low-Temperature and Frozen Conditions in *Psychrobacter cryohalolentis*. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, 711-715.
- Banjara, N. (2014). *DEBARYOMYCES HANSENI: A FOODBORNE YEAST THAT PRODUCES ANTI-CANDIDA KILLER TOXIN*. Nebraska: Food Biotechnology Commons.
- Bogaert, I., De Maeseneire, S., & Vandamme, E. (2009). Extracellular Polysaccharides Produced by Yeasts and Yeast-Like Fungi. En T. Satyanarayana, & G. Kunze, *Yeast Biotechnology: Diversity and Applications* (págs. 665-666). USA: Springer.
- Botstein, D., & Fink, G. (2011). Yeast: An Experimental Organism for 21st Century Biology. *Yeastbook perspectives* , 696-702.
- Bouza, C., & Covarrubias, D. (2005). Estimación del índice de diversidad de Simpson en m sitios de muestreo. *Revista de investigación operacional*, 190-194.

- Brandao, L., Libkind, D., Vaz, A., Espíritu Santo, L., Moliné, M., García, V., . . . Rosa, C. (2011). Yeasts from oligotrophic lake in Patagonia (Argentina): diversity, ditribution and synthesis of photoprotective compounds and extracellular enzymes . *Federation of European Microbiological Societies*, 1-2.
- Buzzini, P., & Margesin, R. (2014). Cold-Adapted Yeast: A lesson from the cold and challenge for the XXI century. En P. Buzzini, & R. Margesin, *Cold-Adapted Yeast* (págs. 10-13). London: Springer.
- Buzzini, P., Branda, E., Goretti, M., & Turchetti, B. (2012). Psychrophilic yeasts from worldwide glacial habitats: diversity, adaptation strategies and biotechnological potencial. *Federation of European Microbiological Societies*, 217-218.
- Cañamas, T., Viñas, I., Torres, R., Usall, J., Solsona, C., & Teixido, N. (2011). Field applications of improved formulations of Candida sake CPA-1 for control of Botrytis cinerea in grapes. *Elsevier*, 150-151.
- Carvajal, J., Libkind, D., Briones, A., Úbeda, J., Portero, P., Roberts, I., . . . Rosa, C. (2011). Yeast Biodiversity and its significance: Case studies in natural and human-related environments, Ex situ preservation, Applications and Challenges. En O. Grillo, & G. Verona, *Changing Diversity in Changing Environment* (págs. 55-58). Environmental Sciences.
- Choudhary, D., & Johri, B. (2009 ). Basidiomycetous Yeasts: Current Status. En T. Satyanarayana, & G. Kunze, *Yeast Biotechnology: Diversity and Applications* (págs. 38-39). USA: Springer Science.
- Cimerman, N., Sonjak, S., Zalar, P., Frisvad, J., Diderichsen, B., & Plemenitas, A. (2003). Extremophilic fungi in arctic ice: a relationship between adaptation to low temperature and water activity. *Elsevier Physics and Chemistry of Earth*, 1273-1274.

- Clarke, A., Johnston, N., Murphy, E., & Rogers, A. (2012). Introduction Antarctic Ecology in a Changing World . En A. Rogers, N. Johnston, E. Murphy, & A. Clarke, *Antarctic Ecosystems An Extreme Environment in a Changing World* (págs. 2-5). Chichester: Blackwell Publishing.
- Conde, L. (2007). El locus MAT (mating-type) de los ascomicetos: su evolución, estructura y regulación. *Revista Iberoamericana de Micología*, 95-96.
- Fell, J., & Guého-Kellerman, E. (2011). Guehomyces Fell & Scorzetti (2004). En C. Kurtzman, J. Fell, & T. Boekhout, *The yeasts A taxonomic study* (págs. 1773-1783). USA: Elsevier.
- Fell, J., Boekhout, T., Fonseca, A., Scorzetti, G., & Stazzell-Tallman, A. (2000). Biodiversity and systematics of Basidiomycetous yeast as determined by large-subunit rDNA D1/D2 domain sequence analysis. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 1351-1355.
- Flores, C., Rodriguez, C., Petit, T., & Gancedo, C. (2000). Carbohydrate and energy-yielding metabolism in non-conventional yeasts. *Elsevier*, 507-519.
- Fonseca, Á., Boekhout, T., & Fell, J. (2011). Cryptococcus Vuillemin (1901). En Kurtzman, F. J. Cletus, & T. Boekhout, *The yeasts A taxonomic study* (págs. 1661-1669). USA: Elsevier.
- García, V., Brizzio, S., Libkind, D., Buzzini, P., & Broock, M. (2007). Biodiversity of cold-adapted yeasts from glacial meltwater rivers in Patagonia, Argentina. *Federation of European Microbiological Societies*, 331-334.
- Gondinho, V., Furbino, L., Iara, S., Pellizari, F., Yokoya, N., & Pipu, D. (2013). Diversity and bioprospecting of fungal communities associated with endemic and cold-adapted macroalgae in Antarctica. *International Society for Microbial Ecology*, 1434-1435.

- Granchi, L., Bosco, M., Messini, A., & Vicenzini, M. (1999). Rapid detection and quantification of yeast species during spontaneous wine fermentation by PCR–RFLP analysis of the rDNA ITS region. *Journal of Applied Microbiology*, 950-956.
- Haeksworth, D. (2001). The magnitude of fungal diversity : the 1±5 million species stimated revisited . *The British Mycological Society*, 1422-1423.
- Hatorri, K., & Suzuki, T. (1974). Large Scale Production of Erythritol and Its Conversion to d-Mannitol Production by n-Alkane-grown *Candida zeylanoides*. *Agricultural and Biological Chemistry*, 1203-1204.
- Hatoum, R., Labrie, S., & Fliss, I. (2012). Antimicrobial and probiotic properties of yeasts: from fundamental to novel applications. *Frontiers in Microbiology*, 1-3.
- Hughes, K., & Bridge, P. (2010). Tolerance of Antarctic Soil Fungi to Hydrocarbons and their Potencial Role in Soil Bioremediation . En A. Bej, J. Aislable, & R. Atlas, *Polar Microbiology* (págs. 278-281). USA: USATaylor and Francis Group.
- Jhosmar, L. (2009). *Determinación de índices de diversidad arbórea en las parcelas permanentes de muestreo del valle sacta*. Bogotá: s/n.
- Johnson, E., & Echavarri-Erasun, C. (2011). Yeast Biotechnology. En T. y. study, *Kurtzman, Cletus; Fell, Jack; Boekhout, Teun* (págs. 26-28). USA: Elsevier.
- Kerkhoff, A. (2010). Measuring biodiversity of ecological communities. *Ecology Lab*, 1-3.
- Knowlton, C., Veerapaneni, R., D Elia, T., & Rogers, S. (2013). Microbial Analyses of Ancient Ice Core Sections from Greenland and Antarctica. *Biology*, 208.
- Kurtzman, C., & Fell, J. (2006). Yeast Systematics and Phylogeny – Implications of Molecular Identification Methods for Studies in Ecology. En P. Gábor, & C. Rosa, *Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts* (págs. 11-13). Springer .

- Kurtzman, C., & Piskur, J. (2006). Taxonomy and phylogenetic diversity among the yeast. En P. Sunnerhagen, & J. Piskur, *Comparative Genomics* (págs. 30-31). Berlin: Springer Berlin Heidelberg.
- Kurtzman, C., Fell, J., & Boekhout, T. (2011). Definition, classification and nomenclature of the yeast. En C. Kurtzman, J. Fell, & T. Boekhout, *The Yeast a Taxonomic Study* (págs. 1-3). USA: Elsevier.
- Lachance, M. (2006). Yeast Biodiversity: How many and How much? En P. Gábor, & R. Carlos, *Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts* (pág. 1). London: Springer.
- Lachance, M., Boekhout, T., Scorzetti, G., Fell, J., & Kurtzman, C. (2011). Candida Berkhout (1923). En C. Kurtzman, J. Fell, & T. Boekhout, *The yeasts A taxonomys study* (págs. 987-995). USA: Elsevier.
- Lachance, M., Bowles, J., & Starmer, W. (2003). Geography and niche occupancy as determinants of yeast biodiversity: the yeast insect morning glory ecosystem of Kipuka Puaulu, Hawai'i. *Elsevier*, 105-106.
- Lee, H., Magewge, P., & Brem, R. (2011). Natural Variation in CDC28 Underlies Morphological. *Genetics Society of America*, 721-723.
- Libkind, D., Brizzio, S., Ruffini, A., Gadanho, M., Van Brook, M., & Sampaio, J. (2003). Molecular characterization of carotenogenic yeasts from aquatic environments in Patagonia, Argentina. *Antonie van Leeuwenhoek*, 313-318.
- Libkind, D., Diéguez, M., Moliné, M., Pérez, P., Zagarese, H., & Broock, M. (2006). Occurrence of Photoprotective Compounds in Yeasts from Freshwater Ecosystems of Northwestern Patagonia (Argentina). *Photochemistry and Photobiology*, 972-975.
- Li-Jun, M., Rogers, S., & Catranis, C. (2000). Detection and chatacterization of ancient fungi entrapped in glacial ice. *The Mycological Society of America*, 286-287.

- Linares, M., & Solís, F. (2007). Identificación de levaduras. *Revista Iberoamericana de Micología*, 1-2.
- Liu, J., Sui, Y., Wisniewski, M., Droby, S., & Liu, Y. (2013). Review: Utilization of antagonistic yeasts to manage postharvest fungal disease of fruits. *Elsevier*, 153-155.
- Loperela, L., Soria, V., Varela, H., Lupo, S., Bergalli, A., Guigou, M., . . . Rivas, f. (2012). Extracellular enzymes produced by microorganisms isolated from maritime Antarctica. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2249-2250.
- Ma, L., Rogers, S., Catranis, C., & Starmer, W. (2000). Detection and characterization of ancient fungi entrapped in glacial ice . *Mycologia*, 286-287.
- Marshall, W., D Young, K., Swaffer, M., Wood, E., Nurse, P., Kimura, A., . . . Roeder, A. (2012). What determines cell size? *BMC Biology*, 5-8.
- Martini, A. (1992). Biodiversity and conservation of yeast. *Biodiversity and Conservation*, 324-325.
- Martorell, P. (2005). *Desarrollo y aplicación de sistemas rápidos para la detección, identificación y caracterización de levaduras alterantes de alimentos*. Valencia: Servei de Publicacions.
- Mattanovich, D., Sauer, M., & Gasser, B. (2014). Yeast biotechnology: teaching the old dog new tricks. *Microbial Cells Factories*, 1-2.
- Nagendra, H. (2002). Opposite trends in response for the Shannon and Simpson indices of landscape diversity. *Applied Geography*, 175-178.
- Negruta, O., Csutak, O., Stoica, I., Rusu, E., & Vassu, T. (2010). Methylotrophic yeasts: diversity and methanol metabolism. *Romanian Biotechnological Letters*, 5369-5370.

- Olson, N., & Morrow, J. (2012). DNA extract characterization process for microbial detection methods development and validation. *Bio Med Central*, 9-16.
- Orberá, T. (2004). Métodos moleculares de identificación de levaduras de interés biotecnológico. *Revista Iberoamericana de Micología*, 16-17.
- Pearce, D., & Laybourn, J. (2012). Antarctic lakes as models for the study of microbial biodiversity, biogeography and evolution. En A. Rogers, N. Johnston, E. Murphy, & A. Clarke, *Antarctic ecosystem an extreme environment in a changing world* (págs. 303-308). Chichester: Blackwell Publishing.
- Pereyra, V., Martinez, A., Rufo, C., & Vero, S. (2014). Oleaginous yeasts from Uruguay and Antarctica as renewable raw material for biodiesel production. *Science PC*, 251-253.
- Portero, P., & Paredes, K. (2011). *Instructivo de Procedimientos Operativos Estandarizados*. Quito: s/n.
- Pretorius, I., van der Westhuizen, T., & Augustyn, O. (1999). Yeast Biodiversity in Vineyards and Wineries and Its Importance to the South African Wine Industry. A review. *S. Afr. J. Enol*, 61-62.
- Prillinger, H., Lopandic, K., Suzuki, M., Kock, L., & Boekhout, T. (2011). Chemotaxonomy of Yeasts. En C. Kurtzman, J. Fell, & T. Boekhout, *The Yeasts a Taxonomic Study* (págs. 130-135). USA: Elsevier.
- Robert, V., Stalpeers, J., Boekhout, T., & Tan, S.-H. (2006). Yeast Biodiversity and Culture Collections . En P. Gábor, & C. Rosa, *Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts* (pág. 31). Utrecht: Springer.
- Roberts, I., & Oliver, S. (2010). The Yin and Yang of Yeast: Biodiversity Research and Systems Biology as Complementary Forces Driving Innovation in Biotechnology. *Biotechnology Letters*, 5-6.

- Rodrigues, F., Ludovico, P., & Leao, C. (2006). Sugar Metabolism in Yeasts: an Overview of Aerobic and Anaerobic Glucose Catabolism. En P. Gabor, & C. Rosa, *Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts* (págs. 101-104). Braga: Springer.
- Sajeevan, T., Philip, R., & Singh, B. (2006). Immunostimulatory effect of a marine yeast *Candida sake* S165 in *Fenneropenaeus indicus*. *Elsevier*, 150-155.
- Sampaio, & Paul. (2011). *Citofilobasidium* Oberwinkler & Bandoni (1938). En C. F. Kurtzman, & T. Boekhout, *The yeasts A taxonomic study* (págs. 1423-1429). USA: Elsevier.
- Sampaio, P. (2011). *Rhodotorula* Harrison (1928). En C. Kurtzman, J. Fell, & T. Boekhout, *The yeasts A taxonomy study* (págs. 1873-1879). USA: Elsevier.
- Sampaio, P., & Fell, J. (2011). *Leucosporidium* Fell, Statzell, Hunter & Phaff (1969). En C. Kurtzman, J. Fell, & T. Boekhout, *The yeasts A taxonomic study* (págs. 1485-1492). USA: Elsevier.
- Scheneiter, R. (2004). *Molecular, Genetics and Cell Biology*. Freiburg.
- Segura, L., Kirchmayr, M., Flores, E., & Gschaedler, A. (2010). PCR-RFLP de las regiones ITS-5.8S como herramienta de identificación de levaduras: ventajas y desventajas. *Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal*, 2-3.
- Shivaji, S., & Prasad, G. (2009). Antarctic yeast: Biodiversity and Potential Applications. En T. Satyanarayana, & K. Gotthard, *Yeast Biotechnology: Diversity and Applications* (págs. 4-8). Netherlands: Springer Science.
- Song, C., Chi, Z., Li, J., & Wang, X. (2010).  $\beta$ -Galactosidase production by the psychrotolerant yeast *Guehomyces pullulans* 17-1 isolated from sea sediment in Antarctica and lactose hydrolysis. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 1025.

- Starmer, W., & Lachance, M. (2011). Yeast Ecology. En C. Kurtzman, J. Fell, & T. Boekhout, *The Yeasts, a Taxonomic Study* (págs. 65-66). USA: Elsevier.
- Suzuki, M., Prasad, G., & Kurtzman, C. (2011). Dabaryomyces Lodder & Kreger-van Rij (1952) . En C. Kurtzman, J. Fell, & T. Boekhout, *The yeasts A taxonomy study* (págs. 361-369). USA: Elsevier.
- Tiago, F., Martins, F., Rosa, C., Nardi, R., & Cara, D. N. (2009). Physiological characterization of non-Saccharomyces yeasts from agro-industrial and environmental origins with possible probiotic function. *Springer, World J Microbiol Biotechnol*, 657-658.
- Uetake, J., Kohshima, S., Nakasawa, F., Takeuchi, N., Fujita, K., Miyake, T., . . . Nakawo, M. (2011). Evidence for propagation of cold-adapted yeast in an ice core from Siberian Altai Glacier. *Geophysical Research* , 1.
- Uribe, L. (2007). *Caracterización fisiológica de levaduras aisladas de la Filósfera de la mora*. Bogotá: s/n.
- Van der Klei, I., Veenhuis, M., Brul, S., Klis, F., De Groot, P., Muller, W., . . . Boekhout, T. (2011). Cytology, Cell Walls and Septa: A Summary of Yeast Cell Biology from a Phylogenetic Perspective. En C. Kurtzman, J. Fell, & T. Boekhout, *The Yeast a Taxonomy Study* (págs. 111-118). USA: Elsevier.
- Vaz, A., Rosa, L., Vieira, M., García, V., Brandao, L., Texeira, L., . . . Rosa, C. (2010). The diversity, extracellular enzymatic activities and photoprotective compounds of yeast isolated in Antarctica . *Brazilian Journal of Microbiology* , 937-938.
- Verdugo, A., & González, A. (2008). Taxonomía tradicional y molecular de especies y cepas de levaduras. *Lacandonia*, 139-141.
- Vero, S., Garmendia, G., Gonzáles, B., Betancur, O., & Wisniewski, M. (2012). Evaluation of yeasts obtained from Antarctic soil samples as biocontrol agents

for the management of postharvest diseases of apple (*Malus 3 domestica*). *Federation of European Microbiological Societies*, 189-190.

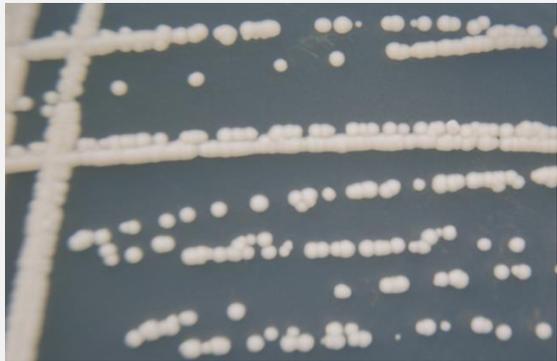
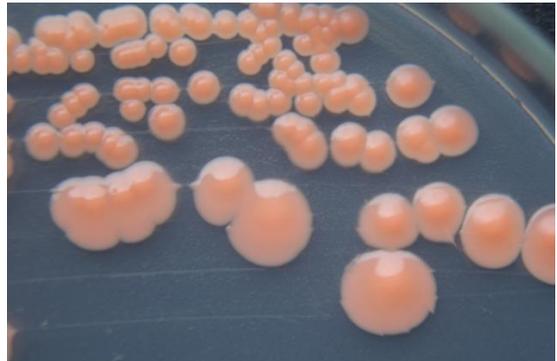
- Vincent, R., Kurtzman, C., Fell, J., & Boekhout, T. (2011). Methods for isolation, phenotypic characterization and maintenance of yeasts . En C. Kurtzman, J. Fell, & T. Boekhout, *The Yeasts: A Taxonomic Study* (págs. 89-97). USA: Elsevier.
- Wiley, J., & Sons, L. (1998). Introduction to yeast. En J. Wiley, & L. Sons, *Yeast Physiology and Biotechnology* (págs. 55-58). England: British Library.
- Yang, M., Ohnuki, S., & Ohya, Y. (2014). Unveiling nonessential gene deletions that confer significant morphological phenotypes beyond natural yeast strains . *BMC Genomics*, 2-4.
- Zaroso, E., Belloch, C., Uruburu, F., & Querol, A. (1999). Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 329-332.
- Zhang, Z., Zhang, X., & Tan, T. (2014). Lipid and carotenoid production by *Rhodotorula glutinis* under irradiation/high-temperature and dark/low-temperature cultivation. *Elsevier*, 150-152.

## 8. CAPÍTULO 8. ANEXOS

Anexo 1.a Fotografías de la morfología de las colonias representativas de las levaduras identificadas tomadas después de siete días de incubación a 25°C. Fotografías tomadas con una cámara Sony alfa 230.

<b>CODIGO ASIGNADO</b>	<b>ESPECIE</b>	<b>FOTOGRAFÍA</b>
<i>CLQCA- ANT-048</i>	<i>Candida sake</i>	 A petri dish containing several white, spherical colonies of Candida sake. The colonies are of varying sizes, with some being larger and more prominent than others. They are scattered across the surface of the agar.
<i>CLQCA- ANT-072</i>	<i>Candida zeylanoides</i>	 A petri dish showing numerous white, spherical colonies of Candida zeylanoides. The colonies are densely packed in some areas, particularly along the left edge, and more sparse in others. They appear as small, uniform white dots.
<i>CLQCA- ANT-097</i>	<i>Cryptococcus victoriae</i>	 A petri dish displaying white, irregularly shaped colonies of Cryptococcus victoriae. The colonies vary in size and shape, some appearing as elongated, rod-like structures and others as more rounded, oval shapes. They are distributed across the agar surface.

Anexo 1.b Fotografías de la morfología de las colonias representativas de las levaduras identificadas tomadas después de siete días de incubación a 25°C. Fotografías tomadas con una cámara Sony alfa 230.

<b>CODIGO ASIGNADO</b>	<b>ESPECIE</b>	<b>FOTOGRAFÍA</b>
CLQCA- ANT-105	<i>Cryptococcus victoriae</i>	
CLQCA- ANT-007	<i>Cystofilobasidium infirmominiatum</i>	
CLQCA- ANT-082	<i>Debaryomyces hansenii</i>	

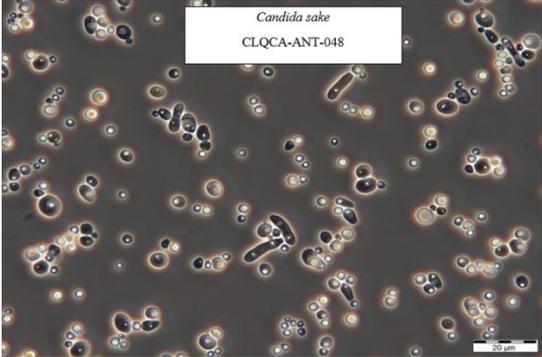
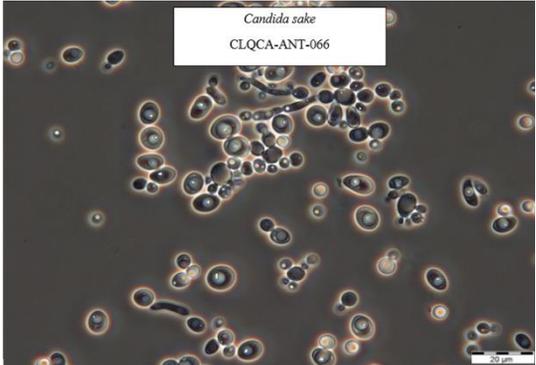
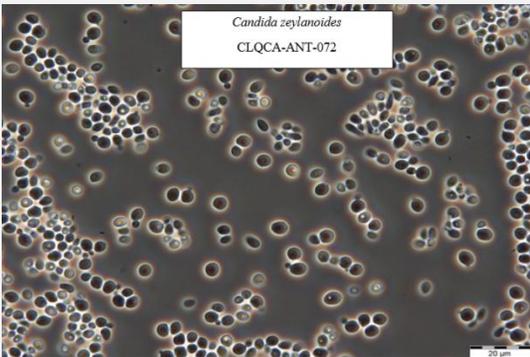
Anexo 1.c Fotografías de la morfología de las colonias representativas de las levaduras identificadas tomadas después de siete días de incubación a 25°C. Fotografías tomadas con una cámara Sony alfa 230.

<b>CODIGO ASIGNADO</b>	<b>ESPECIE</b>	<b>FOTOGRAFÍA</b>
CLQCA- ANT-073	<i>Guehomyces pullulans</i>	
CLQCA- ANT-003	<i>Leucosporidium scottii</i>	
CLQCA- ANT-077	<i>Rhodotorula laryngis</i>	

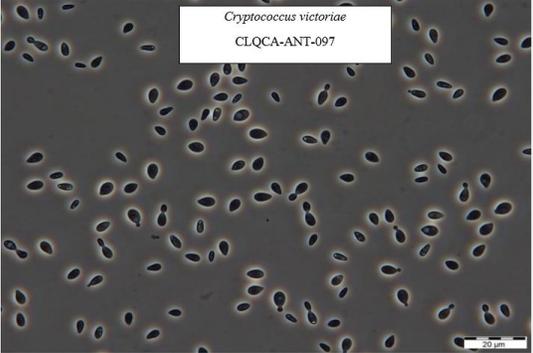
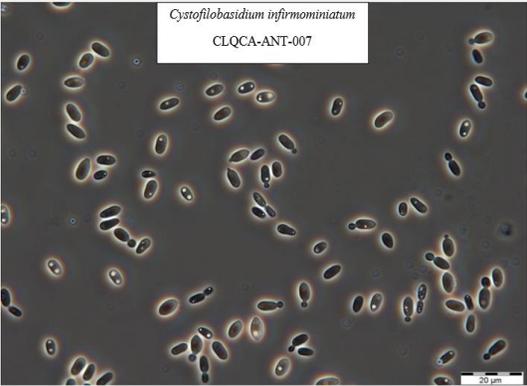
Anexo 1.d Fotografías de la morfología de las colonias representativas de las levaduras identificadas tomadas después de siete días de incubación a 25°C. Fotografías tomadas con una cámara Sony alfa 230.

<b><i>CODIGO ASIGNADO</i></b>	<b><i>ESPECIE</i></b>	<b><i>FOTOGRAFÍA</i></b>
<i>CLQCA- ANT-057</i>	<i>Rhodotorula</i> sp.	

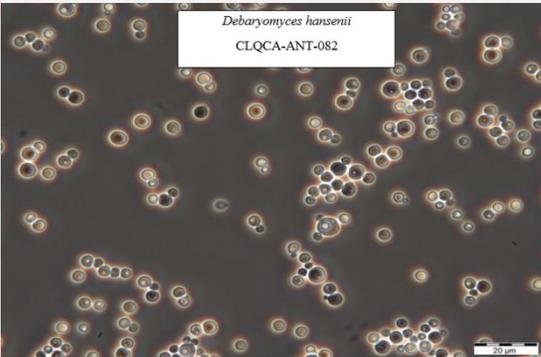
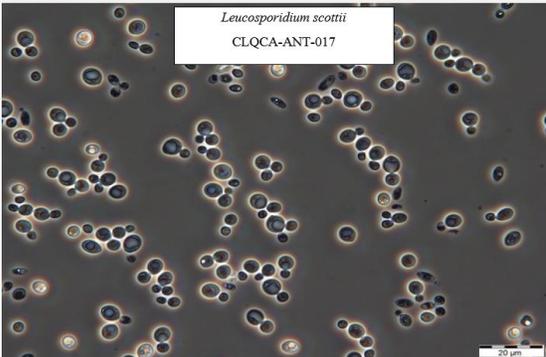
Anexo 2.a Fotografías microscópicas de las levaduras representativas identificadas tomadas después de tres días de incubación a 25°C. Se utilizó un microscopio de contraste de fase, adaptado a una cámara y magnificación con un lente 100X.

<b>CODIGO ASIGNADO</b>	<b>ESPECIE</b>	<b>FOTOGRAFÍA</b>
<i>CLQCA-ANT-048</i>	<i>Candida sake</i>	
<i>CLQCA-ANT-066</i>	<i>Candida sake</i>	
<i>CLQCA-ANT-072</i>	<i>Candida zeylanoides</i>	

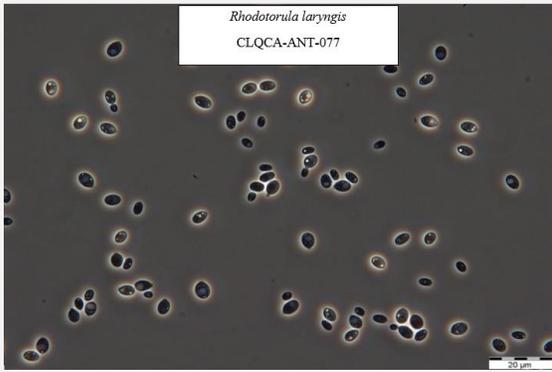
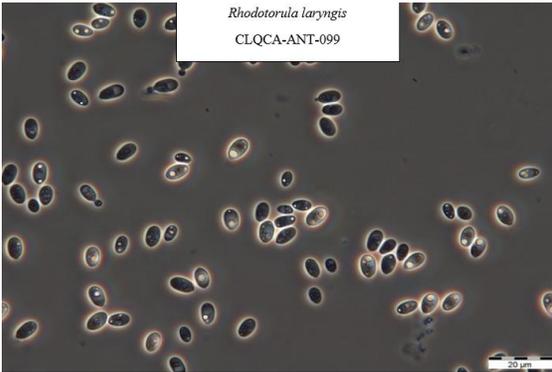
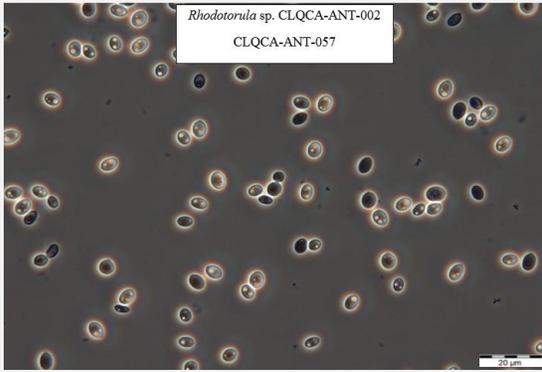
Anexo 2.b Fotografías microscópicas de las levaduras representativas identificadas tomadas después de tres días de incubación a 25°C. Se utilizó un microscopio de contraste de fase, adaptado a una cámara y magnificación con un lente 100X.

<b>CODIGO ASIGNADO</b>	<b>ESPECIE</b>	<b>FOTOGRAFÍA</b>
CLQCA-ANT-097	<i>Cryptococcus victoriae</i>	
CLQCA-ANT-105	<i>Cryptococcus victoriae</i>	
CLQCA-ANT-007	<i>Cystofilobasidium infirmominatum</i>	

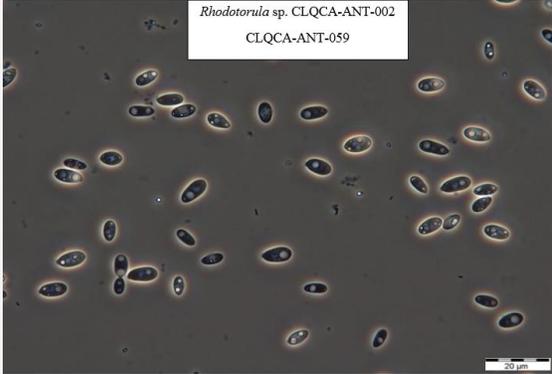
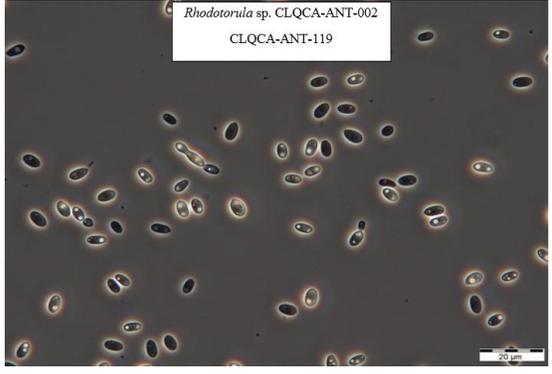
Anexo 2.c Fotografías microscópicas de las levaduras representativas identificadas tomadas después de tres días de incubación a 25°C. Se utilizó un microscopio de contraste de fase, adaptado a una cámara y magnificación con un lente 100X.

<b>CODIGO ASIGNADO</b>	<b>ESPECIE</b>	<b>FOTOGRAFÍA</b>
CLQCA-ANT-082	<i>Debaryomyces hansenii</i>	
CLQCA-ANT-073	<i>Guehomyces pullulans</i>	
CLQCA-ANT-017	<i>Leucosporidium scottii</i>	

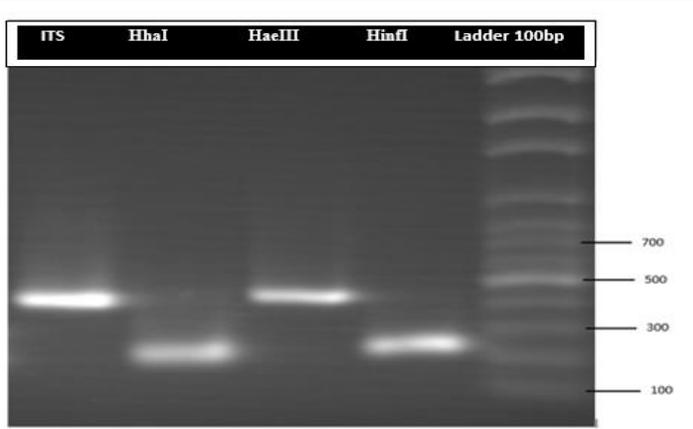
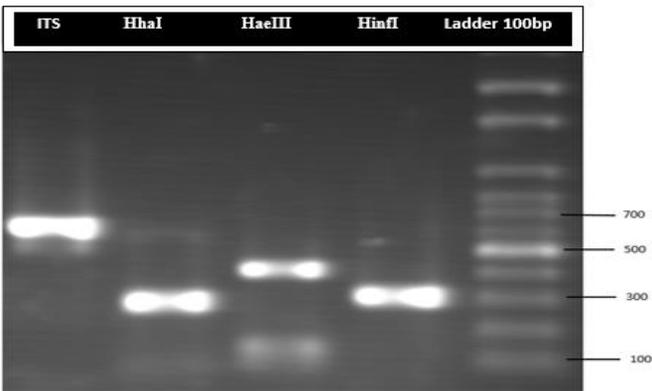
Anexo 2.d Fotografías microscópicas de las levaduras representativas identificadas tomadas después de tres días de incubación a 25°C. Se utilizó un microscopio de contraste de fase, adaptado a una cámara y magnificación con un lente 100X.

<b>CODIGO ASIGNADO</b>	<b>ESPECIE</b>	<b>FOTOGRAFÍA</b>
CLQCA-ANT-077	<i>Rhodotorula laryngis</i>	
CLQCA-ANT-099	<i>Rhodotorula laryngis</i>	
CLQCA-ANT-057	<i>Rhodotorula</i> sp.	

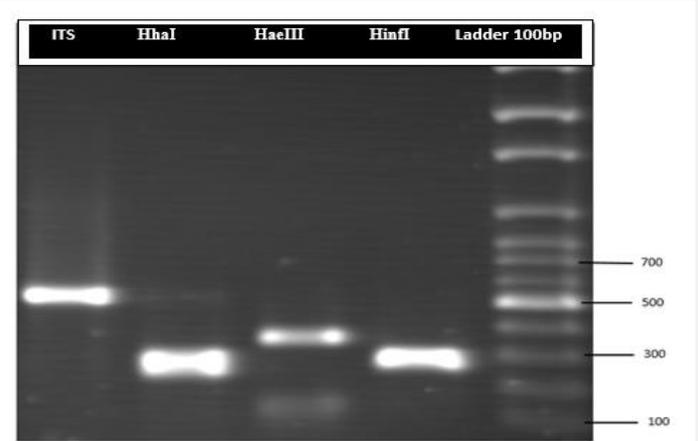
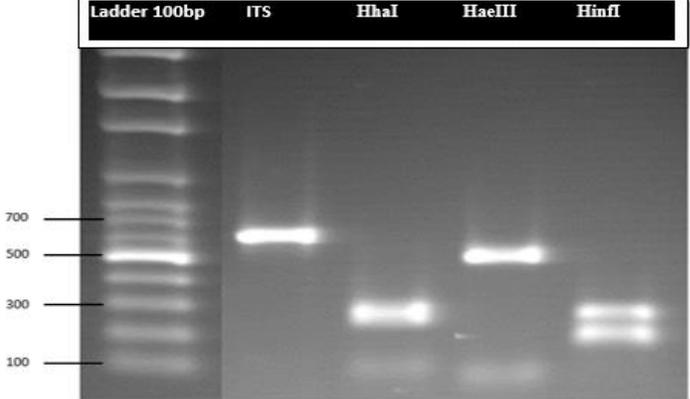
Anexo 2.e Fotografías microscópicas de las levaduras representativas identificadas tomadas después de tres días de incubación a 25°C. Se utilizó un microscopio de contraste de fase, adaptado a una cámara y magnificación con un lente 100X.

<b>CODIGO ASIGNADO</b>	<b>ESPECIE</b>	<b>FOTOGRAFÍA</b>
<i>CLQCA-ANT-059</i>	<i>Rhodotorula</i> sp.	
<i>CLQCA-ANT-119</i>	<i>Rhodotorula</i> sp.	

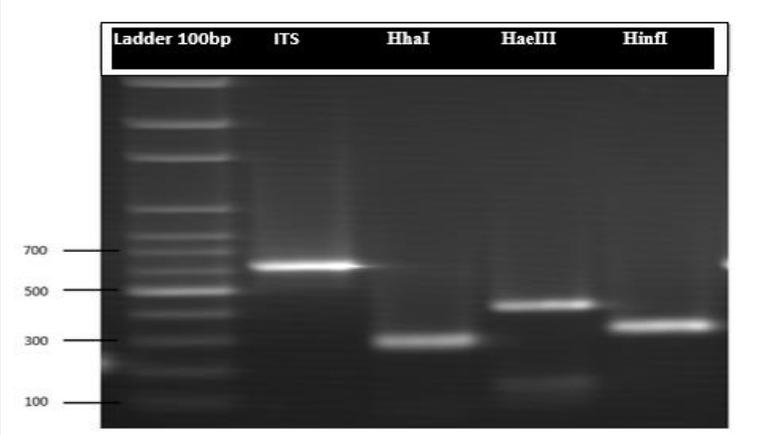
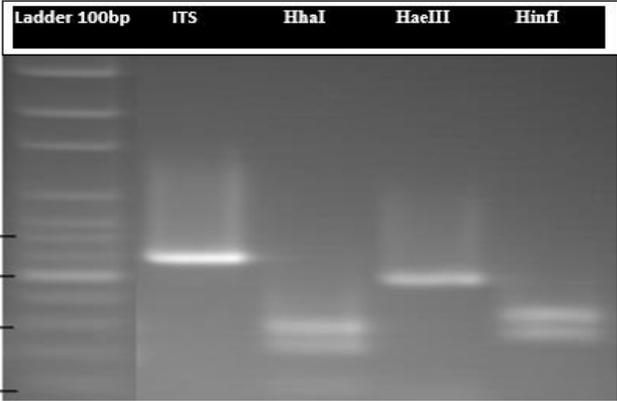
Anexo 3.a Fotografías en gel de agarosa al 0.8% teñido con bromuro de etidio, de los productos de PCR y los fragmentos de restricción del 5.8S-ITS de los aislados representativos de las levaduras identificadas.

CÓDIGO ASIGNADO	ESPECIE/FOTOGRAFÍA
CLQCA-ANT-048	<i>Candida sake</i> 
CLQCA-ANT-072	<i>Candida zeylanoides</i> 

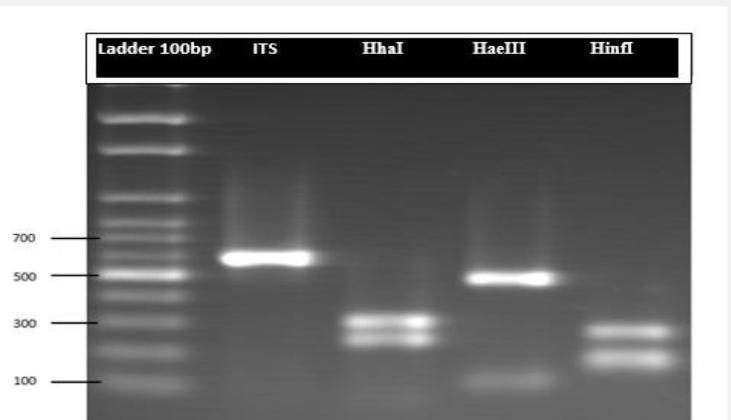
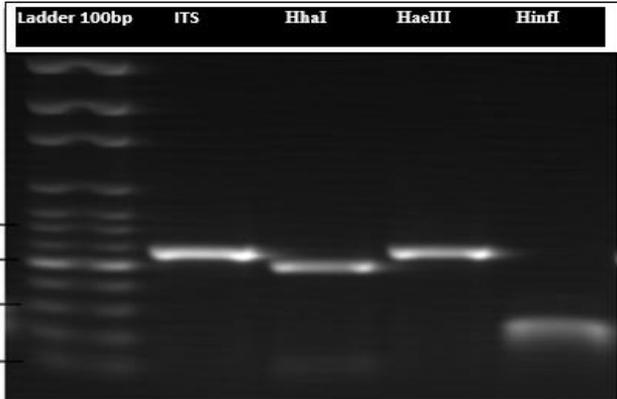
Anexo 3.b Fotografías en gel de agarosa al 0.8% teñido con bromuro de etidio, de los productos de PCR y los fragmentos de restricción del 5.8S-ITS de los aislados representativos de las levaduras identificadas.

CÓDIGO ASIGNADO	ESPECIE/FOTOGRAFÍA
<b>CLQCA-ANT-105</b>	<p data-bbox="836 577 1136 609" style="text-align: center;"><i>Cryptococcus victoriae</i></p> 
<b>CLQCA-ANT-007</b>	<p data-bbox="755 1207 1218 1239" style="text-align: center;"><i>Cystofilobasidium infirmominiatum</i></p> 

Anexo 3.c Fotografías en gel de agarosa al 0.8% teñido con bromuro de etidio, de los productos de PCR y los fragmentos de restricción del 5.8S-ITS de los aislados representativos de las levaduras identificadas.

CÓDIGO ASIGNADO	ESPECIE/FOTOGRAFÍA
CLQCA-ANT-067	<i>Debaryomyces hansenii</i> 
CLQCA-ANT-043	<i>Guehomyces pullulans</i> 

Anexo 3.d Fotografías en gel de agarosa al 0.8% teñido con bromuro de etidio, de los productos de PCR y los fragmentos de restricción del 5.8S-ITS de los aislados representativos de las levaduras identificadas.

CÓDIGO ASIGNADO	ESPECIE/ FOTOGRAFÍA
CLQCA-ANT-003	<i>Leucosporidium scottii</i> 
CLQCA-ANT-099	<i>Rhodotorula laryngis</i> 

Anexo 3.e Fotografías en gel de agarosa al 0.8% teñido con bromuro de etidio, de los productos de PCR y los fragmentos de restricción del 5.8S-ITS de los aislados representativos de las levaduras identificadas.

CÓDIGO ASIGNADO	ESPECIE/FOTOGRAFÍA
CLQCA-ANT-002	<i>Rhodotorula</i> sp.

The image shows an agarose gel electrophoresis result. The gel has five lanes. The first lane is a DNA ladder labeled 'Ladder 100bp' with molecular weight markers at 100, 300, 500, and 700 bp. The second lane is labeled 'ITS' and shows a single band at approximately 500 bp. The third lane is labeled 'HhaI' and shows a band at approximately 500 bp. The fourth lane is labeled 'HaeIII' and shows a band at approximately 500 bp. The fifth lane is labeled 'HinfI' and shows a band at approximately 500 bp and a band at approximately 300 bp.

**Anexo 4.a Resumen del análisis de los productos de PCR, del dominio D1/D2 del segmento 26S del RNA ribosómico, de los aislados de las levaduras identificadas. Se utilizó el software Blastn y el programa Megablast.**

<b>CODIGO ASIGNADO</b>	<b>ESPECIE</b>	<b>AC GenBank</b>	<b>VALOR-e</b>	<b>PORCENTAJE DE IDENTIDAD</b>
CLQCA-ANT-001	<i>Leucosporidium scottii</i>	FN357236.1	0.0	100
CLQCA-ANT-002	<i>Rhodotorula</i> sp.	HE994140.1	0.0	100
CLQCA-ANT-003	<i>Leucosporidium scottii</i>	FN357236.1	0.0	99
CLQCA-ANT-004	<i>Leucosporidium scottii</i>	FN357236.1	0.0	99
CLQCA-ANT-005	<i>Rhodotorula</i> sp.	HE994140.1	0.0	100
CLQCA-ANT-006	<i>Rhodotorula</i> sp.	HE994140.1	0.0	100
CLQCA-ANT-007	<i>Cystofilobasidium infirmominatum</i>	JX188154.1	0.0	99
CLQCA-ANT-009	<i>Leucosporidium scottii</i>	FN357236.1	0.0	100
CLQCA-ANT-010	<i>Leucosporidium scottii</i>	JN544033.1	0.0	100
CLQCA-ANT-011	<i>Leucosporidium scottii</i>	FN357236.1	0.0	99
CLQCA-ANT-012	<i>Rhodotorula</i> sp.	HE994140.1	0.0	100
CLQCA-ANT-014	<i>Rhodotorula</i> sp.	JQ768910.1	0.0	100
CLQCA-ANT-016	<i>Leucosporidium scottii</i>	JN544033.1	0.0	99
CLQCA-ANT-017	<i>Leucosporidium scottii</i>	FN357236.1	0.0	99
CLQCA-ANT-018	<i>Rhodotorula</i> sp.	HE994140.1	0.0	100
CLQCA-ANT-021	<i>Leucosporidium scottii</i>	FN357236.1	0.0	99
CLQCA-ANT-022	<i>Leucosporidium scottii</i>	FN357236.1	0.0	99
CLQCA-ANT-023	<i>Leucosporidium scottii</i>	JQ964224.1	0.0	99
CLQCA-ANT-024	<i>Leucosporidium scottii</i>	FN357236.1	0.0	99
CLQCA-ANT-025	<i>Rhodotorula laryngis</i>	HE994138.1	0.0	99
CLQCA-ANT-026	<i>Leucosporidium scottii</i>	AY646098.1	0.0	99

AC: Código de acceso en GenBank

**Anexo 4.b Resumen del análisis de los productos de PCR, del dominio D1/D2 del segmento 26S del RNA ribosómico, de los aislados de las levaduras identificadas. Se utilizó el software Blastn y el programa Megablast.**

<b>CODIGO ASIGNADO</b>	<b>ESPECIE</b>	<b>AC GenBank</b>	<b>VALOR-e</b>	<b>PORCENTAJE DE IDENTIDAD</b>
CLQCA-ANT-028	<i>Leucosporidium scottii</i>	JX296532.1	0.0	100
CLQCA-ANT-029	<i>Leucosporidium scottii</i>	FN357236.1	0.0	100
CLQCA-ANT-030	<i>Rhodotorula</i> sp.	JQ768911.1	0.0	99
CLQCA-ANT-031	<i>Rhodotorula</i> sp.	HE994140.1	0.0	99
CLQCA-ANT-032	<i>Leucosporidium scottii</i>	FN357236.1	0.0	100
CLQCA-ANT-035	<i>Leucosporidium scottii</i>	JX296532.1	0.0	100
CLQCA-ANT-036	<i>Leucosporidium scottii</i>	JX296532.1	0.0	100
CLQCA-ANT-038	<i>Leucosporidium scottii</i>	JN544033.1	0.0	99
CLQCA-ANT-039	<i>Leucosporidium scottii</i>	FN357236.1	0.0	100
CLQCA-ANT-040	<i>Leucosporidium scottii</i>	AY646098.1	0.0	100
CLQCA-ANT-041	<i>Cryptococcus victoriae</i>	JX188144.1	0.0	100
CLQCA-ANT-042	<i>Leucosporidium scottii</i>	JX296532.1	0.0	100
CLQCA-ANT-043	<i>Guehomyces pullulans</i>	FJ748673.1	0.0	100
CLQCA-ANT-044	<i>Rhodotorula</i> sp.	HE994139.1	0.0	99
CLQCA-ANT-045	<i>Leucosporidium scottii</i>	JN544033.1	0.0	99
CLQCA-ANT-046	<i>Leucosporidium scottii</i>	JX296532.1	0.0	100
CLQCA-ANT-047	<i>Rhodotorula</i> sp.	HE994139.1	0.0	100
CLQCA-ANT-048	<i>Candida sake</i>	KC485459.1	0.0	100
CLQCA-ANT-049	<i>Leucosporidium scottii</i>	FN357236.1	0.0	99
CLQCA-ANT-050	<i>Debaryomyces hansenii</i>	KF214439.1	0.0	99
CLQCA-ANT-051	<i>Rhodotorula</i> sp.	HE994139.1	0.0	100
CLQCA-ANT-052	<i>Leucosporidium scottii</i>	JX296532.1	0.0	100
CLQCA-ANT-053	<i>Rhodotorula</i> sp.	HE994140.1	0.0	99

AC: Código de acceso en GenBank

**Anexo 4.c Resumen del análisis de los productos de PCR, del dominio D1/D2 del segmento 26S del RNA ribosómico, de los aislados de las levaduras identificadas. Se utilizó el software Blastn y el programa Megablast.**

<b>CODIGO ASIGNADO</b>	<b>ESPECIE</b>	<b>AC GenBank</b>	<b>VALOR-e</b>	<b>PORCENTAJE DE IDENTIDAD</b>
CLQCA-ANT-054	<i>Leucosporidium scottii</i>	JX296532.1	0.0	100
CLQCA-ANT-055	<i>Rhodotorula laryngis</i>	HE994137.1	0.0	100
CLQCA-ANT-056	<i>Leucosporidium scottii</i>	FN357236.1	0.0	100
CLQCA-ANT-057	<i>Rhodotorula</i> sp.	HE994140.1	0.0	99
CLQCA-ANT-058	<i>Leucosporidium scottii</i>	JX296532.1	0.0	100
CLQCA-ANT-059	<i>Rhodotorula</i> sp.	HE994139.1	0.0	100
CLQCA-ANT-060	<i>Leucosporidium scottii</i>	AY646098.1	0.0	99
CLQCA-ANT-061	<i>Debaryomyces hansenii</i>	KF273863.1	0.0	100
CLQCA-ANT-062	<i>Leucosporidium scottii</i>	JN544033.1	0.0	100
CLQCA-ANT-064	<i>Leucosporidium scottii</i>	JX296532.1	0.0	100
CLQCA-ANT-065	<i>Leucosporidium scottii</i>	JQ964224.1	0.0	100
CLQCA-ANT-066	<i>Candida sake</i>	KC485459.1	0.0	99
CLQCA-ANT-067	<i>Debaryomyces hansenii</i>	KF214439.1	0.0	100
CLQCA-ANT-068	<i>Leucosporidium scottii</i>	JX296532.1	0.0	100
CLQCA-ANT-069	<i>Debaryomyces hansenii</i>	JX124720.1	0.0	100
CLQCA-ANT-070	<i>Leucosporidium scottii</i>	AY646098.1	0.0	99
CLQCA-ANT-071	<i>Rhodotorula</i> sp.	HE994140.1	0.0	99
CLQCA-ANT-072	<i>Candida zeylanoides</i>	KF633184.1	0.0	100
CLQCA-ANT-073	<i>Guehomyces pullulans</i>	FJ748673.1	0.0	100
CLQCA-ANT-074	<i>Candida sake</i>	KC485459.1	0.0	99
CLQCA-ANT-075	<i>Candida sake</i>	KC485459.1	0.0	100
CLQCA-ANT-076	<i>Leucosporidium scottii</i>	FN357236.1	0.0	99
CLQCA-ANT-077	<i>Rhodotorula laryngis</i>	HE994137.1	0.0	99

AC: Código de acceso en GenBank

**Anexo 4.d Resumen del análisis de los productos de PCR, del dominio D1/D2 del segmento 26S del RNA ribosómico, de los aislados de las levaduras identificadas. Se utilizó el software Blastn y el programa Megablast.**

<b>CODIGO ASIGNADO</b>	<b>ESPECIE</b>	<b>AC GenBank</b>	<b>VALOR-e</b>	<b>PORCENTAJE DE IDENTIDAD</b>
CLQCA-ANT-077	<i>Rhodotorula laryngis</i>	HE994137.1	0.0	99
CLQCA-ANT-078	<i>Leucosporidium scottii</i>	FN357236.1	0.0	99
CLQCA-ANT-079	<i>Rhodotorula</i> sp.	HE994140.1	0.0	100
CLQCA-ANT-080	<i>Leucosporidium scottii</i>	FN357236.1	0.0	99
CLQCA-ANT-081	<i>Rhodotorula</i> sp.	HE994140.1	0.0	100
CLQCA-ANT-082	<i>Debaryomyces hansenii</i>	KC442271.1	0.0	99
CLQCA-ANT-083	<i>Leucosporidium scottii</i>	JX296532.1	0.0	100
CLQCA-ANT-084	<i>Leucosporidium scottii</i>	AY646098.1	0.0	100
CLQCA-ANT-086	<i>Leucosporidium scottii</i>	FN357236.1	0.0	100
CLQCA-ANT-087	<i>Leucosporidium scottii</i>	FN357236.1	0.0	100
CLQCA-ANT-088	<i>Leucosporidium scottii</i>	AY646098.1	0.0	99
CLQCA-ANT-089	<i>Leucosporidium scottii</i>	JX296532.1	0.0	99
CLQCA-ANT-090	<i>Rhodotorula</i> sp.	HE994140.1	0.0	100
CLQCA-ANT-091	<i>Leucosporidium scottii</i>	FN357236.1	0.0	100
CLQCA-ANT-092	<i>Rhodotorula</i> sp.	HE994140.1	0.0	100
CLQCA-ANT-093	<i>Rhodotorula laryngis</i>	HE994137.1	0.0	99
CLQCA-ANT-094	<i>Leucosporidium scottii</i>	FN357236.1	0.0	99
CLQCA-ANT-096	<i>Leucosporidium scottii</i>	JN544033.1	0.0	99
CLQCA-ANT-097	<i>Cryptococcus victoriae</i>	JX188144.1	0.0	99
CLQCA-ANT-098	<i>Leucosporidium scottii</i>	JX296532.1	0.0	99
CLQCA-ANT-099	<i>Rhodotorula laryngis</i>	HE994138.1	0.0	99
CLQCA-ANT-100	<i>Leucosporidium scottii</i>	AY646098.1	0.0	100
CLQCA-ANT-102	<i>Rhodotorula</i> sp.	HE994140.1	0.0	100

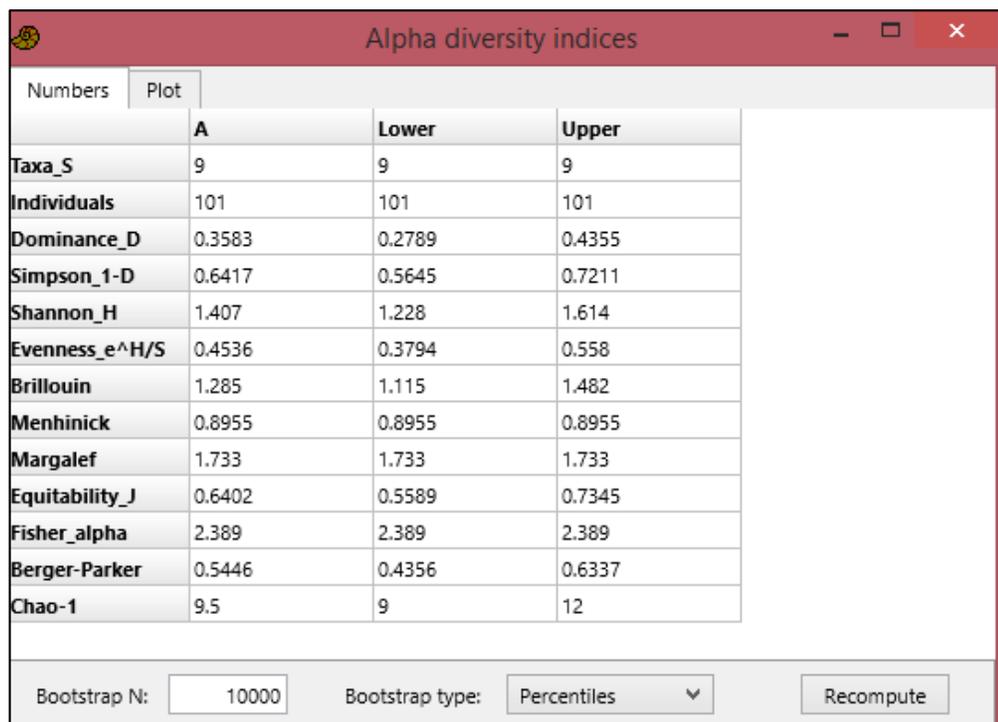
AC: Código de acceso en GenBank

**Anexo 4.e Resumen del análisis de los productos de PCR, del dominio D1/D2 del segmento 26S del RNA ribosómico, de los aislados de las levaduras identificadas. Se utilizó el software Blastn y el programa Megablast.**

<b>CODIGO ASIGNADO</b>	<b>ESPECIE</b>	<b>AC GenBank</b>	<b>VALOR-e</b>	<b>PORCENTAJE DE IDENTIDAD</b>
CLQCA-ANT-103	<i>Leucosporidium scottii</i>	JX296532.1	0.0	100
CLQCA-ANT-104	<i>Rhodotorula</i> sp.	HE994140.1	0.0	100
CLQCA-ANT-105	<i>Cryptococcus victoriae</i>	KC442266.1	0.0	99
CLQCA-ANT-107	<i>Leucosporidium scottii</i>	AY646098.1	0.0	99
CLQCA-ANT-109	<i>Leucosporidium scottii</i>	AY646098.1	0.0	99
CLQCA-ANT-116	<i>Candida sake</i>	KC485459.1	0.0	100
CLQCA-ANT-117	<i>Leucosporidium scottii</i>	AY646098.1	0.0	99
CLQCA-ANT-118	<i>Rhodotorula</i> sp.	HE994140.1	0.0	100
CLQCA-ANT-119	<i>Rhodotorula</i> sp.	HE994140.1	0.0	100
CLQCA-ANT-120	<i>Leucosporidium scottii</i>	AY646098.1	0.0	99
CLQCA-ANT-121	<i>Leucosporidium scottii</i>	AY646098.1	0.0	99
CLQCA-ANT-122	<i>Debaryomyces hansenii</i>	KC442271.1	0.0	99

AC: Código de acceso en GenBank

**Anexo 5. Tabla de validación de los índices de diversidad con un 95% de confianza con un bootstrap calculado en base a 10000 iteraciones utilizando el programa PAST.**



The screenshot shows a software window titled "Alpha diversity indices" with a red header bar. The window contains a table with columns for "Numbers", "A", "Lower", and "Upper". The "Numbers" column has a sub-tab labeled "Plot". The table lists 13 diversity indices with their corresponding values and bootstrap confidence intervals. At the bottom of the window, there are input fields for "Bootstrap N:" (set to 10000) and "Bootstrap type:" (set to Percentiles), along with a "Recompute" button.

	A	Lower	Upper
Taxa_S	9	9	9
Individuals	101	101	101
Dominance_D	0.3583	0.2789	0.4355
Simpson_1-D	0.6417	0.5645	0.7211
Shannon_H	1.407	1.228	1.614
Evenness_e^H/S	0.4536	0.3794	0.558
Brillouin	1.285	1.115	1.482
Menhinick	0.8955	0.8955	0.8955
Margalef	1.733	1.733	1.733
Equitability_J	0.6402	0.5589	0.7345
Fisher_alpha	2.389	2.389	2.389
Berger-Parker	0.5446	0.4356	0.6337
Chao-1	9.5	9	12

Bootstrap N: 10000    Bootstrap type: Percentiles    Recompute