

UCH-FC
D. Ambiental
L925
C. 1

Seminario de Título

Entregado a la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile para optar
al Título de Bióloga con mención en Medio Ambiente

Estudio Microbiológico-Ambiental de Tolerancia de Levaduras a Metales Pesados.

Carla Paola Lozano Moraga



Directores de Tesis:
Dr. Víctor Cifuentes G.
Dr. Rubén León B.
Departamento de Cs. Ecológicas
Facultad de Ciencias
Universidad de Chile

Santiago de Chile, Noviembre de 2004



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias que el Seminario de Título presentado por la candidata:

CARLA PAOLA LOZANO MORAGA

ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación de Seminario de Título, como requisito parcial para optar al título de Biólogo con mención en Medio Ambiente, en el Exámen de defensa de Seminario de Título rendido el día 16 de Septiembre de 2004.

Directores de Memoria de Título

Dr. Víctor Cifuentes

Dr. Rubén León

Una firma manuscrita en tinta negra, que parece ser la de Víctor Cifuentes, sobre una línea horizontal. Debajo de esta línea hay otra línea horizontal vacía.

Comisión de Evaluación de Seminario de Título

Dra. Margarita Carú
Presidente Comisión

Dr. Italo Serey

Dr. Germán Hermosilla

Tres firmas manuscritas en tinta negra, correspondientes a Margarita Carú, Italo Serey y Germán Hermosilla, cada una sobre una línea horizontal. Debajo de la última línea hay otra línea horizontal vacía.

A mis Padres, Juvencio y Mónica

A mi familia y amigos

Estudio Microbiológico-Ambiental de Tolerancia de Levaduras a Metales Pesados

Carla Lozano Moraga*

* Departamento de Ciencias Ecológicas, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

*Durante las últimas décadas, actividades humanas tales como la minería, fundición y refinación de minerales, la industria manufacturera y el uso intensivo de fungicidas cúpricos, entre otros, han contribuido a aumentar la contaminación por la liberación de desechos tóxicos, tal como metales pesados, impactando negativamente a los ecosistemas. Debido a esto, las investigaciones se han concentrado en el estudio de la captura microbiana de metales tóxicos en ambientes contaminados y la potencial utilización de los microorganismos en biorremediación. Así, la biorremediación promete ser una importante herramienta para intentar mitigar la contaminación ambiental. En este estudio, se aislaron levaduras de un ecosistema perturbado con cobre de origen antrópico y de un ecosistema control que no presenta esta perturbación, ellas fueron sometidas a análisis para determinar su tolerancia a metales pesados tales como cobre y cadmio. Se observó que la mayoría de las levaduras aisladas de ambos ecosistemas pertenecen al género *Cryptococcus*, presentando algunas de ellas características de sensibilidad y/o tolerancia frente a estos metales. Al comparar las levaduras de ambos ecosistemas se observó que las mayores diferencias corresponden a las respuestas con Cu^{+2} , donde claramente se vio que los aislados del ecosistema control son altamente sensibles respecto a las del ecosistema perturbado, con algunas excepciones. Situación distinta ocurre con Cd^{+2} , en donde las levaduras de ambos ecosistemas presentan alta tolerancia a este metal. La identificación y diferenciación de las especies de levaduras aisladas se realizó mediante análisis molecular por PCR y secuenciación de las regiones no codificantes del rDNA correspondientes a los transcritos espaciadores internos 1 y 2 (ITS1 e ITS2, respectivamente) y el gen que codifica al RNA ribosómico 5.8S.*

Palabras Claves: Biorremediación, Metales Pesados, Levadura, ITS.

*During the last decades, human activities as mining, foundry and refinement of minerals, the industry manufacturer, the intensive use of cupric fungicides, others have contributed to the contamination by the liberation of toxic waste as the heavy metals, negatively affecting the ecosystems. Due to this, the investigations have concentrated on the study of the microbial capture of toxic metals in polluted environment and the potential use of the microorganisms in bioremediation. The bioremediation promises to be an important tool in trying to mitigate the environmental contamination. In this study yeasts were isolated from ecosystem perturbed with copper of antropic origin and from control ecosystem without this interference, to be subjected to tolerance studies to heavy metals as copper and cadmium. It was observed that most of yeasts isolated from both ecosystems belong to the genus *Cryptococcus*, some of them presenting characteristic of sensibility and/or tolerance to these metals. When yeasts from the ecosystems were compared the biggest*

differences in the tolerance to Cu^{+2} was observed, where yeasts from the control ecosystem are more sensitive than yeasts from the perturbed ecosystem. A different situation was observed with Cd^{+2} where the yeasts from both ecosystems present high tolerance. The identification and differentiation of isolated yeasts was carried out by means of molecular analysis by PCR and sequencing of the non coding regions of the rDNA corresponding to the internal transcribed spacer 1 and 2 (ITS1 and ITS2, respectively) and the coding structural gene 5.8S.

Key Words: Bioremediation, Heavy Metals, Yeast, ITS.

Introducción

La liberación de desechos tóxicos al ambiente, como consecuencia de las diferentes actividades humanas, ha sido foco de una progresiva preocupación en las últimas décadas. La introducción de compuestos químicos xenobióticos y su disposición en diferentes ambientes puede disminuir la capacidad de autolimpieza o autoreciclamiento de los ecosistemas receptores, dando como resultado la acumulación de contaminantes a niveles problemáticos e incluso perjudiciales para cada uno de los componentes del ecosistema. Si bien la liberación y dispersión de metales pesados al medio ambiente ocurre en forma natural, por las explosiones volcánicas y la disolución por las aguas lluvias, los mayores índices de liberación de metales pesados al ambiente provienen como producto de desecho de las actividades relacionadas con la industria de la curtiembre, galvanoplastia y la industria minera, las que liberan grandes cantidades de metales como, por ejemplo, cadmio, cobalto, cobre, cromo, entre otros (Wilhelmi and Duncan, 1995). Este tipo de contaminantes son descargados en la atmósfera y en los ambientes acuáticos y

terrestres en forma de partículas de polvo o vapores, permaneciendo largo tiempo en estas fases del planeta pudiendo alcanzar concentraciones elevadas, especialmente cerca del sitio de descarga, pasando a ser sustancias recalcitrantes. Los efectos de los metales sobre el funcionamiento de los ecosistemas varía considerablemente debido a que son intrínsecamente tóxicos y pueden afectar deletéreamente a los microorganismos, animales, cosechas agrícolas y por último, a los humanos. Debido a ello, se hace necesario desarrollar mecanismos y estrategias que permitan acelerar la eliminación de los contaminantes para remediar los problemas existentes y, a la vez, disminuir el impacto futuro de eventos de esta naturaleza, mediante el control de su ingreso al medio ambiente.

Los metales pesados forman un grupo cercano a 40 elementos de la tabla periódica que tienen una densidad mayor o igual a 5 g/cm^3 . Elementos tales como, Na, K, Mg, Ca, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn y Mo se destacan por su implicancia en la fisiología de los seres vivos, ya que son esenciales para los organismos. Se ha reportado que también tienen efectos tóxicos sobre las células, principalmente como

resultado de su capacidad para alterar o desnaturalizar a las proteínas (Cañizares-Villanueva, 2000).

Hasta ahora, la descontaminación y recuperación de metales pesados desde agua y suelo se ha realizado a través de métodos físico-químicos que son de alto costo y baja eficiencia, especialmente cuando la concentración de los metales es baja, produciendo desechos que hacen igualmente inútiles a los suelos y aguas tratadas. Por otro lado, la acumulación y recalcitrancia de los metales pesados en cuerpos de agua implica que a través de procesos naturales como la biomagnificación, su concentración puede llegar a niveles tóxicos. Además, puede facilitar la entrada de estos polutantes en las mallas tróficas, y finalmente en la dieta humana (Atlas and Bartha, 1993), produciendo serios daños ecológicos tanto en especies que son claves en estas estructuras tróficas como en los procesos ecosistémicos.

El impacto de los metales pesados en el ambiente y su acumulación a través de la cadena trófica ha promovido la investigación tendiente a desarrollar sistemas alternativos, eficientes y de bajo costo para la purificación tanto de aguas como de suelos contaminados. La utilización de sistemas biológicos, para la eliminación eficiente de metales pesados, es una alternativa con un gran potencial para la optimización de este proceso, mediante el desarrollo de estrategias que implican la utilización de plantas (incluyendo algas) y microorganismos (hongos y bacterias) que ayuden a disminuir su concentración (Cunningham *et al.*, 1995; Kortba *et al.*, 1999).

La fitorremediación (utilización de plantas verdes para la remoción tanto de contaminantes orgánicos como inorgánicos) ha mostrado tener una alta capacidad de absorción a través de las raíces, las primeras estructuras que entran en contacto con los metales presentes en el suelo. Sin embargo, dicho mecanismo es más lento que los procesos convencionales hasta ahora utilizados y puede ser considerado como un proceso de remediación a largo plazo (Cunningham *et al.*, 1995). Debido a esto, las comunidades microbianas han sido una opción importante en la biorremediación de suelos contaminados. De este modo, se han utilizado microorganismos en la limpieza de hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAHs) y bifenilos policlorados (PCBs), y también en la limpieza de contaminantes metálicos y radioactivos, siendo estos últimos los componentes más recalcitrantes de los desechos peligrosos (Eweis *et al.*, 1998). De esta manera, los microorganismos pueden constituirse en poderosos bioabsorbentes en procesos de biorremediación de suelos y agua contaminados por metales tóxicos y radionucléotidos (Stoll and Duncan, 1996; Kotrba *et al.*, 1999). Adicionalmente, también se han utilizado otros sistemas biológicos tales como células vivas, biomasa sin vida y biopolímeros como bioabsorbentes, lo que ha resultado en la bioprecipitación de metales pesados o su transformación en productos menos tóxicos (Kotrba *et al.*, 1999).

Aunque los conceptos básicos y características de la acumulación de metales son comunes en muchos grupos microbianos, los hongos poseen atributos únicos que se ven

reflejados en su diversidad morfológica y fisiológica. La mayoría de los hongos presentan una forma de crecimiento filamentosa por medio de hifas, las cuales aumentan la eficiencia de colonización de sustratos. Las hifas exhiben crecimiento apical y pueden producir ramificaciones laterales o aéreas, por lo que las distintas formas celulares pueden tener diferentes capacidades de captación y sensibilidades hacia los metales pesados potencialmente tóxicos. Dentro de los hongos, las levaduras son un grupo particular que exhiben un modo de crecimiento predominantemente unicelular, reproduciéndose vegetativamente por gemación o fisión. No obstante, algunas especies de levadura pueden producir micelio o pseudomicelio.

Los hongos, incluyendo las levaduras, han recibido especial atención en relación a la biosorción de metales, particularmente porque la biomasa fúngica se origina como un subproducto de diferentes fermentaciones industriales (Ehrlich *et al.*, 1996). Adicionalmente, su relativamente rápida tasa de crecimiento, facilidad de cultivo y amplia actividad metabólica les otorga un considerable potencial en el tratamiento de desechos tóxicos (Wainwright, 1992). La captación de metales por hongos vivos se puede dividir en dos fases: La 1° fase consiste en la unión de metales a las paredes celulares y otras superficies externas independiente del metabolismo. La 2° fase es el paso del metal al medio intracelular a través de la membrana celular, un proceso que sería dependiente de energía (Ehrlich *et al.*, 1996). La acumulación independiente del metabolismo se refiere a la adsorción y absorción, la cual

incluye intercambio de iones, pero en general, se refiere a reacciones fisicoquímicas que ocurren entre especies metálicas o radionucleotídicas y componentes celulares. En la 2° fase, acumulación dependiente del metabolismo, los iones son transportados al interior de las células a través de la membrana celular mediante proteínas transportadoras específicas para cada metal.

Adicionalmente, los hongos tienen la capacidad de precipitar metales alrededor de las células como resultado de procesos metabólicos y pueden sintetizar proteínas que unen metales intracelularmente.

Una vez dentro de la célula, los iones metálicos pueden ser compartimentados y/o convertidos a formas más inocuas por precipitación o formación de complejos. Se ha descrito, que la mayoría de los metales tales como Co^{+2} , Zn^{+2} , Mg^{+2} , Mn^{+2} y K^+ son localizados en la vacuola. Ahí, la membrana vacuolar posee un sistema de transporte para realizar la transferencia interna de iones metálicos, la que ocurriría mediante un protón antiporter. En *Saccharomyces cerevisiae* se ha descrito una respuesta frente a la exposición de metales a través de la inducción intracelular de proteínas que unen metales. Estas proteínas, llamadas metalotioneínas, se caracterizan por ser de bajo peso molecular y ricas en cisteína, son codificadas por una familia de genes y poseen un papel en la detoxificación, almacenaje y regulación de iones metálicos intracelular (Cobbett *et al.*, 2002).

Las plantas también han desarrollado un sistema altamente eficiente y económico

para la detoxificación y homeostasis de metales pesados tóxicos, en el cual, una vez que ha entrado el ion metálico al citoplasma, activa la enzima constitutiva fitoquelatina sintetasa, la cual requiere además, glutatión (GSH) para inducir la síntesis de péptidos llamados fitoquelatinas. Estas últimas, tienen un largo de cadena variable, son ricas en cisteína para quelar e inactivar el metal (Zenk, 1996) y, a diferencia de las metalotioneínas, son sintetizadas enzimáticamente. El complejo fitoquelatina-metal es luego transportado activamente desde el citoplasma a la vacuola. Una vez dentro del organelo el metal es liberado del complejo y el péptido libre del metal es degradado, recuperándose el sulfuro reducido presente en la cisteína. Por otra parte, se ha descrito la presencia de fitoquelatinas en la levadura *Schizosaccharomyces pombe* y en el hongo *Neurospora crassa* expuestas a Cd^{+2} (Zenk, 1996). Además, los estudios genéticos han confirmado que mutantes deficientes en GSH de *S. pombe* y en la planta *A. thaliana* son deficientes en fitoquelatinas e hipersensibles a Cd^{+2} (Cobbett *et al.*, 2002).

Las levaduras *S. cerevisiae* y *S. pombe* han sido utilizadas como modelos en los análisis de los efectos tóxicos de metales tales como Cu^{+2} y Cd^{+2} . Debido a que algunas variedades de estos organismos presentan una resistencia natural a dichos elementos, se han realizado pruebas, a pequeña escala, para determinar su capacidad de acumulación de metales pesados. De esta manera, se podría proyectar su uso potencial en la recuperación de estos metales (Wilhelmi and Duncan, 1995; Howlett and Avery, 1997; Clemens *et al.*, 1999).

Debido a la magnitud actual del crecimiento industrial, con sus consecuentes desechos de distintas especies químicas y/o biológicas, se hace urgente una búsqueda y caracterización de potenciales microorganismos capaces de degradar, transformar o mineralizar tales desechos, incrementando la eficiencia del proceso.

El objetivo de esta memoria es estudiar la tolerancia a metales pesados (cobre y cadmio) de levaduras aisladas de un ecosistema perturbado con cobre de origen antrópico y de un ecosistema control que no presenta esta perturbación. Adicionalmente, debido a la escasa información existente, sobre la diversidad microbiana de suelos, este estudio tiene como objetivo complementario estudiar la biodiversidad de levaduras existente en suelos contaminados con metales pesados. Para ello se realizará una identificación mediante análisis molecular utilizando PCR y secuenciación de las regiones no codificantes ITS1 e ITS2, y el gen que codifica el RNA ribosomal 5.8S, el cual se encuentra flanqueado por estas regiones. La región ITS1 se encuentra entre los genes ribosomales 18S y 5.8S y la región ITS2 entre los genes 5.8S y 28S (Fig.1). Para el análisis molecular se utilizaron partidores universales específicos de hongos (Wahyuningsih *et al.*, 2000; Chang *et al.*, 2001).

El cluster formado por los genes nucleares del rRNA ha sido ampliamente utilizado en la literatura por proveer una base molecular de establecimiento de relaciones filogenéticas debido a que evolucionan de manera concertada y es bastante conservado

Refinería de cobre de Ventanas a los sitios de muestreo, en esta localidad, fue de 12 Km, ubicándose esta al sur-oeste de la zona de trabajo.

Las muestras de suelo de ambos ecosistemas, aprox. 5g cada una, fueron tomadas superficialmente y depositadas en tubos de vidrio estériles siendo transportadas al laboratorio a 4°C para su posterior análisis. En el laboratorio las muestras fueron rápidamente manipuladas bajo las máximas condiciones de asepsia.

Aislamiento de levaduras de muestras ambientales:

Las muestras de suelo provenientes de ambos ecosistemas fueron depositadas en tubos Eppendorf con 500 µl de medio de cultivo YM (1% glucosa; 0,3% extracto de malta; 0,3% extracto de levadura; 0,5% de peptona) (An *et al.*, 1989). Luego, se tomó alícuotas de 100 µl de la mezcla, se inoculó matraces con 10 ml de medio YM y finalmente se incubó a 22°C durante 24-48 horas. Para disminuir el crecimiento de bacterias presentes en las muestras, se suplementó los medios con los antibióticos ampicilina y tetraciclina a una concentración final de 100 y 15 µg/ml, respectivamente. Luego, se extrajo alícuotas de 100 µl y se sembró en placas de Petri con medio YM sólido, seleccionando las colonias de levaduras.

Para obtener un stock se tomaron las colonias de levaduras desarrolladas en dichas placas y se sembraron nuevamente en medio YM líquido con el fin de obtener un cultivo

libre de bacterias corroborándolo mediante observaciones en un microscopio óptico Phillips 300.

Las levaduras aisladas de ambos ecosistemas fueron mantenidas en placas Petri con medio YM sólido a 4°C hasta su utilización en pruebas de tolerancia a metales pesados.

Cada uno de los aislados se identificó preliminarmente mediante el sistema comercial de identificación de levaduras API ID32C (bioMérieux SA, Marcy-l'Etoile, France), el cual se compone de tests bioquímicos estandarizados y miniaturizados. La eficacia de este sistema para identificar aislados de levaduras comunes y raras ha sido descrito por Ramani *et al.*, 1998. Este sistema cuenta con una galería plástica desechable constituida por 32 pocillos, cada pocillo tiene un sustrato carbonado deshidratado. Se coloca la levadura a probar en una suspensión de un medio sintético semisólido. Después de 24-48 horas de incubación, se lee el crecimiento en cada pocillo de manera visual o mediante programas computacionales de identificación correspondientes.

Determinación de tolerancia a metales pesados:

Para determinar la tolerancia a metales pesados, se tomó una colonia de cada una de las cepas aisladas y se crecieron en forma individual en matraces con 10 ml de medio YM líquido hasta fase exponencial tardía. La cuantificación se realizó midiendo la absorbancia a una longitud de onda de 560 nm. Luego, se realizó un

recuento de número de células totales por ml utilizando una cámara de Neubauer, para lo cual se tomó una alícuota de 10 µl del cultivo presente en el matraz. Posteriormente, se realizó diluciones de la muestra hasta obtener $3-5 \times 10^3$ células por ml, y luego se sembró 100 µl en placas de Petri con medio YM sólido suplementado con distintas concentraciones de cloruro de cobre (stock 100 mM) o cloruro de cadmio (stock 100 mM) con el fin de obtener concentraciones finales de 25, 50, 75, 100, 150 y 200 µM de dichos metales, las cuales fueron en aumento o disminución según la tolerancia de la cepa de levadura en estudio. Las placas fueron incubadas por 24-48 horas a 22°C. Finalmente, se contaron las colonias crecidas en cada placa de distintas concentraciones de los metales pesados, definiendo de esta manera los rangos de tolerancia de cada una de las cepas.

Se utilizó la cepa IM30.29.1 de *S. cerevisiae* como control de tolerancia a metales pesados, debido a que ha sido descrito que algunas variedades de esta levadura son altamente tolerante a Cu^{+2} y Cd^{+2} y otros metales (Howlett and Avery, 1997; Clemens *et al.*, 1999). Esta cepa fue cedida gentilmente por el Dr. Claudio Martínez (Univ. de Santiago de Chile).

Extracción de DNA genómico de los aislados:

Las cepas de levaduras fueron crecidas en 5 ml de medio YM líquido a 22°C hasta saturación. Las células se obtuvieron mediante

centrifugación a 7.000 rpm, luego se resuspendieron en 500 µl de KCl 0,8 M y se agregó 100 µl de glucanex a una concentración final de 5 mg/ml. La mezcla se incubó durante 2 horas a 37°C, se centrifugó a 4000 rpm por 1 min para precipitar los protoplastos, los cuales se resuspendieron en 450 µl de solución II (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 20 mM EDTA). Se agregó 50 µl de SDS 10 % y se incubó a 65°C durante 30 min. Posteriormente, se agregó 20 µl de proteinasa K a una concentración de 20 mg/ml, dejando la mezcla a 55°C durante 1 hora. Se realizaron tres extracciones con un volumen de fenol saturado en tampón Tris-HCl pH 7,4, dos veces con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y una vez con cloroformo:alcohol isoamílico (24:1), cada vez mezclando suavemente y centrifugando a 5.000 rpm por 2 min para separar las fases. El DNA se precipitó con dos volúmenes de etanol absoluto frío (-20°C), el ovillo se lavó con etanol al 70 % y finalmente se resuspendió en 50 µl de agua bidestilada estéril. El DNA fue analizado por electroforesis en geles de agarosa al 0,7 % en presencia de bromuro de etidio a una concentración final de 0,5 µg/ml (Sambrook *et al.*, 1989).

PCR:

Las reacciones de amplificación se realizaron en un volumen final de 25 µl que contenía buffer de PCR 1X (Tris-HCl 200 mM, KCl 500 mM, pH 8,4), 2 mM de MgCl_2 , 10 mM de dNTP, 25 µM de cada partidor, 10 ng de DNA molde y 2U de Taq polimerasa. El PCR se llevó a cabo en un termociclador PCR System 2700

(Applied Biosystems) con los siguientes parámetros: denaturación inicial a 95°C por 3 min, 35 ciclos de denaturación a 94°C por 30 seg, temperatura de alineamiento a 55°C por 30 seg y una extensión a 72°C por 3 min; para una extensión final se dejó a 72°C por 10 min. Las muestras fueron enfriadas a 4°C y almacenadas a -20°C hasta su utilización. Para amplificar las zonas intergénicas (ITS 1 e ITS 2) del rDNA de los aislados se utilizaron los siguientes partidores universales: partidor directo universal ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'), el cual se ubica en la región 3' del gen rRNA 18S y, partidor reverso universal ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'), que se ubica en la región 5' del gen rRNA 28S (Ver Fig. 1). El uso de ambos partidores amplifica la región ITS1-5.8S rRNA-ITS2 de hongos.

Como control positivo y negativo se utilizó 10 ng de DNA de *Xanthophyllomyces dendrorhous* cepa UCD 67-385 y agua bidestilada respectivamente.

Extracción de DNA desde geles de agarosa:

Para extraer DNA desde geles de agarosa se utilizó el kit GeneClean II (Bio 101, Carlsbad, CA, USA). Los fragmentos de DNA se separaron por electroforesis en un gel de agarosa al 0.7 % en tampón TAE. Las bandas fueron visualizadas en un transiluminador de luz ultravioleta y recortadas con bisturí. Los bloques de agarosa conteniendo DNA fueron depositados en tubos Eppendorf y mantenidos en suspensión con 800 µl de NaI 6 M en un baño a 55°C hasta que la agarosa se fundiera

completamente. Se añadió a cada tubo 10 µl de resina Glassmilk (silica) y se incubó durante 10 min a temperatura ambiente para luego centrifugar en una microcentrifuga Eppendorf durante 1 min a 14.000 rpm. Se eliminó el sobrenadante y el pellet se lavó 3 veces con 500 µl de solución New Wash (Tris-HCl pH 7.5 10 mM, NaCl 50 mM, EDTA 2.5 mM, Etanol 50% v/v) centrifugando por 1 min a 14.000 rpm cada vez. Finalmente, la resina fue resuspendida en 15 µl de agua ultrapura e incubado por 10 min a 55°C para disolver el DNA. Se centrifugó por 1 min a 14.000 rpm, se recuperó el sobrenadante que contiene el DNA y se depositó en un tubo Eppendorf limpio y estéril. El DNA obtenido se cuantificó mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.7 % utilizando el programa Kodak Digital Science 1D Análisis Software.

PCR de secuenciación y secuenciación:

Las reacciones de secuenciación se realizaron en un volumen final de 10 µl el cual contenía 8 µl del kit Big Dye™ Terminator v3.0 (Applied Biosystems), 0.5 µl de partidor a una concentración final de 10 pmol, 40 ng de DNA molde y se completó con agua bidestilada. Los productos de PCR fueron precipitados con isopropanol al 70 % mantenidos en oscuridad durante 20 min y centrifugados por 25 min a 14.000 rpm. Se eliminó el sobrenadante, se secó a 37°C y se agregó a cada muestra de DNA 10 µl de formamida HiDi (Applied Biosystems).

Los productos de la reacción se secuenciaron automáticamente en un secuenciador de DNA Genetic Analyser Avant, Applied Biosystems. Las secuencias fueron editadas con el programa

Sequencing analysis v.3.7 de Applied Biosystems.

Para la construcción del cladograma se realizó un alineamiento de secuencias múltiples a través del programa Pileup de Wisconsin package v.10.0, Genetics Computer Group (GCG), Madison, Wisconsin y el Software PAUP*, penalizando gaps. Se usó como grupo raíz la levadura basidiomicete *Xanthophyllomyces dendrorhous* cepa UCD 67-385.

Análisis estadístico:

Para la determinación de tolerancia frente a cobre de los aislados de levaduras de ambos ecosistemas, contaminado y control, se aplicó una regresión especificada por el usuario con el programa Statistica v.6.0, excepto para la cepa 13ch, proveniente del ecosistema contaminado, y *S. cerevisiae* (control), a las cuales se les aplicó el test no paramétrico correlación de Spearman.

Respecto al cadmio, a todos los aislados de levaduras incluyendo *S. cerevisiae* se les aplicó el test no paramétrico correlación de Spearman.

Resultados

Levaduras aisladas de las muestras ambientales correspondientes a los ecosistemas contaminado y control

A partir de 22 muestras distintas de suelos se obtuvieron levaduras ambientales en 19 de ellas. De éstas, 11 pertenecen al ecosistema contaminado con cobre y 8 pertenecen al

ecosistema control. Los aislados que se sometieron a estudios de tolerancia a metales pesados fueron 10 y se nombraron de la siguiente manera: cepa 1, cepa 2, cepa 4, cepa 5, cepa 13ch, cepa 13g, cepa 15, cepa 16, cepa 17 y cepa 20. Las cepas 1, 2, 4, 5, 13ch y 13g pertenecen a las muestras recolectadas en el ecosistema contaminado con cobre y las cepas 15, 16, 17 y 20 corresponden al ecosistema control. Estas cepas se identificaron preliminarmente mediante el sistema API ID32C (Tabla 1). Como se observa en la tabla 1, 8 de 10 aislados de levaduras corresponden al género *Cryptococcus* y los dos aislados restantes corresponden a los géneros *Trichosporon* y *Candida*. El sistema solo identificó las cepas 16 y 17 a nivel de género. En adelante se utilizarán los nombres de las especies aisladas de los ecosistemas en estudio arrojados por el análisis de secuenciación. Solo para efectos de comparación se nombrarán las especies identificadas por el sistema API ID32C.

Determinación de tolerancia a metales pesados

Para la determinación de los niveles de tolerancia a metales pesados se sembraron las muestras de levaduras en placas de Petri con medio YM sólido suplementadas con diferentes concentraciones de metales, como se describió en materiales y métodos. Luego de incubar las placas a 22°C durante 24-48 horas, se procedió a cuantificar las colonias que crecieron en cada placa, determinando de esta manera los rangos

de tolerancia de cada una de las cepas (Tabla 2).

Tolerancia a Cobre

Los resultados de los experimentos de tolerancia a cobre realizado con las levaduras provenientes del ecosistema contaminado se muestran en la figura 2. Estos han sido presentados como gráficos de dispersión de datos de sobrevivencia (porcentaje) versus concentración de cobre (μM) en el medio.

La viabilidad celular fue calculada como porcentaje de la reducción de UFC en cada placa con distintas concentraciones del metal comparado con el control (sin presencia de metal).

Como se puede observar, la mayor parte de los gráficos se ajustan casi perfectamente a una curva de tendencia parabólica en la cual los puntos máximos de sobrevivencia se encuentran en ambos extremos de la curva, esto es, a baja concentración (aprox. 20 μM) y alta concentración (400 μM) de cobre. Un aspecto interesante que se observa es que a concentraciones de cobre intermedias (25 a 200 μM), la sobrevivencia es baja y tiende a cero. Esta conducta la presentan las sgtes. especies del ecosistema contaminado: *C. albidus* (cepa 1), *T. moniliiforme* (cepa 4) y *C. bhutanensis* (cepa 2) (Fig. 2a, b respectivamente).

Las dos primeras (cepa 1 y cepa 4) se ajustan fielmente a la descripción realizada anteriormente, la cual tiene un comportamiento significativo (Tabla 3). La tercera, cepa 2 (*C. bhutanensis*) (Fig. 2c), presenta un ajuste casi

perfecto con una parábola, cuyo análisis estadístico también es significativo (Tabla 3).

Tabla 1: Identificación de los aislados ambientales de los ecosistemas contaminado y control según sistema API ID32C.

Cepa	Especie	Ecosistema
1	<i>Cryptococcus albidus</i>	CT
2	<i>Cryptococcus albidus</i>	CT
4	<i>Trichosporon mucoides</i>	CT
5	<i>Cryptococcus terreus</i>	CT
13ch	<i>Candida parapsilosis</i>	CT
13g	<i>Cryptococcus albidus</i>	CT
15	<i>Cryptococcus terreus</i>	C
16	<i>Cryptococcus sp.</i>	C
17	<i>Cryptococcus sp.</i>	C
20	<i>Cryptococcus humicolus</i>	C

CT: Contaminado; C. Control.

Ahora bien, a los resultados obtenidos con la especie *C. phenolicus* (cepa 5), no se le aplicó ajuste debido a la baja cantidad de datos que se tenía de ella. Sin embargo, la presentación de éstos en un gráfico de dispersión mostró una correlación negativa, lo que describe un comportamiento diferente a las otras levaduras del mismo ecosistema, es decir, de alta sensibilidad, lo que permite el desarrollo de colonias solo a una concentración de cobre de 20 μM (Tabla 2).

A la cepa 13ch (*Candida parapsilosis*) (Fig. 2d) se le aplicó una correlación de Spearman (Tabla 3), cuyo resultado corresponde a una correlación negativa e indica que es altamente sensible al cobre, es decir, a medida que aumenta la concentración de este metal su sobrevivencia va en disminución hasta alcanzar un porcentaje cercano a cero en 80 μM y un D.L. 100 a 100 μM (Tabla 2). Por último, a la cepa

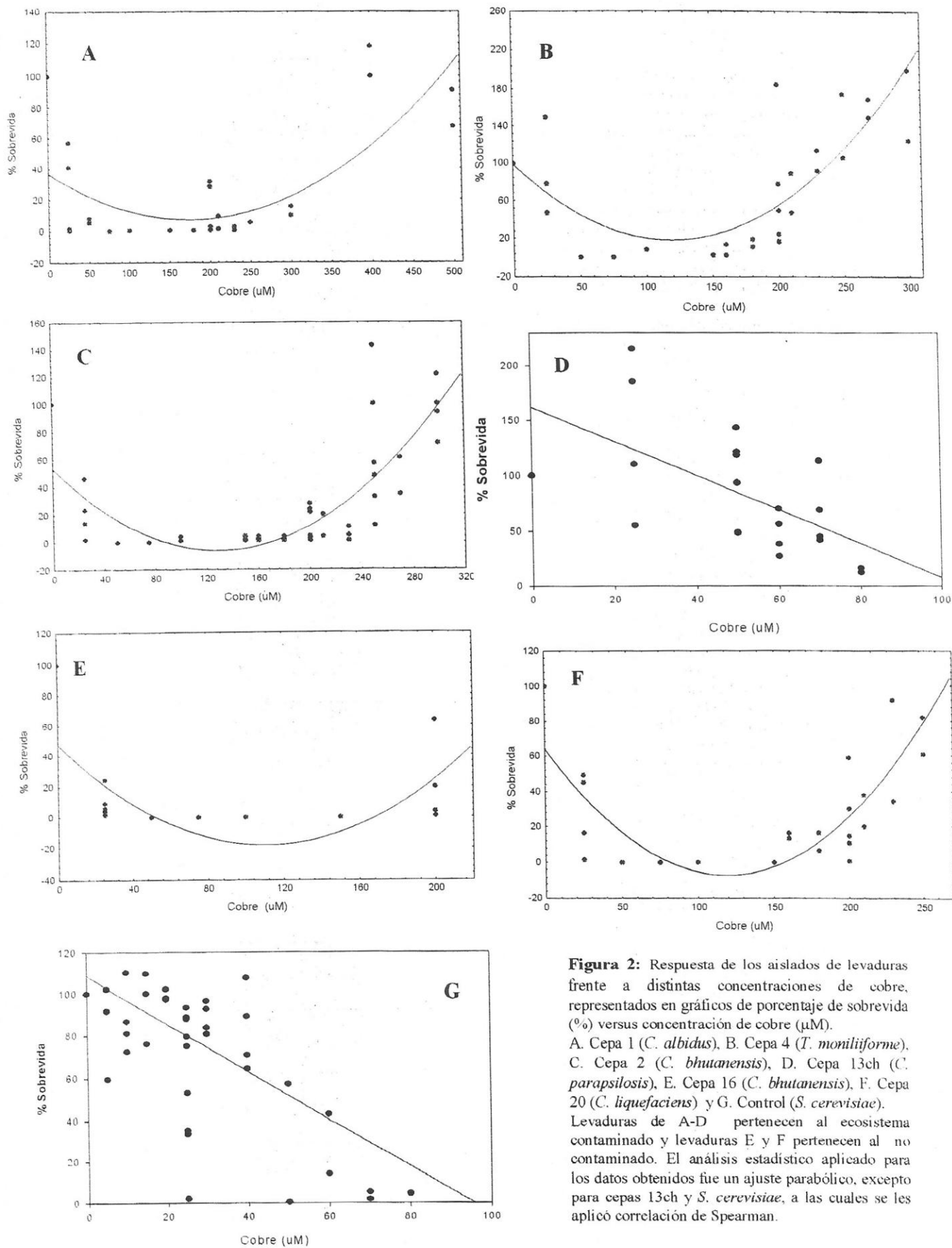


Figura 2: Respuesta de los aislados de levaduras frente a distintas concentraciones de cobre, representados en gráficos de porcentaje de sobrevida (%) versus concentración de cobre (μM). A. Cepa 1 (*C. albidus*), B. Cepa 4 (*T. moniliiforme*), C. Cepa 2 (*C. bhutanensis*), D. Cepa 13ch (*C. parapsilosis*), E. Cepa 16 (*C. bhutanensis*), F. Cepa 20 (*C. liquefaciens*) y G. Control (*S. cerevisiae*). Levaduras de A-D pertenecen al ecosistema contaminado y levaduras E y F pertenecen al no contaminado. El análisis estadístico aplicado para los datos obtenidos fue un ajuste parabólico, excepto para cepas 13ch y *S. cerevisiae*, a las cuales se les aplicó correlación de Spearman.

13g (*C. uzbekistanensis*) al igual que la cepa 5 (*C. phenolicus*) no se le aplicó un test debido a la baja cantidad de datos que se disponía de esta levadura. Sin embargo, al presentarlos en un gráfico de dispersión, la curva tendió al comportamiento descrito al de una curva parabólica. Por otra parte, las levaduras del ecosistema control no contaminado con cobre, mostraron

dos respuestas distintas entre ellas. Las cepas 15 y 17 (*C. phenolicus* y *C. bhutanensis*, respectivamente), mostraron una tendencia a ser altamente sensibles a este metal, desarrollándose sólo hasta 15 y 25 μM de cobre, respectivamente (Tabla 2). A ambas especies no se les aplicó un test debido a la baja cantidad de datos que se disponían de ellas.

Tabla 2: Rangos de tolerancia frente a los metales cobre (Cu^{+2}) y cadmio (Cd^{+2}) de cada una de las especies aisladas desde ambos ecosistemas forestales.

Parámetros Cepa	n° cel. Inicial (control)		DL50		Límite máximo		DL100	
	Cu^{+2} 10^7	Cd^{+2} 10^7	Cu^{+2} μM	Cd^{+2} μM	Cu^{+2} μM	Cd^{+2} μM	Cu^{+2} μM	Cd^{+2} μM
<i>C. albidus</i> (Cepa 1)	12	8,5	N.D.	1500-2000	250	4000	N.D.	5000
<i>C. bhutanensis</i> (Cepa 2)	7,6	7,9	N.D.	1500-2000	500	4000	N.D.	5000
<i>Trichosporon moniliiforme</i> (Cepa 4)	2,1	3,9	100-150	150-200	200	400	N.D.	500
<i>C. phenolicus</i> (Cepa 5)	8,7	4,8	10-15	300-400	15	N.D.	20	N.D.
<i>Candida parapsilosis</i> (Cepa 13ch)	8,2	5,5	60-70	300-400	80	400	100	500
<i>C. uzbekistanensis</i> (Cepa 13g)	12	8,5	N.D.	1500-2000	250	4000	N.D.	5000
<i>C. phenolicus</i> (Cepa 15)	8,7	4,8	10-15	300-400	15	N.D.	20	N.D.
<i>C. bhutanensis</i> (Cepa 16)	5,6	7,1	N.D.	200-300	200	500	N.D.	N.D.
<i>C. bhutanensis</i> (Cepa 17)	9,4	9,4	N.D.	200	25	N.D.	50	N.D.
<i>C. liquefaciens</i> (Cepa 20)	6,1	10	N.D.	500-650	N.D.	2000	N.D.	N.D.
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (IM30.29.1)	15	15	50-60	200-300	80	500	90	650

Se determinaron los parámetros N° de células inicial (control), D.L. 50 (dosis letal 50), límite máximo y D.L. 100 (dosis letal 100). *Cryptococcus albidus*, *Cryptococcus bhutanensis* (cepa 2), *Trichosporon moniliiforme*, *Candida parapsilosis* y *C. uzbekistanensis* corresponden al ecosistema perturbado con Cobre; *Cryptococcus bhutanensis* (cepa 16), *Cryptococcus bhutanensis* (cepa 17) y *C. liquefaciens* corresponden al ecosistema control. *C. phenolicus* fue aislada de muestras de ambos ecosistemas y presentan igual comportamiento frente a los metales. *Saccharomyces cerevisiae* corresponde a una cepa ambiental control.

Una respuesta muy contraria a la anterior es la que describen las cepas 16 y 20 (*C. bhutanensis* y *C. liquefaciens*, respectivamente) (Fig. 2e y f). Ambas siguen el patrón de ajuste a una parábola (Tabla 3), pero la baja disponibilidad de datos para la cepa 16 hace que no sea significativo aunque tiende al comportamiento descrito para esta condición. Finalmente, *S. cerevisiae* (control) (Fig. 2g) mostró un comportamiento de sensibilidad frente al cobre, presentando una correlación negativa significativa (Tabla 3), con desarrollo de colonias hasta 80 μM de este metal.

Tolerancia a Cadmio

El análisis de las respuestas de las levaduras, de ambos ecosistemas, frente a cadmio, permitió observar comportamientos más uniformes respecto a las respuestas frente a cobre. Para el análisis de los datos se realizó el test de correlación de Spearman en aquellos casos con datos suficientes en el rango de concentración de cadmio de 0-500 μM (rango que aporta mayor cantidad de datos para la prueba estadística), arrojando correlaciones negativas o positivas según la levadura bajo estudio (Tabla 3).

Con respecto a las levaduras del ecosistema contaminado, las especies representadas por cepa 1 y cepa 4 (Fig. 3a y b, respectivamente) mostraron una correlación negativa significativa (Tabla 3). Este resultado indica que la sobrevida disminuye conforme aumenta la concentración del metal, lo cual se puede observar claramente en las figuras previamente mencionadas.

La cepa 13ch (Fig. 3c) mostró una correlación negativa no significativa (Tabla 3), debido probablemente a que la pendiente no es tan fuerte comparado a lo observado en otras cepas. La cepa 2 (Fig. 3d) presentó una correlación positiva, no significativa (Tabla 3), de esta manera, el incremento sostenido de la concentración del metal hasta 500 μM no tiene un efecto en la sobrevida. Concentraciones de cadmio superiores a 650 μM resultan en una disminución de la sobrevida, la cual puede alcanzar hasta 4 mM de cadmio (Tabla 2).

Tabla 3: Análisis estadísticos aplicados a cada una de las especies aisladas de levaduras pertenecientes a los ecosistemas contaminado y control, frente a cobre y cadmio.

Especies del Ecosistema Contaminado Frente a Cobre	R	V.E.	p
<i>C. albidus</i> (cepa 1)	0,81	66 %	< 0,05
<i>C. bhutanensis</i> (cepa 2)	0,8	65 %	< 0,05
<i>T. moniliiforme</i> (cepa 4)	0,8	63 %	< 0,05
<i>C. parapsilosis</i> (cepa 13 ch)	-0,65		< 0,05
Especies del Ecosistema Control Frente a Cobre			
<i>C. liquefaciens</i> (cepa 20)	0,8	63 %	< 0,05
<i>S. cerevisiae</i> (control)	-0,44		< 0,05
Especies del Ecosistema Contaminado frente a Cadmio			
<i>C. albidus</i> (cepa 1)	-0,53		< 0,05
<i>C. bhutanensis</i> (cepa 2)	0,3		> 0,05
<i>T. moniliiforme</i> (cepa 4)	-0,5		< 0,05
<i>C. parapsilosis</i> (cepa 13 ch)	-0,2		> 0,05
<i>C. uzbekistanensis</i> (cepa 13g)	-0,02		> 0,05
Especies del Ecosistema Control frente a Cadmio			
<i>C. phenolicus</i> (cepa 15)	-0,2		> 0,05
<i>C. bhutanensis</i> (cepa 16)	-0,4		< 0,05
<i>C. liquefaciens</i> (cepa 20)	0,12		> 0,05
<i>S. cerevisiae</i> (control)	-0,4		< 0,05

Para las respuestas de las levaduras de ambos ecosistemas frente a cadmio se realizó una correlación de Spearman. En el caso de las respuestas frente a cobre se realizó un ajuste parabólico, excepto para las cepas 13ch y para *S. cerevisiae*, a las cuales se le realizó una correlación de Spearman. R:regresión, V.E.:varianza explicada, p:nivel de significancia.

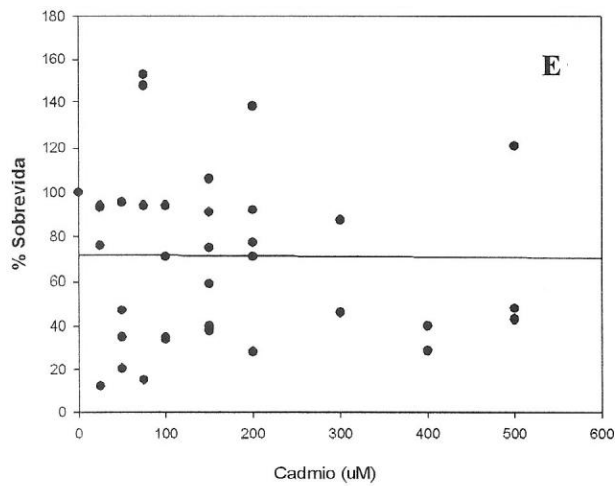
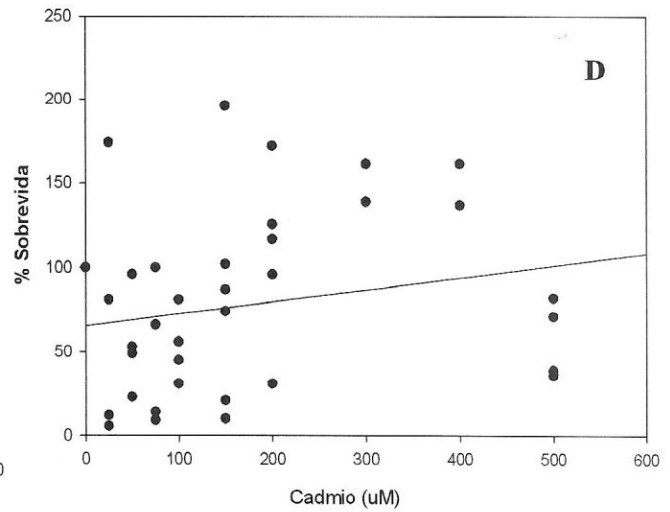
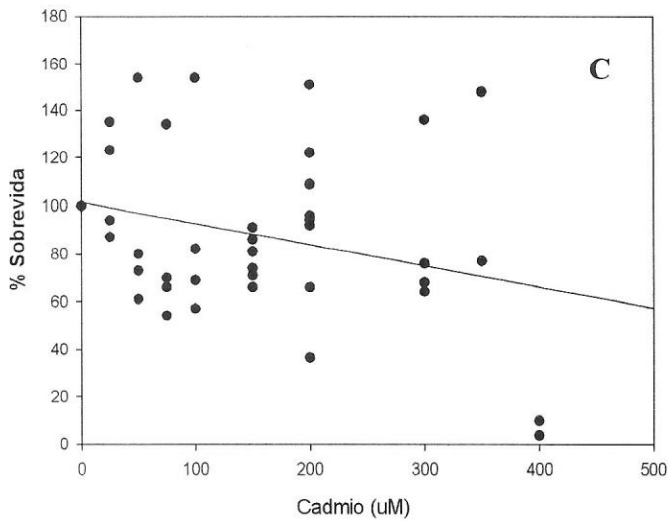
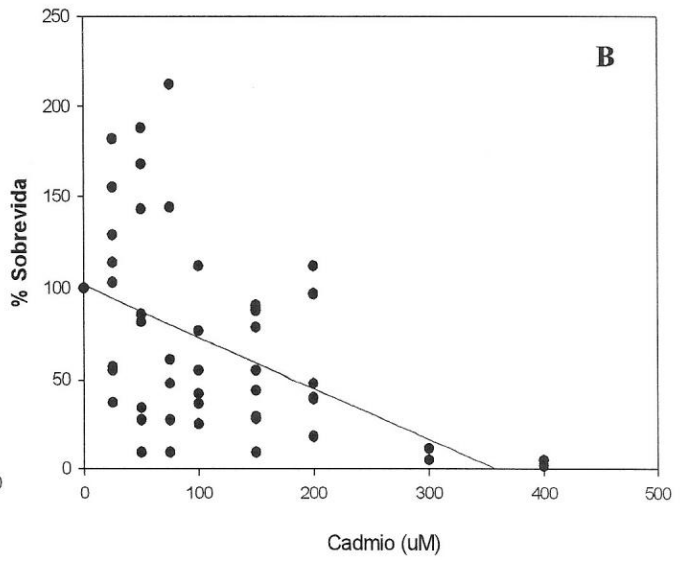
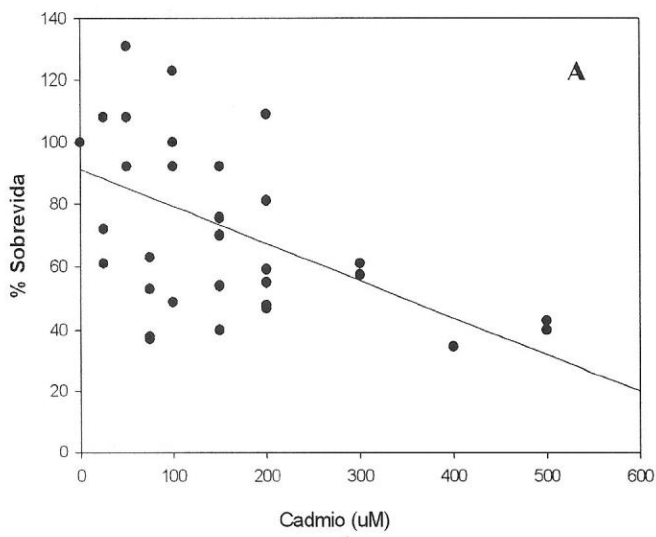


Figura 3: Respuesta de los aislados de levaduras pertenecientes al ecosistema contaminado frente a distintas concentraciones de cadmio, representados en gráficos de porcentaje de sobrevivida (%) versus concentración de cadmio (μM). A. Cepa 1 (*C. albidus*), B. Cepa 4 (*T. moniliiforme*), C. Cepa 13ch (*C. parapsilosis*), D. Cepa 2 (*C. bhutanensis*) y E. Cepa 13g (*C. uzbekistanensis*). El análisis estadístico aplicado para los datos obtenidos fue correlación de Spearman.

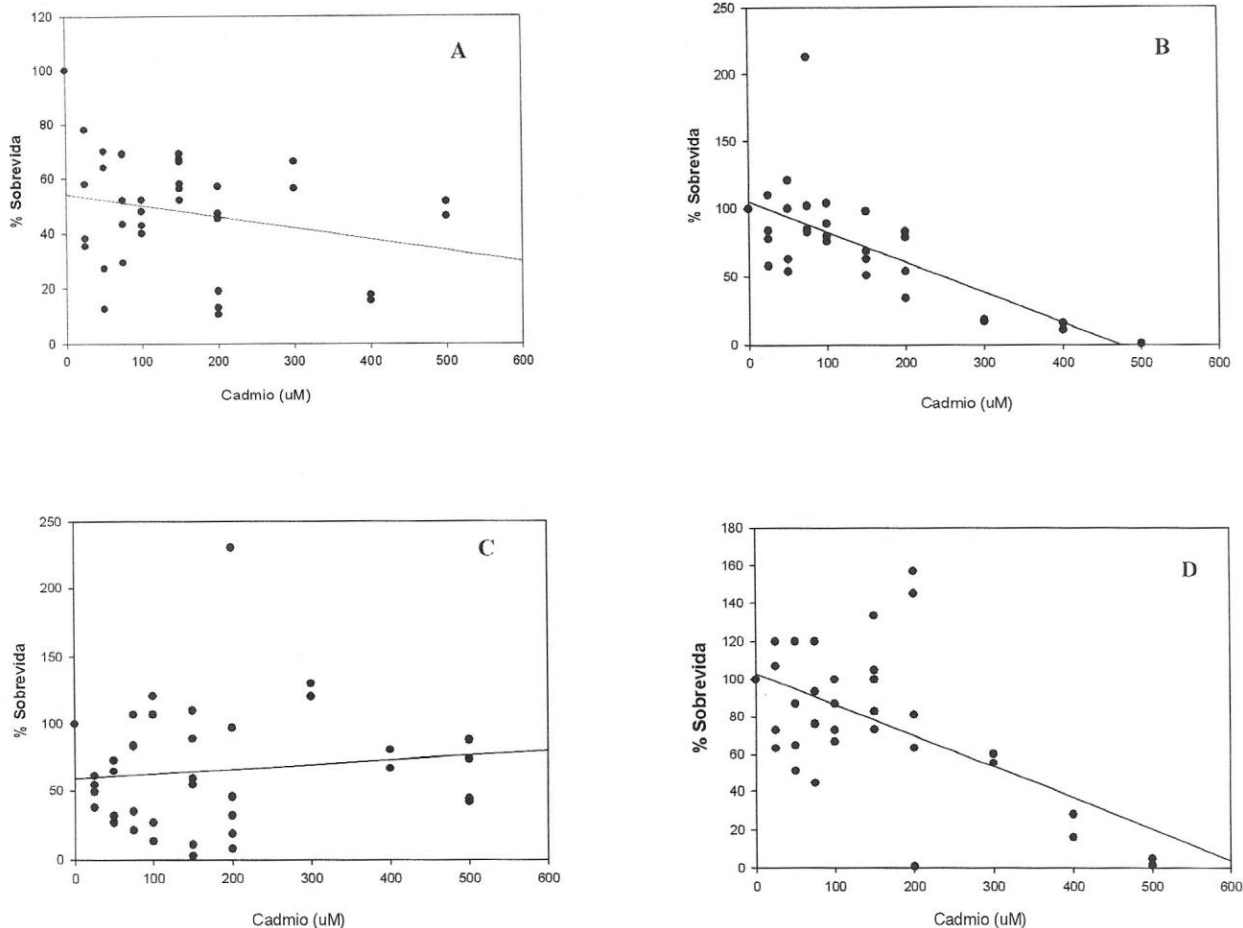


Figura 4: Respuesta de los aislados de levaduras pertenecientes al ecosistema control frente a distintas concentraciones de cadmio, representados en gráficos de porcentaje de sobrevivida (%) versus concentración de cadmio (μM). A. Cepa 15 (*C. phenolicus*), B. Cepa 16 (*C. bhutanensis*), C. Cepa 20 (*C. liquefaciens*) y D. la levadura control *S. cerevisiae*. El análisis estadístico aplicado a los datos obtenidos fue correlación de Spearman.

La cepa 5, a pesar de tener pocos datos para la aplicación del test, muestra un comportamiento que tiende a una correlación positiva en el rango de 0-250 μM de cadmio.

Por último, la cepa 13g (Fig. 3e) no presentó una correlación clara y por lo tanto no fue significativa (en el rango 0-500 μM), sin embargo, hubo tolerancia al metal hasta 4 mM de cadmio (Tabla 2).

Adicionalmente, las cepas 15 y 16 (Fig. 4a y b), pertenecientes al ecosistema control, mostraron

una correlación negativa, la cual fue significativa para el caso de la cepa 16 (Tabla 3), ya que se puede observar una fuerte pendiente y caída de la curva a una concentración de 500 μM .

La cepa 20 (Fig. 4c), por el contrario, mostró una correlación positiva muy débil, la cual no fue significativa (Tabla 3).

Los estudios realizados en la cepa 17 indican que su respuesta tiende a una correlación negativa muy débil, pero es necesario disponer de una mayor cantidad de datos para que la

correlación sea más robusta y confiable, básicamente debido a que se dispuso de pocas mediciones.

Finalmente, el test aplicado al control *S. cerevisiae* (Fig. 4d) arrojó una correlación negativa significativa (Tabla 3), y se pudo observar una fuerte caída de la curva a una concentración de 500 μ M.

Estructura de las regiones ITSs

Para la caracterización genética de los 10 aislados de levaduras a partir de los dos ecosistemas en estudio, se realizó la amplificación de la región del rDNA con partidores específicos (ITS1 e ITS4). Esto incluye el gen que codifica el rRNA de 5,8S y las dos regiones no codificantes llamadas transcritos espaciadores internos (ITS1 e ITS2). La tabla 4 muestra los tamaños de los fragmentos de DNA amplificados e indica que no hay una variación considerable en el largo del amplicón para las especies del género *Cryptococcus*, el cual tiene un valor promedio de 579 pb. Sin embargo, el tamaño de los productos de este género difiere considerablemente de aquellos obtenidos de géneros como *Trichosporon*, cuyo tamaño fue de 481 pb y *Candida*, cuyo tamaño fue de 470 pb. Como era esperable, se observó que algunas cepas de la misma especie mantienen un tamaño similar de la región ITS1-ITS2, tal como las cepas 16 y 17 de *C. bhutanensis* y las cepas 5 y 15 de *C. phenolicus* (Tabla 4). Adicionalmente, se observó que las diferencias en el largo de la región génica rDNA se debe principalmente a los ITS1 e ITS2, ya que el

tamaño del gen 5.8S rRNA es prácticamente constante en todas las especies. El análisis de la región ITS1 indica que ésta tiene un tamaño que varía entre 154 y 167 pb con un promedio de 157 pb en todos los aislados excepto para la especie *T. moniliiforme*, la cual muestra un tamaño de 117 pb (Tabla 4). La región del ITS2 presentó un largo que varió entre 222 y 234 pb con un promedio de 225 pb para el género *Cryptococcus*, no obstante, *C. phenolicus* mostró el mayor tamaño, de 234 pb de la región ITS2.

Por otro lado, el largo de esta región para *Trichosporon* fue de 169 pb y para *Candida* fue de 124 pb. Finalmente, el gen de rRNA 5.8S presentó un tamaño promedio de 156 pb para todos los aislados, con la excepción de *C. parapsilosis* cuyo largo fue de 157 pb.

Secuenciación de las regiones ITS

Las regiones 18S-28S rDNA conteniendo ambos ITS de las 10 cepas de levaduras en estudio fueron secuenciadas en ambas direcciones en un secuenciador automático. Las secuencias ITS de cada una de las levaduras aisladas fueron comparadas con las secuencias disponibles en GenBank. Este análisis bioinformático permitió identificar a cada cepa hasta el nivel de especie, lo que dio como resultado una diferencia en la clasificación taxonómica con respecto a los resultados arrojados según el sistema API ID32C (Tabla 5).

Para estudiar el grado de diferenciación entre las especies en estudio, se realizó un alineamiento de las secuencias obtenidas de los

aislados de levaduras con el programa clustal W. Al alinear las secuencias de la región del ITS1 de los aislados se observó que las levaduras del género *Cryptococcus* presentaron un 60 % de conservación entre ellas, siendo menor este grado de conservación al comparar dicho género con *Trichosporon* y, aún menor al compararla con *Candida*.

Tabla 4: Tamaño (pb) de los fragmentos de DNA correspondientes a las regiones ITSs y el gen rRNA 5.8S con los partidores its1 e its4 de cada una de las levaduras aisladas pertenecientes a los ecosistemas forestales bajo estudio.

Especie	18S rRNA	ITS1	5,8S rRNA	ITS2	28S rRNA	Total
<i>C. albidus</i>	...19	154	156	222	20...	571
<i>C. bhutanensis</i>	...19	157	156	223	20...	575
<i>T. moniliiforme</i>	...19	117	156	169	20...	481
<i>C. phenolicus</i>	...19	167	156	234	20...	596
<i>C. parapsilosis</i>	...19	150	157	124	20...	470
<i>C. uzbekistanensis</i>	...19	154	156	222	20...	571
<i>C. phenolicus</i>	...19	167	156	234	20...	596
<i>C. bhutanensis</i>	...19	157	156	224	20...	576
<i>C. bhutanensis</i>	...19	157	156	224	20...	576
<i>C. liquefaciens</i>	...19	154	156	222	20...	571

El alineamiento de las secuencias del gen rRNA 5.8S mostró alrededor de un 98% de conservación para el género *Cryptococcus*, las diferencias en secuencia se vieron en *C. phenolicus* (cepa 5 y 15) y en *C. liquefaciens* (cepa 20).

Finalmente, en el alineamiento de las secuencias de la región ITS2 se obtuvo un patrón muy similar al observado con la región del ITS1, con la diferencia que el género *Cryptococcus* presentó un 68% de conservación.

En general, al alinear las secuencias del género *Cryptococcus* con *Trichosporon* y *Candida* por separado, se pudo observar que las mayores

diferencias se encontraron con *Candida*, lo que se esperaba teniendo en cuenta que *Candida* es un ascomicete y *Trichosporon* un basidiomicete al igual que *Cryptococcus* y *Xanthophyllomyces dendrorhous* (ex *Phaffia rodhozyma*), esta última tomada como muestra externa.

Construcción de Dendrogramas

La figura 5 muestra los dendrogramas basados en las secuencias de las regiones ITS1, ITS2 y el gen rRNA 5,8S de los aislados de levaduras de los ecosistemas contaminado y control. Estos dendrogramas fueron construidos

con el programa Pileup de GCG, en ellos se puede observar que la estructura de los derivados de las regiones ITSs son similares entre sí, pero distintos del derivado del gen ribosomal 5,8S.

Tabla 5: Comparación en la identificación de los aislados de levaduras de ambos ecosistemas según sistema API ID32C y secuenciación.

Cepa	ID32C	Secuenciación
1	<i>C. albidus</i>	<i>C. albidus</i>
2	<i>C. albidus</i>	<i>C. bhutanensis</i>
4	<i>T. mucoides</i>	<i>T. moniliiforme</i>
5	<i>C. terreus</i>	<i>C. phenolicus</i>
13ch	<i>Cand. parapsilosis</i>	<i>Cand. parapsilosis</i>
13g	<i>C. albidus</i>	<i>C. uzbekistanensis</i>
15	<i>C. terreus</i>	<i>C. phenolicus</i>
16	<i>C. sp.</i>	<i>C. bhutanensis</i>
17	<i>C. sp.</i>	<i>C. bhutanensis</i>
20	<i>C. humicolus</i>	<i>C. liquefaciens</i>

Cepas 16 y 17 solo se identificaron a nivel de género.

Las 10 cepas aisladas de ambos ecosistemas constituyen dos grupos filogenéticos. Un grupo incluye las cepas pertenecientes al género *Cryptococcus* y, el otro grupo incluye las especies *T. moniliiforme* y *C. parapsilosis*.

En los tres dendrogramas que se construyeron en base a las secuencias de las regiones ITS1-5,8S-ITS2 se puede observar que todas las especies del género *Cryptococcus* están formando un grupo filogenético, independientemente de la procedencia de las muestras de donde se aislaron, es decir, si provienen del ecosistema contaminado con

cobre o del control. Solo los dos aislados que pertenecen cada uno a un género distinto al de *Cryptococcus* están distantes a este género y ambos fueron aislados del ecosistema perturbado con el metal.

Discusión

Levaduras aisladas de los Ecosistemas forestales

Con el objetivo de estudiar las levaduras presentes en un ecosistema contaminado con metales pesados y compararlas con aquellas aisladas de un ecosistema no contaminado, se procedió a coleccionar muestras de suelo y aislar las cepas de levaduras en un medio de cultivo rico en nutrientes utilizado con estos fines. Posteriormente, mediante el sistema API ID32C, fue posible identificar las levaduras aisladas de ambos ecosistemas. Los resultados de la identificación indican que la mayoría de los aislados (80%) pertenecen al género *Cryptococcus*, con excepciones de la cepa 4 y 13ch que corresponderían a los géneros *Trichosporon* y *Candida*, respectivamente.

Es interesante el hecho que los aislados de levaduras de ambos ambientes estén representados por los tres géneros mencionados, los cuales corresponden comúnmente a patógenos reconocidos en humanos y se aíslan principalmente de ellos (Mannarelli *et al.*, 1998; Sugita *et al.*, 1999; Wahyuningsih *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2001 and Douglas, 2003).

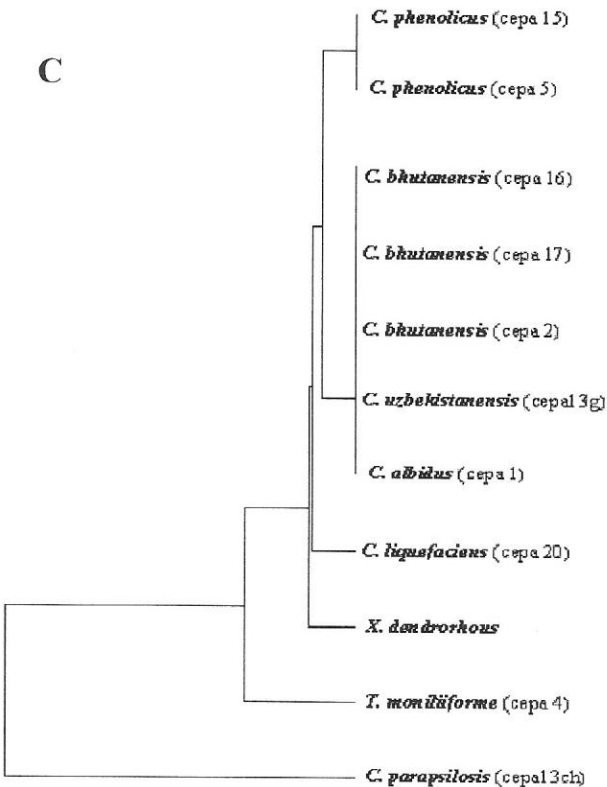
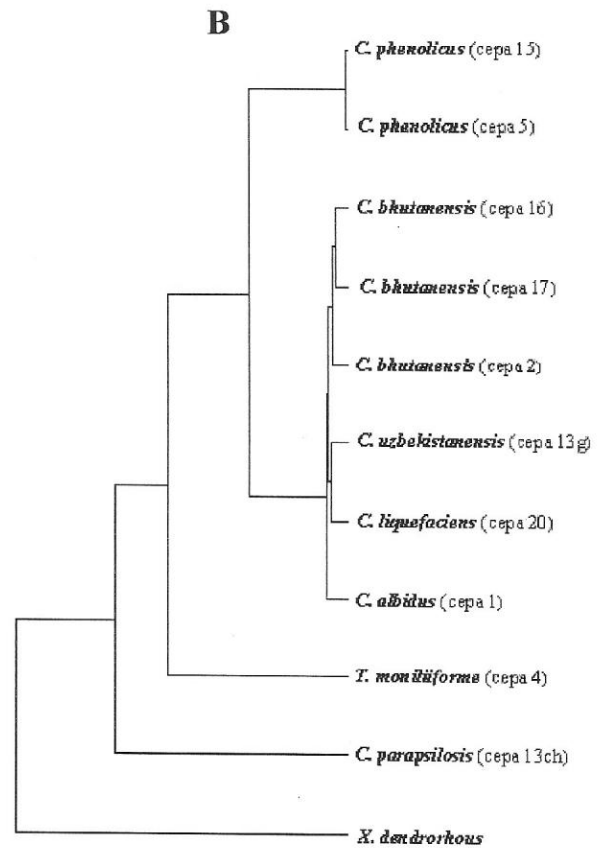
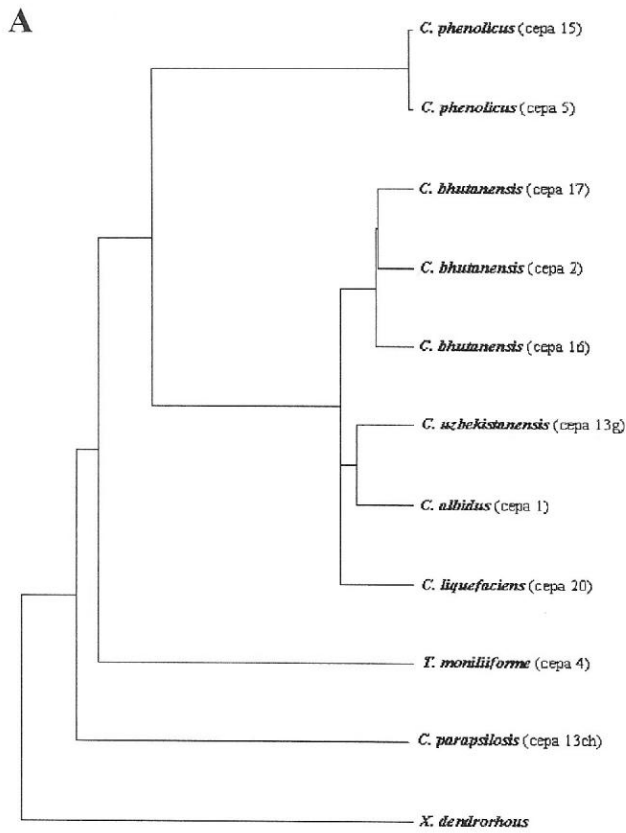


Figura 5: Dendrogramas de las levaduras aisladas de los ecosistemas bajo estudio basados en secuencias nucleotídicas de las regiones ITS1 (A), ITS2 (B) y el gen ribosomal 5,8S (C). Las secuencias fueron alineadas y analizadas por Pileup (GCG) y los árboles fueron construídos usando PAUP display.

Las levaduras del género *Cryptococcus* pertenecen al grupo de los basidiomicetes, se caracterizan por poseer cápsulas, no forman pseudomicelio y no fermentan azúcares. Varias especies forman colonias naranjas o rojas propio de la presencia de carotenoides (Gácsér *et al.*, 2001). Además, son heterogéneas en sus capacidades nutricionales, de hecho se ha descrito que especies del género *Cryptococcus*, además de *Cryptococcus neoformans*, son organismos saprófitos y han sido reportadas como causales de la Cryptococcosis (Sugita *et al.*, 2000). En este tipo de enfermedad, los más susceptibles a la infección son los pacientes inmunodeprimidos, motivo por lo que esta levadura se ha aislado a partir de pacientes VIH positivos (Buchanan *et al.*, 1998). *C. neoformans* también produce meningoencefalitis por entrada de basidiosporas a través de la vía respiratoria (Buchanan *et al.*, 1998). Esta especie no es parte de la biota microbiana normal de humanos y ha sido aislada transientemente de personas que no presentan patologías. Sin embargo, se ha descrito que, por ejemplo, *C. neoformans* var. *neoformans* está asociada a guano de palomas y es transportada por éstas (Spencer and Spencer, 1997), pero no está asociada a enfermedades en estas aves, debido probablemente a la alta temperatura corporal que presentan (39°-41°C), restringiendo el crecimiento Cryptococcal (Buchanan *et al.*, 1998).

Por su parte, especies del género *Candida* son comunes comensales humanos que pueden causar un amplio espectro de enfermedades, siempre que esté en estado filamentoso. La principal complicación es una infección

diseminada, la cual ocurre con incrementada prevalencia en pacientes post-operatorios e inmunodeprimidos, por ejemplo, *Candida albicans* causa candidiasis invasiva y ha sido uno de los patógenos más frecuentemente aislados de la sangre de estos pacientes (Wahyuningsih *et al.*, 2000). Algunas especies de *Candida* son conocidas como los principales agentes de infecciones adquiridas en hospitales. Además, son frecuentemente identificadas como causantes de neumonías e infecciones del tracto urinario (Douglas, 2003).

Finalmente, *Trichosporon* es un género importante médicamente que incluye los agentes causantes de infecciones asociadas a mucosa e infecciones superficiales (Sugita *et al.*, 1999).

Según Kurtzman y Fell (2000), las levaduras crecen en un amplio rango de valores de pH, no más bajos que 2.5, pero preferentemente colonizan lugares que ya han sido el sitio de actividades fermentativas por bacterias. En relación al pH del suelo, éste es más ácido en el ecosistema contaminado en comparación con el ecosistema control. (Delgado, 1996).

Por otro lado, los hábitats más comunes de las levaduras son ricos en carbono orgánico, medios en estado líquido o muy alto en humedad, acídicos u ocasionalmente alcalinos y complejos nutricionalmente (Kurtzman and Fell, 2000). Esto es compatible con los suelos de ecosistemas forestales, que para el caso de los bosques de tipo mediterráneos como los ecosistemas de Ventanas y Quintay no presentan grandes deficiencias nutricionales, tienen un cierto grado de humedad y un alto

contenido en materia orgánica y húmica. En cuanto al pH del suelo, éste es neutro o ligeramente ácido (6,0 a 7,3), volviéndose más ácidos a medida que las precipitaciones aumentan (Donoso, 1993).

Ahora bien, en cuanto al cobre, éste se presenta predominantemente en forma de sulfuros pero también como minerales secundarios relativamente insolubles que incluyen óxidos, carbonatos, sulfatos y cloruros. El cobre en los bosques es altamente inmóvil, su disponibilidad para las plantas está determinada principalmente por el pH del suelo y por la capacidad de acomplejarse fuertemente con la materia orgánica. Así, cuando el pH es menor de 6,5 se produce una mayor liberación del ion Cu^{+2} , lo que aumenta su biodisponibilidad. Por lo que la acidificación de los suelos como producto, en nuestro caso, de emisiones de sulfuro de fundiciones y refinерías, podría desembocar en un aumento de la biodisponibilidad de cobre para el ecosistema (Donoso, 1993).

Debido a estas características sobre la disponibilidad del metal, estudios posteriores podrían focalizarse en el rol que juegan los organismos vivos en el ecosistema y en particular los géneros de levaduras aisladas de hábitats contaminados o no. Como se ha observado en los resultados, la mayoría de ellos corresponden a especies del género *Cryptococcus*, las cuales además, tienen importancia clínica, ya que son capaces de infectar al hombre provocando enfermedades complejas. Así, un estudio genético exhaustivo de muestras de estas especies tanto ambientales

como clínicas podrían ser relevante para determinar diferencias genotípicas en las mismas.

Determinación de tolerancia a metales pesados

En la caracterización de las levaduras aisladas, en cuanto a su tolerancia a cobre, se pudo observar que 2 de las 4 levaduras pertenecientes al ecosistema control son altamente sensibles, desarrollando colonias en el rango entre 0-25 μM de cobre. Situación distinta ocurre con la mayoría de los aislados pertenecientes al ecosistema contaminado, los que presentaron altas tolerancias a éste metal (alrededor de 500 μM). Las levaduras que presentaron tolerancia al cobre son: cepa 1 (*C. albidus*), cepa 2 (*C. bhutanensis*), cepa 4 (*Trichosporon moniliiforme*), cepa 16 (*C. bhutanensis*) y cepa 20 (*C. liquefaciens*). El comportamiento observado en las levaduras fue muy particular, ya que presentan una alta sensibilidad a cobre a concentraciones bajas como 20-25 μM y por el contrario, grandes tolerancias a partir de 150-200 μM .

En cuanto a la caracterización de las levaduras respecto a sus tolerancias a cadmio, se pudo observar respuestas de alta tolerancia (alrededor de 500 μM) tanto en aislados del ecosistema contaminado como en el ecosistema control. El tipo de respuesta frente a cobre de las especies de levaduras mencionadas anteriormente podría ser explicado mediante transportadores de metales específicos. Estos

transportadores han sido descritos en distintos organismos eucariontes como las levaduras *S. cerevisiae* (Lin *et al.*, 1997; MacDiarmid *et al.*, 2002), *Schizosaccharomyces pombe* (Vande and Ow, 2001; Bellemare *et al.*, 2002; Beaudoin *et al.*, 2003), y el hongo filamentoso *Neurospora crassa* (Kneer *et al.*, 1992), así como también en el nemátodo *Caenorhabditis elegans* (Sambongi *et al.*, 1997; Wakabayashi *et al.*, 1998 and Vatamaniuk *et al.*, 2001) y algunas plantas como *Arabidopsis thaliana* (Xiang and Oliver, 1998; Vatamaniuk *et al.*, 2000) y *Thlaspi caerulescens* (Pence *et al.*, 2000), entre otros.

Se ha estudiado la homeostasis de cobre en la levadura modelo *S. cerevisiae* y se ha descrito que en el medio de cultivo específico para levadura el Cu^{+2} es reducido a Cu^{+1} debido a la acción de reductasas $\text{Fe}^{+3}/\text{Cu}^{+2}$ de la superficie celular. Estas enzimas son codificadas por un conjunto de genes denominados *FRE*. Esta etapa sería previo al transporte hacia el interior de la célula, la que ocurre a través de dos transportadores de cobre de alta afinidad ubicados en la membrana plasmática, tales transportadores son denominados *CTR1* y *CTR3*, los cuales trabajan independientemente y parecieran ser funcionalmente redundantes (Cobbett *et al.*, 2002).

Por otro lado, se ha descrito también en *S. cerevisiae* que el transporte de cadmio es realizado a través del transportador específico para zinc, codificado por el gen *zrt1*, el cual se comporta como de alta afinidad para Zn^{+2} y de baja afinidad para cadmio (Gomes *et al.*, 2002). Este mismo patrón se presenta en algunas plantas como, por ejemplo, *T. caerulescens*, la

cual es hiperacumuladora de metales, en donde el transporte de cadmio es realizado por el transportador específico para zinc (Pence *et al.*, 2000).

Ahora bien, estudios de incorporación de Fe^{+2} en *Cryptococcus neoformans* mostraron que la captación de este metal a muy bajas concentraciones (bajo $1 \mu\text{M}$) fue muy eficiente, siendo proporcional la relación entre estas variables, sin embargo, en el rango de $1-25 \mu\text{M}$ la curva se estabilizaría para luego describir una pendiente positiva altamente inclinada a concentraciones mayores de $25 \mu\text{M}$. Lo que se propone, con esta respuesta de *C. neoformans*, es que el patrón sería consistente con un sistema de captación de alta y baja afinidad como el que se ha descrito para *S. cerevisiae*. Esto indicaría una saturación del sistema de captación de alta afinidad en el rango de $1-5 \mu\text{M}$ y que a partir de dicha concentración comenzaría a operar el sistema de baja afinidad, el cual no sería saturable (Jacobson *et al.*, 1998). Este mecanismo que presenta *C. neoformans* se podría extender a las levaduras que muestran una respuesta acorde a una curva parabólica frente a cobre, ya que a bajas concentraciones del metal ($25 \mu\text{M}$) decaen sus sobrevidas notablemente. Hubiese sido importante medir sobrevidas a concentraciones menores que $25 \mu\text{M}$ para comparar si siguen el mismo patrón. Sin embargo, se observó una recuperación de sus sobrevidas a concentraciones alrededor de $150-200 \mu\text{M}$, sugiriendo que también podría estar actuando un sistema de alta y baja afinidad, respectivamente, para estas concentraciones.

Debido al grado de patogenicidad de estas especies de levaduras, se tomó la decisión de interrumpir los experimentos, no pudiendo realizar mediciones mayores a 500 μM , por lo que se desconoce si su sistema de baja afinidad presenta características de saturación. Pero podemos decir, que para el rango de concentración con el cual se trabajó, las respuestas de estas levaduras podrían seguir el patrón que presenta *C. neoformans* frente a la captación de Fe^{+2} .

PCR y Secuenciación

Con el objetivo de identificar los 10 aislados de levaduras de los dos ecosistemas en estudio, se realizó un análisis molecular, mediante PCR, y un análisis bioquímico utilizando el sistema API ID32C. Al comparar los resultados de ambos análisis se observó que no hubo concordancia en el nombre de la especie asignada a cada cepa, excepto para la cepa 13ch (*C. parapsilosis*). Así, los tests comerciales que usan métodos fisiológicos-bioquímicos de identificación de levaduras son inexactos, y en algunos casos, solo se llega a identificar hasta el nivel de género y no hasta el nivel de especie. La utilización de técnicas moleculares como, por ejemplo, metodologías basadas en PCR, análisis RFLP del gen que codifica el rRNA 5.8S y las regiones de los ITSs que flanquean dicho gen, permiten un análisis muy fino que facilita la identificación de especies (Van Pelt *et al.*, 1999; Arias *et al.*, 2002). Los métodos comerciales de identificación de levaduras pueden ser atractivos por la simplicidad del test, pero estos

kits fueron originalmente diseñados para diagnósticos clínicos y su aplicación está generalmente restringida a pocas especies de levaduras, principalmente clínicas, dejando de lado aquellas aisladas del ambiente (Arias *et al.*, 2002). Lo opuesto se observa con los métodos moleculares, los cuales no discriminan en el sentido de identificar cepas de diferentes orígenes, tanto ambientales como aislados clínicos. Sin embargo, es aconsejable la integración de ambos métodos, ya que por un lado los kits de identificación comercial son más rápidos, más simples de manejar, no requiriendo equipos especiales y dan cuenta a grandes rasgos del género con el que se está trabajando, aunque tienen limitaciones en identificar cepas ambientales.

Al analizar comparativamente las secuencias del gen rRNA 5.8S de las levaduras estudiadas, se puede corroborar el grado de conservación de este gen, independientemente de la procedencia de los aislados de levaduras, esto es, si provienen del ecosistema perturbado o no. Esto concuerda con lo que se ha descrito a través de los años, en que los RNA ribosómicos son una de las moléculas mejor conservadas desde el punto de vista evolutivo en todos los sistemas vivos, en donde estos genes comparten un ancestro común. Estas secuencias bien conservadas pueden utilizarse para medir distancias filogenéticas, incluso entre organismos que tienen poca relación entre sí. Esencialmente, los cambios en las secuencias de nucleótidos indican cambios evolutivos (Atlas and Bartha, 1993). Algo distinto ocurre con las secuencias correspondientes a las regiones de los ITSs, las

cuales presentaron menor grado de conservación, respecto al gen ribosomal para todas las levaduras estudiadas, y las diferencias más marcadas, como era esperable, se observaron entre géneros. Los ITSs son regiones bastante menos conservadas, ya que evolucionan a una tasa más rápida, permitiendo variaciones entre especies del mismo género e incluso en individuos de la misma especie, siendo utilizados como herramientas útiles en los análisis filogenéticos (Sugita *et al.*, 1999; Chang *et al.*, 2001) y en determinar diversidad intraespecífica.

Dendrogramas

Los dendrogramas construidos en base a las secuencias del gen rRNA 5,8S y de los ITS1 e ITS2 de todos los aislados de levaduras, presentan un grupo que corresponde a las especies del género *Cryptococcus* formando un taxón bien definido. Las especies que están distantes de este taxón son las levaduras *T. moniliiforme* y *C. parapsilosis* (basidiomicete y ascomicete, respectivamente), las cuales forman otro grupo, distante filogenéticamente del primero.

La especie que se utilizó como raíz *Xanthophyllomyces dendrorhous*, resultó estar más cercana filogenéticamente al grupo *Cryptococcus*, y lejana de *Trichosporon* y *Candida* para el caso del árbol construido con las secuencias del gen 5,8S rRNA. Sin embargo, en los dendrogramas realizados con las secuencias no codificantes ITS1 e ITS2, se observó que la especie raíz está actuando como tal, ya que se encuentra bastante alejada

filogenéticamente de ambos grupos, especialmente, del grupo correspondiente al género *Cryptococcus*.

Al concluir esta memoria se puede deducir que los objetivos planteados para este estudio fueron cumplidos satisfactoriamente, mediante ensayos de tolerancia a metales pesados (cobre y cadmio) de las levaduras aisladas e identificación de estas levaduras por análisis molecular. Los resultados fueron logrados con éxito a pesar del grado de patogenicidad de las levaduras con las cuales se trabajó.

La utilización de microorganismos como remediadores de contaminantes como los metales pesados, ofrece una alternativa potencial a los métodos ya existentes para la detoxificación y recuperación de metales tóxicos presentes en líquidos residuales industriales. Muchas levaduras, hongos filamentosos, algas y bacterias tienen la capacidad de concentrar metales a partir de soluciones acuosas y de acumularlas dentro de la estructura microbiana.

Las transformaciones pueden ocurrir naturalmente, aunque estas son usualmente lentas y limitadas por la disponibilidad de nutrientes, oxígeno o microorganismos apropiados. En atención a lo recién descrito, la biorremediación resultaría de una aceleración dirigida de las reacciones en el medio ambiente para incrementar la tasa de transformación biológica. La biorremediación por lo tanto es el uso de sistemas de tratamiento biológico para destruir o reducir las concentraciones de desechos peligrosos en un sitio contaminado. El factor clave que conduce a una necesidad de

remediación de suelo y agua contaminada es la toxicidad presente en los ecosistemas, siendo el hombre componente importante de estos. Suelos contaminados y acuíferos pueden ser recuperados a través de la aplicación de una variedad de métodos físicos, químicos y biológicos. En la biorremediación de compuestos orgánicos y/o inorgánicos estos son removidos desde suelos y cuerpos de agua por la acción de microorganismos. En muchos casos, los microorganismos son capaces de transformar un componente orgánico sin ser capaz de usar el componente como un sustrato para el crecimiento o como una fuente de energía. Estos microorganismos podrían necesitar otro sustrato como una fuente de carbono y energía sobre el cual crecer. Así, en co-metabolismo, los organismos usan un sustrato como una fuente primaria de energía y gratuitamente metabolizan otro componente utilizando enzimas específicas, las cuales son sintetizadas para degradar el sustrato primario. La biodegradación de componentes orgánicos involucra ruptura y formación de enlaces químicos que alteran las especies moleculares del contaminante. Esto conduce a cambios en la solubilidad, características de sorción, propiedades de transporte y toxicidad del metal. Hay procesos microbianos que pueden influenciar en la toxicidad y el transporte de metales, como la biosorción y bioacumulación, en donde la última no es más que la retención y concentración de una sustancia por un organismo. La adición de microorganismos (inoculación) puede acelerar la fase inicial de biorremediación en muchos casos y puede ser

beneficioso en ambientes en los cuales los contaminantes resisten a la biodegradación por microorganismos autóctonos (Margesin *et al.*, 1997). La biorremediación por tanto depende de la presencia de los microorganismos apropiados en la cantidad y combinaciones correctas y en las condiciones ambientales apropiadas.

Debe quedar claro que las tecnologías basadas en el uso de biomasa microbiana no tienen necesariamente que reemplazar a los tratamientos físico-químicos ya existentes, pero sí pueden actuar como suplementos para los procesos existentes que no resultan completamente eficientes.

Una de las desventajas de la biorremediación es crear y mantener condiciones ambientales necesarias para crecimiento microbiano, ya que los microorganismos son sensibles a las temperaturas, pH, toxicidad y concentración del contaminante, porcentaje de humedad, concentraciones de nutrientes y concentración de oxígeno. Una reducción en la actividad microbiana podría disminuir la velocidad de degradación, por lo que se extendería el período de tratamiento. Por otro lado, la disminución de contaminación mediante biorremediación no podría ser alcanzado en el caso que los contaminantes no sean biodegradables o sean solo parcialmente biodegradables o porque los niveles de remoción del contaminante no pueden ser logrados microbianamente (Eweis *et al.*, 1998).

Los microorganismos debido a su ubicuidad, capacidades metabólicas diversas y altas tasas de actividad enzimática, desempeñan un papel primordial en los ciclos biogeoquímicos.

contribuyendo a mantener la calidad ambiental, lo que hace de la ecología microbiana una importante disciplina de estudio científico.

Desde el punto de vista de protección ambiental resulta claro que la eliminación de metales y radionucleótidos es importante, pero esto no tiene prioridad industrial ni política en varios países de latinoamérica, los cuales tienen el común denominador de estar toda su política dirigida al crecimiento económico. Así, mientras estos países estén en vías de desarrollo como Chile, los asuntos ambientales tendrán que seguir esperando mientras que lamentablemente los impactos negativos sobre el medio natural se hacen cada vez menos reversibles. Por otro lado, mientras las autoridades de gobierno y las industrias responsables de la contaminación del medio ambiente por metales y radionucleótidos toman medidas para revertir esta situación, es deber de los científicos ligados a esta área desarrollar al máximo las tecnologías basadas en microorganismos. De esta manera las innovaciones debieran ser reconocidas y usadas confiablemente por todas aquellas industrias que junto con su actividad productiva despiden residuos líquidos que contienen este tipo de contaminantes.

Un aspecto positivo en relación a la actual posición en que se encuentra nuestro país en materia internacional, es el hecho de estar suscrito a un acuerdo con la Unión Europea y un Tratado de libre comercio con Estados Unidos. Esto nos hará enfrentar, como país, nuevos y necesarios desafíos para responder de manera eficiente y satisfactoria a los requerimientos de los demandantes extranjeros

en lo que se refiere a materias de certificaciones de calidad ambiental. Estos aspectos nos permitirán estar a la altura de un país en vías de desarrollo y competir de igual a igual con el resto de los países que quieren cumplir con los mismos objetivos. Indudablemente, una posición de liderazgo, nos demandará ser cada vez más rigurosos en cuanto a las normas de emisión, calidad de las materias primas utilizadas en los procesos de producción y al uso de tecnologías limpias. Sin lugar a dudas, llegar a ser líder y mantenerse en esta posición, implica que no se puede dejar de lado la importante labor que realiza la ciencia en cuanto a los requerimientos que se nos exigen para el cumplimiento de éstas y otras tareas.

Al finalizar este estudio, es necesario destacar el enorme potencial que tiene la biorremediación en intentar disminuir y/o revertir impactos negativos en los ecosistemas, los cuales no solo afectan a los organismos presentes allí, sino también flujos y ciclos de nutrientes que en su totalidad terminan disminuyendo drásticamente tanto la calidad ambiental como los procesos ecosistémicos. Esta importante herramienta, de la biorremediación, la cual combina disciplinas como la ecología microbiana e ingeniería genética debiera explotarse en gran medida en los próximos años no solo para el desarrollo de la ciencia, sino también para contribuir a la limpieza definitiva del medio ambiente. La tarea es de los científicos y de las autoridades con competencia ambiental, las cuales mientras no modernicen las actuales normas de emisión, los impactos irreversibles al medio serán cada

vez de mayor magnitud. No obstante, cabe destacar que los problemas en materia ambiental es tanto tarea de un equipo multidisciplinario como de cada uno de nosotros.

Agradecimientos

Quisiera agradecer especialmente a mis directores de tesis, el Dr. Víctor Cifuentes y el Dr. Rubén León por el apoyo que me brindaron en el desarrollo de este trabajo, por haber confiado en mí, alumna inexperta en el área y por acogerme en el laboratorio de genética. También agradezco a los miembros de la comisión revisora de este seminario de título, a la Dra. Margarita Carú, al Dr. Italo Serey y al Dr. Germán Hermosilla por sus comentarios y por el tiempo dedicado a la revisión de este trabajo.

A todos mis compañeros de laboratorio, en especial a Salvador y Dony por el gran apoyo entregado, ayuda y experiencia en el manejo de laboratorio y sobre todo por el gran valor humano que hay en cada uno de ellos.

A mis compañeros y amigos, en especial Andrea, Paula, Marisela, Hernán por el apoyo y comprensión entregada en todo momento.

Finalmente, quiero agradecer especialmente a mi familia, a mis padres, Juvencio y Mónica ya que todo lo que soy y lo que he logrado realizar se lo debo a ellos y por todo el amor, comprensión y apoyo que siempre me han entregado.

Referencias

- An, G., Schuman, D. and Johnson, E. (1989). Isolation of *Phaffia rhodozyma* mutants with increased astaxanthin content. *Appl. Environ. Microbiol.* 55, 116-124.
- Arias, C., Burns, J., Friedrich, L., Goodrich, R. and Parish, M. (2002). Yeast species associated with orange juice: Evaluation of different identification methods. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 1955-1961.
- Atlas, R. and Bartha, R. (2002). *Ecología Microbiana y Microbiología Ambiental*. 4ª edición. Prentice Hall.
- Beaudoin, J., Mercier, A., Langlois, R. and Labbé, S. (2003). The *Schizosaccharomyces pombe* Cuf1 is composed of functional modules from two distinct classes of copper metalloregulatory transcription factors. *The Journal of Biological Chemistry* 278, 14565-14577.
- Bellemare, D.R., Shaner, L., Morano, K.A., Beaudoin, J., Langlois, R. and Labbé, S. (2002). Ctr6, a vacuolar membrane copper transport in *Schizosaccharomyces pombe*. *The Journal of Biological Chemistry* 277, 46676-46686.
- Buchanan, K. and Murphy, J. (1998). What makes *Cryptococcus neoformans* a pathogen?. *Emerging Infectious Diseases*, January-March 4 (1).

- Cañizares-Villanueva, R. (2000). Biosorción de metales pesados mediante el uso de biomasa microbiana. *Revista Latinoamericana de Microbiología* 42, 131-143.
- Clemens, S., Kim, E., Neumann, D. and Schroeder, J. (1999). Tolerance to toxic metals by a gene family of phytochelatin synthases from plants and yeasts. *The EMBO Journal*. 18,3325-3333.
- Cobbett, C. and Goldsbrough, P. (2002). Phytochelatins and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Ann. Rev. Plant Biol.* 53, 159-182.
- Cunningham, S., Berti, W. and Huang, J. (1995). Phytoremediation of contaminated soils. *Trends in Biotechnol.* 13, 393-397.
- Chang, H., Ning, S., Huey, A., Lan, T. and Chain, T. (2001). Rapid identification of yeasts in positive blood cultures by a multiplex PCR method. *Journal of Clinical Microbiology* 39, 3466-3471.
- Chen, Y., Eisner, J., Kattar, M., Rassouljian-Barrett, S., LaFE, K., Yarfitz, S., Limaye, A. and Cookson, B. (2000). Identification of medically important yeasts using PCR-based detection of DNA sequence polymorphisms in the internal transcribed spacer 2 region of the rRNA genes. *Journal of Clinical Microbiology* 38, 2302-2310.
- Chen, Y., Eisner, J., Kattar, M., Rassouljian-Barrett, S., LaFE, K., Bui, U., Limaye, A. and Cookson, B. (2001). Polymorphic internal transcribed spacer region 1 DNA sequences identify medically important yeasts. *Journal of Clinical Microbiology* 39, 4042-4051.
- Delgado, L. (1996). Estudio comparativo de contenidos de cobre en bosques de clima mediterráneo de Chile central. Tesis de Magíster en Cs. Biológicas con Mención en Ecología. Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
- Donoso, C. (1993). Bosques Templados de Chile y Argentina. Variación, estructura y dinámica. *Ecología Forestal*. Editorial Universitaria.
- Douglas, L. (2003). *Candida* biofilms and their role in infection. *Trends in Microbiology-review* 11, 30-36.
- Erlich, H.L. and Brierley, C.L. (1996). *Microbial Mineral Recovery*. McGraw-Hill Companies, Inc. pp. 249-275.
- Esteve-Zarzoso, B., Belloch, C., Uruburu, F. and 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* 49, 329-337.
- Eweis, J., Ergas, S., Chang, D. and Schroeder, E. (1998). *Bioremediation Principles*. The McGraw-Hill Companies, Inc. pp.

- Fujita, S., Senda, Y., Nakaguchi, S. and Hashimoto, T. (2001). Multiplex PCR using internal transcribed spacer 1 and 2 regions for rapid detection and identification of yeast strains. *Journal of Clinical Microbiology* 39, 3617-3622.
- Gácsér, A., Hamari, Z., Pfeiffer, I., Varga, J., Kevei, F. and Kucséra, J. (2001). Genetic diversity in the red yeast *Cryptococcus hungaricus* and its phylogenetic relationship to some related basidiomycetous yeasts. *FEMS Yeast Research* 1, 213-220.
- Gomes, D.S., Fragoso, L.C., Riger, C.J., Panek, A.D. and Eleuterio, E.A.C. (2002). Regulation of cadmium uptake by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta* 1573, 21-25.
- Henry, T., Iwen, P. and Hinrichs, S. (2000). Identification of *Aspergillus* species using internal transcribed spacer regions 1 and 2. *Journal of Clinical Microbiology* 38, 1510-1515.
- Howlett, N. and Avery, S. (1997). Induction of lipid peroxidation during heavy metal stress in *Saccharomyces cerevisiae* and influence of plasma membrane fatty acid unsaturation. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 2971-2976.
- Jacobson, E.S., Goodner, A.P. and Nyhus, K.J. (1998). Ferrous iron uptake in *Cryptococcus neoformans*. *Infection and Immunity* 66, 4169-4175.
- Kneer, R., Kutchan, T.M., Hochberger, A. and Zenk, M.H. (1992). *Saccharomyces cerevisiae* and *Neurospora crassa* contain heavy metal sequestering phytochelatin. *Arch. Microbiol.* 157, 305-310.
- Kortba, P., Doleckova, L., De Lorenzo, V. and Ruml, T. (1999). Enhanced bioaccumulation of heavy metal ions by bacterial cells due to surface display of short metal binding peptides. *Appl. and Environ. Microbiol.* 65, 1092-1098.
- Kurtzman, C.P. and Fell, J.W. (2000). *The Yeasts, a taxonomic study*. Elsevier Science B.V.
- Lin, S., Pufahl, R.A., Dancis, A., O'Halloran, T.V. and Cizewski, V. (1997). A role for the *Saccharomyces cerevisiae ATX1* gene in copper trafficking and iron transport. *The Journal of Biological Chemistry* 272, 9215-9220.
- MacDiarmid, C.W., Milanick, M.A. and Eide, D.J. (2002). Biochemical properties of vacuolar zinc transport systems of *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry* 277, 39187-39194.
- Mannarelli, B. and Kurtzman, C. (1998). Rapid identification of *Candida albicans* and other human pathogenic yeasts by using short oligonucleotides in a PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 36, 1634-1641.
- Margesin, R. and Schinner, F. (1997). Efficiency of indigenous and inoculated cold-adapted soil microorganisms for biodegradation

- of diesel oil in alpine soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 2660-2664.
- Pence, N.S., Larsen, P.B., Ebbs, S.D., Letham, D.L.D., Lasat, M.M., Garvin, D.F., Eide, D. and Kochian, L.V. (2000). The molecular physiology of heavy metal transport in the Zn/Cd hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *PNAS* 97, 4956-4960.
- Ramani, R., Gromadzki, S., Pincus, D., Salkin, I. and Chaturvedi, V. (1998). Efficacy of API 20C and ID32C systems for identification of common and rare clinical yeast isolates. *Journal of Clinical Microbiology* 36, 3396-3398.
- Sambongi, Y., Wakabayashi, T., Yoshimizu, T., Omote, H., Oka, T. and Futai, M. (1997). *Caenorhabditis elegans* cDNA for a Menkes/Wilson disease gene homologue and its function in a yeast CCC2 gene deletion mutant. *J. Biochem. (Tokyo)* 121, 1169-1175.
- Sambrook, J., Fritsch, E. and Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Spencer, J.F.T. and Spencer, D.M. (eds). (1997). *Yeasts in natural and artificial habitats*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Stoll, A. and Duncan, J.R. (1996). Enhanced heavy metal removal from waste water by viable, glucose pre-treated *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Biotechnol. Lett.* 18, 1209-1212.
- Sugita, T., Nishikawa, A., Ikeda, R. and Shinoda, T. (1999). Identification of medically relevant *Trichosporon* species based on sequences of internal transcribed spacer regions and construction of a database for *Trichosporon* identification. *Journal of clinical microbiology* 37, 1985-1993.
- Sugita, T., Takashima, M., Ikeda, R., Nakase, T. and Shinoda, T. (2000). Intraspecies diversity of *Cryptococcus laurentii* as revealed by sequences of internal transcribed spacer regions and 28S rRNA gene and taxonomic position of *C. laurentii* clinical isolates. *Journal of clinical microbiology* 38, 1468-1471.
- Suh, S. and Nakase, T. (1995). Phylogenetic analysis of the ballistosporous anamorphic genera *Udeniomyces* and *Bullera*, and related basidiomycetous yeasts, based on 18S rDNA sequence. *Microbiology* 141, 901-906.
- Vande Weghe, J.G. and Ow, D.W. (2001). Accumulation of metal-binding peptides in fission yeast requires *hmt2⁺*. *Molecular Microbiology* 42, 29-36.
- Van Pelt, C., Verduin, C., Goessens, W., Vos, M., Tümler, B., Segonds, C., Reubsæet, F., Verbrugh, H. and Van Belkum A. (1999). Identification of *Burkholderia* spp. In the clinical microbiology laboratory: Comparison of conventional and molecular methods. *Journal of clinical microbiology* 37, 2158-2164.
- Vatamaniuk, O.K., Bucher, E.A., Ward, J.T. and Rea, P.A. (2001). A new pathway for heavy

- metal detoxification in animals. Phytochelatin synthase is required for cadmium tolerance in *Caenorhabditis elegans*. *J. Biol. Chem.* 276, 20817-20820.
- Vatamaniuk, O., Mari, S., Lu, Y. and Rea, P. (2000). Mechanism of heavy metal ion activation of phytochelatin (PC) synthase. *The journal of biological chemistry* 275, 31451-31459.
- Wahyuningsih, R., freisleben, H-J., Sonntag, H-G. and Schnitzler, P. (2000). Simple and rapid detection of *Candida albicans* DNA in serum by PCR for diagnosis of invasive candidiasis. *Journal of Clinical Microbiology* 38, 3016-3021.
- Wainwright, M. (1992). *An Introduction to Fungal Biotechnology*. (J. Wiley and sons, eds).
- Wakabayashi, T., Nakamura, N., Sambongi, Y., Wada, Y., Oka, T. and Futai, M. (1998). Identification of the copper chaperone, CUC-1, in *Caenorhabditis elegans*: tissue specific co-expression with the copper transporting ATPase, CUA-1. *FEBS lett.* 440, 141-146.
- Wilhelmi, B. and Duncan, J. (1995). Metal recovery from *Saccharomyces cerevisiae* biosorption columns. *Biotechnol. Lett.* 17, 1007-1012.
- Xiang, Ch. and Oliver, D. (1998). Glutathione metabolic genes coordinately respond to heavy metals and jasmonic acid in *Arabidopsis*. *The plant cell* 10, 1539-1550.
- Zenk, M.H. (1996). Heavy metal detoxification in higher plants – a review. *Gene* 179, 21-30.

