

UCH-FC
MAG-B
T.853
C.1



DETERMINACIÓN DE ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS EXTRACELULARES Y ANTIMICROBIANAS EN LEVADURAS ANTÁRTICAS.

**Tesis
Entregada A La
Universidad De Chile
En Cumplimiento Parcial De Los Requisitos
Para Optar Al Grado De**

**Magíster en Ciencias Biológicas
Facultad De Ciencias**

Por

EVELIN INÉS TRONCOSO FERNÁNDEZ

**Julio, 2016
Santiago-Chile**



Director de Tesis: Dr. Marcelo Baeza Cancino

FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE
INFORME DE APROBACION
TESIS DE MAGÍSTER

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Magister presentada por la candidata.

EVELIN INÉS TRONCOSO FERNÁNDEZ

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Ciencias Biológicas, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día 26 de Mayo de 2016

Director Tesis:

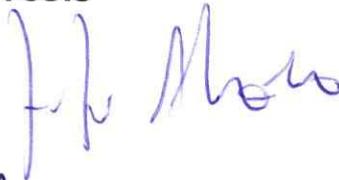
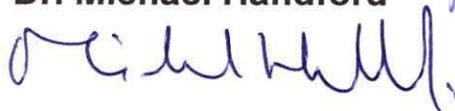
Dr. Marcelo Baeza Cancino



Comisión de Evaluación de la Tesis

Dra. Jenifer Alcaíno

Dr. Michael Handford

DEDICATORIA

A mis tres amores... Paula, Josefa y Alexander.

AGRADECIMIENTOS

Expreso mis profundos agradecimientos a mis colegas, amigos y familiares que de alguna manera, me ayudaron en el desarrollo de esta tesis.

Primero debo agradecer a Alexander, mi marido, por estar siempre dispuesto a ayudarme en cada desafío profesional, por su apoyo incondicional y su paciencia infinita. A mis hijas, Josefa y Paula, que me daban la energía para seguir. Josefita gracias por tus sabias palabras, por ser tan dulce y comprensiva. Paulita gracias por entregarme la paz que necesitaba.

Agradezco a mi tutor Dr. Marcelo Baeza por otorgarme la posibilidad de formar parte de su equipo de trabajo, por su apoyo constante y sabios consejos.

Al Dr. Victor Cifuentes, por abrirme las puertas del Laboratorio de Genética permitiendome formar parte de él.

Agradezco también a todos mis compañeros del laboratorio, por su colaboración, disponibilidad y amabilidad, en especial a Mario, siempre dispuesto a aclarar alguna duda, a tender una mano y a Gabriel agradezco y resalto su compañerismo y preocupación por las personas.

Agradezco a Dony y Salvador, por su excelente disposición, cada vez que tuve alguna duda o necesité una mano estaban ahí. Dony gracias por ser más que una compañera, una amiga. A Rafita por su disposición y amabilidad.

También agradezco a los miembros de la comisión evaluadora la Dra. Jenifer Alcaíno y Dr. Michael Handford, quienes han aportado con su visión crítica en el desarrollo y escrito de esta tesis.

Finalmente mis agradecimiento son para el Instituto Antártico Chileno, Proyecto INACH RT_07-13, que financió este trabajo.

INDICE

Dedicatoria.....	ii
Resumen biográfico.....	iii
Agradecimientos.....	iv
Índice general.....	vi
Índice de tablas.....	ix
Índice de figuras.....	x
Abreviaturas.....	xi
Resumen.....	xii
Abstract.....	xv
1. Introducción.....	1

Hipótesis.....	12
Objetivos.....	13
2. Materiales y Métodos.....	14
2.1 Materiales.....	14
2.2 Métodos.....	16
3. Resultados.....	23
3.1 Análisis de actividades enzimáticas en colonias de levaduras.....	23
3.1.1 Actividad Amilasa.....	23
3.1.2 Actividad Lipasa.....	24
3.1.3 Actividad Esterasa.....	25
3.1.4 Actividad Pectinasa.....	26
3.1.5 Actividad Proteasa.....	27
3.1.6 Actividad Gelatinasa.....	28
3.1.7 Actividad Ureasa.....	29
3.1.8 Actividad celulasa.....	30

3.1.9 Actividad Fosfatasa.....	31
3.1.10 Actividad Glucosa oxidasa.....	32
3.1.11 Actividad Invertasa.....	32
3.1.12 Actividad Xilanasa.....	33
3.2 Análisis de actividades enzimáticas en extractos proteicos.....	35
3.3 Análisis de Actividad Antimicrobiana en colonias.....	38
3.4 Análisis de actividad antimicrobiana en extractos	41
3.5 Presencia de Elementos Genéticos Extracromosómicos (EGEs).....	43
4. Discusión.....	45
4.1 Actividades enzimática extracelulares.....	46
4.2 Actividad Micocida y perfiles de dsRNA.....	52
5. Conclusiones.....	56
6. Referencias.....	57
7. Anexo.....	71

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Enzimas con sus posibles sustratos en la naturaleza y su aplicación industrial	7
Tabla 2. Cepas en estudio y temperaturas de crecimiento.....	15
Tabla 3. Actividades enzimáticas en colonias.....	34
Tabla 4. Actividades enzimáticas en extractos proteicos.....	36
Tabla 5. Ensayos cruzados de actividad antimicrobiana en colonias de levaduras.....	40
Tabla 6. Ensayos cruzados de actividad antimicrobianas con extractos proteicos de levaduras.....	42

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Determinación de halo de actividad invertasa en la cepa control <i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	20
Figura 2. Ensayos de actividad Amilasa.....	24
Figura 3. Ensayos de actividad Lipasa.....	25
Figura 4. Ensayos de actividad Esterasa.....	26
Figura 5. Ensayos de actividad Pectinasa.....	27
Figura 6. Ensayos de actividad Proteasa.....	28
Figura 7. Ensayos de actividad Gelatinasa.....	29
Figura 8. Ensayos de actividad Ureasa.....	30
Figura 9. Ensayos de actividad Celulasa.....	31
Figura 10. Ensayos de actividad Fosfatasa.....	32
Figura 11. Ensayos de actividad Invertasa.....	33
Figura 12. Ensayos de Actividad enzimática por extractos protéicos.....	37
Figura 13. Actividad Antimicrobiana en colonias.....	38
Figura 14. Actividad Antimicrobiana por extractos en placas.....	41
Figura 15. Perfiles de RNA de levaduras antárticas.....	44

ABREVIATURAS

EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
EGE	Elemento genético extracromosómico
GOX	Glucosa oxidasa
ITS	Espaciador transcrito interno
dsRNA	Ácido ribonucleico de doble hebra
SDS	Dodecilsulfato sódico
YM	"Yeast Medium"
YNB	"Yeast Nitrogen Base"

RESUMEN

Los microorganismos que colonizan el continente antártico han desarrollado diferentes adaptaciones para poder sobrevivir en las condiciones imperantes en esta región, lo que atrae una atención considerable debido a su importancia en el ciclo biogeoquímicos de nutrientes, su papel ecológico y porque muchas de las propiedades de estos psicrófilos pueden ser aplicadas en campos biotecnológicos e industriales. Para poder sobrevivir los microorganismos psicrófilos han adaptado su metabolismo para utilizar las fuentes de carbono y energía disponibles y "competir" por ellas debido a la poca biodisponibilidad del alimento. Muchas levaduras sintetizan proteínas o glicoproteínas con efectos tóxicos contra otras levaduras sensibles, lo que les confiere un fenotipo micocida. Se propone que en hábitats naturales la producción de estas toxinas debieran conferir una ventaja en levaduras que poseen este fenotipo por sobre las que no lo poseen (sensibles a las toxinas excretadas), en la competencia por nutrientes. Por ello, el objetivo de este trabajo es caracterizar distintas especies de levaduras aisladas desde muestras de suelo de diferentes islas de la región subantártica y península antártica, de

acuerdo a su capacidad de producir enzimas extracelulares y actividad antimicrobiana.

A partir de la identificación molecular por marcadores ribosómicos de las cepas obtenidas en las muestras de suelos, se evaluó las actividades hidrolíticas extracelulares en placas para 16 cepas de levaduras. Las actividades evaluadas fueron: proteasa, amilasa, lipasa, pectinasa, esterasa, celulasa, xilanasas, ureasa, fosfatasa, glucosa oxidasa, invertasa y gelatinasa. Se evaluó la actividad antimicrobiana usando el método de azul de metileno en placa, en ensayos cruzados entre las distintas especies de levaduras. Además, para establecer la existencia de competencia entre cepas psicrófilas y correlacionar las levaduras que poseían actividad antimicrobiana con la presencia de Elementos Genéticos Extracromosómicos (EGEs) se analizó la existencia de dsRNA en todas las cepas en estudio.

Se obtuvieron resultados positivos para 10 actividades hidrolíticas, en al menos una de las levaduras estudiadas: 1 proteasa, 8 amilasa, 16 lipasa, 6 pectinasa, 9 esterasa, 7 celulasa, 10 ureasa, 15 fosfatasa, 13 invertasa, 5 gelatinasa. Las especies con mayor número de actividades fueron *Cryptococcus victoriae* M5 y *Rhodotorula psychrophenolica* con 7 actividades, y las que presentaron un menor número de actividades fueron: *Rhodotorula pallida*, *Rhodotorula glacialis* M17, *Rhodotorula laryngis* M22 y *Cryptococcus victoriae* D27. Se encontró que las levaduras *Rhodotorula fragaria*, *Rhodotorula*

mucilaginosa, *Cryptococcus sp1.*, *Cryptococcus gilvescens* y *Cryptococcus victoriae D27*, presentan actividad antimicrobiana. Sin embargo, no se obtuvieron resultados coincidentes al comparar los perfiles de actividad antimicrobiana de las diferentes especies de levaduras y su contenido de dsRNAs.

Los resultados muestran que las levaduras exhibieron un conjunto eficiente de enzimas extracelulares que actúan a bajas temperaturas, las que son reflejo de las diversas adaptaciones que las levaduras poseen para poder sobrevivir a este clima extremo. Los resultados sugieren además la existencia de competencia entre las especies por medio de la actividad fungistática que presentaron las cepas analizadas.

ABSTRACT

The microorganisms that colonize the Antarctic continent have developed different adaptations to survive in the conditions prevailing in this region, which attracts considerable attention because of their importance in the biogeochemical cycling of nutrients and their ecological role. In addition, psychrophilic microorganisms can be applied in biotechnological and industrial fields. Cold adapted microorganisms must adapt their metabolism to use sources of carbon and energy available, due to the low bioavailability of food, to "compete" for them. Many yeasts synthesize proteins or glycoproteins with toxic effects against other sensitive yeasts, which gives them a mycocidal phenotype. It is proposed that in natural habitats, the production of these toxins should confer a competitive advantage in competition for nutrients and space. Therefore, the objective of this work was to characterize different species of yeasts isolated from soil samples from different islands of the sub-Antarctic and Antarctic Peninsula, considering their ability to produce extracellular enzymes and antimicrobial activity.

The extracellular activities tested were: protease, amylase, lipase, pectinase, esterase, cellulase, xylanase, urease, phosphatase, glucose oxidase, invertase and gelatinase. The antimicrobial activity was evaluated in cross-test assays among the different yeast species, using the method of methylene blue in plates. One of the genetic determinants for the production of antimicrobials in yeasts are extrachromosomal double stranded RNA molecules. The existence of this kind of genetic element was evaluated in all yeast species studied.

Positive results were obtained for 10 hydrolytic activities in at least one yeast species: 1 protease, 8 amylases, 16 lipases, 6 pectinases, 9 esterases, 7 cellulases, 10 ureases, 15 phosphatases, 13 invertases and 5 gelatinases. The species with the highest number of activities were *Cryptococcus victoriae* M5 and *Rhodotorula psychrophilica* with 7 activities, and the ones presenting fewer activities were: *Rhodotorula pallida*, *Rhodotorula glacialis* M17, *Rhodotorula laryngis* M22 and *Cryptococcus victoriae* D27. It was found that the yeasts *Rhodotorula fragaria*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Cryptococcus* sp1, *Cryptococcus victoriae*, and *Cryptococcus gilvoscens* D27, have antimicrobial activity; however, the phenotype was not encoded by dsRNAs molecules.

The results showed that yeasts possess an efficient set of extracellular enzyme activities that work at low temperatures, which reflect the various adaptations that yeasts possess in order to survive this extreme weather. The results also suggest the existence of competition between species through fungistatic activity showed in the tested strains.

1. INTRODUCCIÓN

El continente antártico se caracteriza por poseer clima, habitats y una geografía extrema, y es considerado el clima más frío y seco en la tierra. Entre las características que prevalecen en este continente son las bajas temperaturas (con una media mensual siempre por debajo de los 0° C), sequedad extrema, frecuentes ciclos de hielo/deshielo, bajas precipitaciones y baja disponibilidad de nutrientes, así como una alta radiación UV (Onofri y cols., 2007a; Margesin y Miteva, 2011). Con estos antecedentes es lógico pensar que estas condiciones extremas forman una barrera para cualquier forma de vida microbiana. Sin embargo, se ha revelado que proporciona un hábitat para una diversidad de especies de microorganismos (Frisvad, 2008; Yergeau Kowalchuk 2008; Carrasco y cols., 2012). Los microorganismos más estudiados desde ambientes fríos corresponden a bacterias, siendo menor el estudio de levaduras (Margesin y Miteva, 2011).

Características de los Microorganismos adaptados al frío

Convencionalmente, los microorganismos adaptados al frío se pueden dividir en psicrófilos obligados y facultativos. Los primeros presentan una temperatura óptima para el crecimiento de alrededor de 15° C, una temperatura máxima $\leq 20^{\circ}$ C y una temperatura mínima para el crecimiento de 0° C o inferior (Morita, 1975; Arthur y Watson, 1976). En contraste, microorganismos que crecen a 0° C, pero que presenta una temperatura óptima para el crecimiento a 20-30°C se llaman psicrófilos facultativos o psicrotolerantes (Vishniac, 1987; Cavicchioli y Tortzen, 2000; Raspor y Zupan, 2006).

Se han encontrado varias especies de levaduras que colonizan con éxito el continente antártico. Algunas de estas levaduras son autóctonas antárticas, psicrófilos obligados, otros han sido traídos por las corrientes de viento y mar, así como por aves migratorias, los seres humanos y otros animales, que de vez en cuando visitan este hábitat. Los últimos grupos son en su mayoría psicrotolerantes, que igualmente crecen a temperatura ambiente ($25 \pm 2^{\circ}$ C) aunque quedan en estado latente durante mucho tiempo a bajas temperaturas.

La capacidad de tolerar la baja temperatura, alta salinidad, alta radiación UV y otras condiciones extremas son adaptaciones de las levaduras que se encuentran en ambientes antárticos (Ruisi y cols., 2007; Shivaji y Prasad, 2009, Villarreal y cols., 2016). Algunos de estos mecanismos de adaptación al clima frío incluyen un aumento en las concentraciones de trehalosa y poliol intracelulares, lípidos de membrana insaturados (mantenimiento de la fluidez de

la membrana celular) así como la secreción de proteínas anticongelantes y enzimas activas a bajas temperaturas (Robinson, 2001; Ruisi y cols., 2007).

Estos microorganismos extremófilos pueden utilizar biopolímeros de carbonos complejos como fuentes de energía, debido a que son capaces de sintetizar enzimas extracelulares que son activas a bajas temperaturas (enzimas adaptadas al frío). En este sentido, los hongos son conocidos por producir una gama de enzimas extracelulares y otros metabolitos secundarios. La inversión en la producción de estas enzimas puede ser un elemento importante de la estrategia de supervivencia de estos hongos en los suelos de la Antártica marítima. Por lo tanto, se considera que las levaduras psicrófilas juegan un papel importante en el ciclo de nutrientes y en el proceso de producción de biomasa en los ecosistemas fríos (Margesin y cols., 2002).

Vida en la Antartica

La abundancia y diversidad de organismos disminuye con la altitud y latitud desde la costa hasta la meseta continental (Pickard y Seppelt, 1984; Kappen, 1993; Broady, 1996), existiendo una mayor biodiversidad en las zonas costeras (Convey y cols., 2014). Este ambiente frío está dominado por una gran variedad de microorganismos tales como arqueas, bacterias, hongos, actinomicetos y algas (Margesin y Miteva, 2011). Los organismos macroscópicos presentes son invertebrados del suelo, incluyendo Diptera, Acari, Collembola, Nematoda, Rotíferos, Tardígrados y Protista (Block, 1984; Adams y cols., 2006; Convey, 2013) y las plantas inferiores, incluyendo musgos y hepáticas (Smith, 1984;

Convey, 2013). Los hongos son un grupo de microorganismos importantes en los ecosistemas de suelos de la Antártica (Yergeau y cols., 2007; Onofri y cols, 2007b), participando en la descomposición de la materia orgánica muerta y el reciclaje de nutrientes de las plantas (Read y Pérez-Moreno, 2003). Las comunidades fúngicas antárticas incluyen representantes de géneros de los principales levaduras; *Cryptococcus*, *Candida*, *Rhodotorula*, *Leuconeurospora*, *Mrakia*, *Wickerhamomyces*, *Dioszegia*, *Holtermanniella* (Carrasco y cols, 2012).

La mayoría de los hongos microscópicos antárticos son cosmopolitas; algunos de ellos son transportados como propágulos a la Antártica, pero no pueden crecer en las condiciones de la Antártica. Mientras que otros, como se mencionó anteriormente, están bien adaptados y son capaces de crecer y reproducirse incluso a bajas temperaturas. La distribución de los hongos en la Antártica está relacionado con la distribución de los diferentes sustratos tales como suelos, maderas, rocas, vertebrados e invertebrados (Bridge y Spooner, 2012). Con respecto a la cantidad de carbono orgánico del suelo antártico estos son mayores a lo largo de la Península Antártica, intermedio en el este de la Antártida, y la menor cantidad en las montañas Transantárticas. Las aves marinas aportan grandes cantidades de estiércol en los ambientes terrestres y son el factor que influye en los perfiles de niveles de carbono orgánico del suelo antárticos, mientras que en los valles secos de McMurdo, por ejemplo, los perfiles de carbono orgánico del suelo están relacionados con la proximidad a las fuentes de agua (Bockheim J y Haus NW, 2014). A esto se puede sumar

que las macroalgas además de ser importantes productores primarios, tienen un papel clave en los flujos de carbono orgánico en la Antártida (Nedzarek y Rakusa-Suszczewski, 2004). Fuentes de nutrientes externos tales como nitrógeno depositados por los pingüinos y otros vertebrados, también, tienen un papel importante en los ecosistemas terrestres antárticos (Greenfield, 1992; Bokhorst y cols., 2007).

Enzimas adaptadas al frío

La producción de metabolitos extracelulares es una característica generalizada de la biología microbiana, estos compuestos contribuyen a diversas funciones que incluyen la adquisición de recursos, la protección, la competencia y las interacciones inter e intraespecífica. Los hongos son conocidos por producir una gama de enzimas extracelulares, en particular, hidrolasas, que ayudarán en su adquisición de nutrientes desde el medio ambiente circundante, ya que estas enzimas degradan la materia orgánica del suelo y los productos posteriormente son absorbidos por las células productoras. Además, se ha informado que levaduras del suelo contribuyen significativamente en la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos en la Antártida (Ferrari y cols., 2011).

Las enzimas psicrófilas son hasta diez veces más activas a temperaturas bajas y moderadas que sus homólogas mesófilas, requieren menor energía de activación y se inactivan a temperaturas superiores a la óptima de catálisis (Feller y Gerday, 2003). En este contexto, enzimas microbianas activas a bajas

temperaturas han atraído una atención creciente en los últimos años para su uso industrial (Tabla 1) (Joseph y cols., 2008; Quanfu y cols., 2012). Una de las principales ventajas de su uso está relacionado con disminución de gasto de energía y los costes de procesamiento asociados con etapas de calentamiento industrial. El uso de enzimas psicrófilas hidrolíticas activas a bajas temperaturas tales como proteasas, lipasas, amilasas y celulasas en la composición de los detergentes sería de gran ayuda para el lavado de la ropa en frío. De esta forma se reduciría el consumo de energía y el desgaste de las fibras textiles. Enzimas psicrófilas que degraden polímeros también podrían ser útiles en la industria del papel, ayudar en la manipulación de la pasta o en los esfuerzos de biorremediación. En la industria alimentaria, la utilización de pectinasas a temperaturas más bajas, son útiles para la clarificación de los zumos de frutas o el tratamiento de quesos. Aparte de estos ejemplos, tienen potencial para otras aplicaciones interesantes tales como la hidrólisis de lactosa en la leche utilizando β -galactosidasa; mejora en el sabor de la carne refrigerada y reblandecimiento de lana o limpieza de lentes de contacto con proteasas; mejora de productos de panadería usando glicosidasas (por ejemplo, amilasas, proteasas y xilanasas). Lipasas activas a bajas temperaturas pueden ser una buena alternativa a las enzimas mesofílicas en la industria cervecera, del vino o en la elaboración de quesos (Kumar y cols., 2011).

Tabla 1. Enzimas con sus posibles sustratos en la naturaleza y su aplicación industrial

Enzimas	Sustrato	Aplicación industrial	Industria
Amilasa	Almidón	Pan Almidonar en frío ropa Ayuda a la digestión Elimina manchas	Panadería Textil Farmacéutica Lavandería
Invertasa	Sacarosa	Relleno blanco de caramelos	Confitería
Gloc. oxidasa	Glucosa	Elimina glucosa y oxígeno Determinación de glucosa en suero y plasma sanguíneo (papeles para pruebas de la diabetes)	Alimentaria Farmacéutica
Lipasa	Lípidos (fitoplancton, sedimentos marinos)	Degradar grasas	Lavandería y Lechería
Celulasa	Celulosa (plantas)	Suavizar y abrillantar tejidos; Detergente. Modificación de masas	Lavandería Panadería
Pectinasa	Pectina (plantas)	Prensado, clarificación del vino. Tratamiento de quesos	Bebidas y Frutículas Lecherías
Proteasa	Proteínas	Pan Ablandador de carnes Limpieza de heridas Detergente doméstico	Panadería Cárnica Medicina Lavandería
Fosf. Alcalina	Restos orgánicos	Producción de leche	Lechería e industrias de biocombustibles y de disolvente
Xilanasa	Xilanos (vegetales)	Blanqueamiento de la pulpa en la fabricación del papel; Clarificación de jugos y vinos; Modificación de masas.	Papelera Bebidas Panadería.
Ureasa	Urea	Calidad de la leche. Fabricación de bebidas alcohólicas (medida de los niveles de urea)	Lechería Bebidas
Gelatinasa	Proteínas	Biomarcadores de varias enfermedades y síndromes metabólicos	Medicina

Antimicrobianos “Killer” y su relación con Elementos genéticos extracromosómicos (EGEs) en levaduras

Los microorganismos que compiten por recursos limitados han establecido un amplio arsenal de compuestos letales destinados a la inhibición o la destrucción de los competidores. Estos antimicrobianos incluyen antibióticos clásicos y sustancias de peso molecular bajo/ medio, con frecuencia son péptidos antibióticos e incluso grandes complejos de proteína denominada bacteriocinas (proteínas bactericidas) y toxinas asesinas (proteínas fungicidas). Asumiendo la existencia de competencia entre los microorganismos por alimento y espacio en el ambiente, es de esperar que algunas levaduras produzcan compuestos antimicrobianos, que les otorguen una ventaja sobre otras levaduras. Éstos han sido descritos en diversos géneros de levaduras (Schmitt y Breinig, 2002). Generalmente corresponden a compuestos proteicos activos a valores de pH entre 3 a 5,5 (Golubev y Shabalin, 1994; Marquina y cols., 2002).

El descubrimiento de los antibióticos se remonta a principios del siglo XX y revolucionó los tratamientos médicos contra la contaminación; sin embargo, la secreción de proteínas fungicidas no llegó a ser evidente hasta la década de 1960 con el descubrimiento de la primera levadura con fenotipo micocida (fenotipo “killer”) en *Saccharomyces cerevisiae*, donde se dio a conocer que los virus de ARN de doble cadena constituyen la base molecular de la secreción de la toxina (Bevan y cols., 1973). En la actualidad, somos conscientes de una amplia cantidad de “toxinas asesinas” procedentes tanto de levaduras

ascomycetes y basidiomycetes. Los tamaños de las toxinas van desde pequeños polipéptidos codificados cromosómicamente a grandes complejos de proteína di o trimérica, siendo estas últimas codificadas por elementos de ADN o ARN extranucleares de origen viral.

Los virus de *S. cerevisiae* "killer" pertenecen a la familia Totiviridae. Persisten como un par de dos virus encapsulados por separado en partículas en el citoplasma. Una de ellas es la L-A virus "helper" que está presente en la mayoría de las cepas de levaduras y codifica la principal proteína de la cápside (Gag) y una ARN polimerasa dependiente de ARN. Por otra parte un dsRNA satélite llamado M que sólo existe en las levaduras "Killer" y codifica la toxina, su replicación depende del virus L-A. (Schmitt y Breinig, 2006).

El estudio de toxinas asesinas ha despertado gran interés debido a la posibilidad de encontrar antimicrobianos de importancia en medicina, en el tratamiento de infecciones fúngicas (Conti y cols., 1998) y para eliminar microorganismos indeseables en fermentaciones industriales o en la conservación de alimentos (Sulo y cols., 1992; Sulo y Michalcakova, 1992).

Islas del archipiélago Shetland del Sur

Se caracterizan por ser zonas de gran riqueza biológica, con una biota variada, algunas poseen una amplia gama de comunidades vegetales con la fauna de invertebrados asociada; también está particularmente bien representada la fauna de vertebrados. Además, poseen diversidad de paisajes desde playas con fumarolas, áridas laderas volcánicas, hasta numerosos

riachuelos y lagunas en verano.

Estudios demuestran que las variables geoquímicas del suelo difieren significativamente entre distintos lugares muestreados en la Antártica, probablemente como resultado de la variación en la formación del paisaje, depósitos orgánicos de la cubierta vegetal, insumos ornitológicos y desplazamiento en la acumulación de nutrientes debido al derretimiento del agua (Velasco-Castrillon, 2014).

Origen de las muestras y almacenaje.

En este trabajo se analizaron distintas especies de levaduras, recolectadas por nuestro grupo de trabajo durante la campaña de enero de 2014 realizada con el apoyo del Instituto Antártico Chileno. Corresponden a muestras de suelo recolectadas de distintos puntos pertenecientes a las Islas de Shetland del Sur (Isla Decepción, Isla Snow, Punta Hannan, Isla Dee, Isla Nelson, Isla Litchfield, Base Prat y península de Coppermine). Estas islas comprenden suelos con una variedad de biota marina y terrestre, incluyendo a una de las islas más visitadas desde la llegada del hombre a la Antártica (Isla Decepción). Las muestras fueron recolectadas en zonas de altura pertenecientes al borde costero, ya que son suelos desprovistos de hielo y al estar en altura los hace menos intervenidos. Algunas de estas zonas son ASPAS (*Antarctic Specially Protected Area*) por lo que allí se encuentra flora y fauna especialmente protegida. Las muestras se almacenaron en tubos falcon a -20°C durante el período que duró la campaña hasta la llegada al laboratorio

donde se realizaron los estudios (Laboratorio de genética- UCH), una vez aquí, se guardaron a -80°C hasta su análisis. Los estudios incluyeron la capacidad de utilizar y competir por fuente de carbono y energía. Estas aproximaciones se realizaron evaluando la producción de enzimas hidrolíticas extracelulares y actividad antimicrobiana.

HIPÓTESIS

Aunque los posibles sustratos utilizables como fuente de carbono en suelo antártico son desconocidos, se puede asumir que son variables entre las distintas zonas desde donde se aislaron las levaduras.

Basado en esto se puede hipotetizar que las diferentes especies de levaduras aisladas desde estas islas se diferenciarán en cuanto a las enzimas extracelulares que producen. Además, entre ellas existirían algunas levaduras que matan o inhiben el crecimiento de otras levaduras, dicha actividad estaría codificada en elementos genéticos extracromosómicos.

OBJETIVOS

Objetivo general

1. Caracterizar las levaduras obtenidas respecto de la producción de actividades hidrolíticas extracelulares y antimicrobianas, y la presencia de elementos genéticos extracromosómicos.

Objetivos específicos.

1. Determinar actividades enzimáticas extracelulares producidas por colonias de levaduras y por extractos protéicos.
2. Determinar actividad antimicrobiana por colonias de levaduras y extractos protéicos.
3. Determinar la presencia o ausencia de dsRNA.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Materiales

Cepas de levaduras: las levaduras utilizadas en este trabajo con sus respectivas temperaturas de crecimiento se presentan en la Tabla 2. Ellas fueron obtenidas e identificadas previamente por nuestro grupo de trabajo.

Cepas - Controles: Se utilizó como control positivo la cepa *Dioszegia fristingensis* (T11Df) para las actividades amilasa, celulasa, pectinasa, xilanas. *Wickerhamomyces anomalus* para las actividades esterasa, lipasa, fosfatasa, y proteasa. *Leucosporidiella fragaria* como control de gelatinasa. Para actividad glucosa oxidasa control positivo *Candida parapsilosis* y *Rhodotorula mucilaginosa* como control de actividad invertasa y ureasa. Estas cepas fueron utilizadas en trabajos previos por nuestro laboratorio.

Tabla 2. Cepas en estudio y temperaturas de crecimiento.

Especies	Temperatura Optima (°C)	T° Rango crecimiento (°C)
<i>Rhodotorula pallida</i>	22	10-30
<i>Cryptococcus sp.1</i>	4 /10	4-22
<i>Cryptococcus gilvescens</i>	4/10	4-22
<i>Cryptococcus victoriae</i> D27	10	4-30
<i>Cryptococcus victoriae</i> M5	22	4-30
<i>Cryptococcus sp.2</i>	22	4-22
<i>Leuconeurospora sp.</i>	15	4-22
<i>Mrakia frigida</i>	22	4-37
<i>Rhodotorula fragaria</i>	10	4-15
<i>Rhodotorula glacialis</i> M17	15	4-22
<i>Rhodotorula glacialis</i> M22	22	4-30
<i>Rhodotorula laryngis</i> M22	22	4-22
<i>Rhodotorula laryngis</i> D27	22	4-37
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	10	4-22
<i>Rhodotorula psychrophenolica</i>	22	4-37
<i>Sporobolomyces roseus</i>	22	10-30

Análisis previo a este trabajo, fueron la identificación de las cepas aquí mostradas por medio de la amplificación de D1/D2 y región ITS1-5.8S-ITS2 del rDNA; además de la estimación de sus temperaturas óptimas y rangos de las temperaturas a las que crecen. Las cepas pertenecen en su gran mayoría al phylum Bacidiomycetes, sólo una pertenece al phylum Ascomycete (*Leucoeurospora* sp).

Reactivos químicos: Los componentes de los medios de cultivo o reactivos químicos puntuales, se adquirieron de Sigma Chemical, Merk y Difco Laboratorios.

Ácidos nucleicos. Como marcador de peso molecular se utilizó el marcador 1 kb adquirido en New England Biolabs.

2.2 Métodos

Métodos de biología molecular

Electroforesis se realizó de acuerdo al manual de Sambrook y Russell, 2001

Medio de cultivo

Para preservar y crecer levaduras se utilizó el medio de cultivo YM (0,3% extracto de levadura, 0,3% extracto de malta y 0,5% peptona) suplementado con 1% glucosa.

Ensayos de actividad enzimática extracelular: Todos los ensayos se realizaron en medio YM sólido suplementado con 1% de glucosa (a menos que se especifique lo contrario) y el sustrato adecuado para la actividad enzimática. Las placas se incubaron a la temperatura óptima de crecimiento de la levadura aislada (Tabla 2), y las actividades enzimáticas fueron determinadas como se describe a continuación.

Actividad Amilasa. Las células se cultivaron en medio que contenía 0,2% de almidón soluble. A las placas se les agregó 1 ml de solución de yodo, y la actividad positiva fue definida como un halo claro alrededor de la colonia en un fondo púrpura (Hankin y Anagnostakis.,1975)

Actividad Celulasa. Las células fueron cultivadas en medio suplementado con 0,5% de carboximetilcelulosa (Strauss, 2001). Después de la incubación, a las placas se les agregó 1 mg / ml de solución de rojo Congo, que se dejó reaccionar por 15 min. Posteriormente, a las placas se les agregó NaCl 1M (lavado) durante 15 min. Actividad celulasa positiva se observa como un halo claro alrededor de la colonia en un fondo rojo (Teather y Wood,1982).

Actividad Lipasa. Las células se cultivaron en medio que contenía 1% tributirin. La actividad lipasa se indicó por la presencia de un halo claro alrededor de la colonia (Gopinath y cols., 2005)

Actividad Proteasa. Las células se cultivaron en medio suplementado con 2% de caseína a pH 6,5. La actividad proteasa positiva se indicó por la presencia

de un precipitado de color blanco alrededor de la colonia (Strauss y cols., 2001).

Actividad Xilanasa. Las células se cultivaron en medio suplementado con 0,5% de xilano (McCarthy y cols., 1985). Actividad xilanasa se identificó por la presencia de un halo claro alrededor de la colonia.

Actividad Pectinasa. Células se cultivaron en medio YNB 0,67%, pH 7,0, que contenía 1% pectina (Buzzini y Martini, 2002). A las placas se les agregó bromuro de hexadeciltrimetilamonio 1%, y la actividad se indicó por un halo claro alrededor de la colonia.

Actividad Esterasa. Las células se cultivaron en medio compuesto de 1% de Bacto peptona, 0,5% NaCl, 0,4% de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y 1% de Tween 80 (Slifkin, 2000). La actividad esterasa se observó por un precipitado de color blanco alrededor de la colonia.

Actividad Ureasa. Las células se cultivaron en medios suplementados con una solución de urea al 0,5%. A las placas se les agregó azul de bromotimol al 1% y la actividad se observó por la presencia de un halo de color azul alrededor de la colonia (Hankin y Anagnostakis, 1975).

Actividad Fosfatasa. Las células se cultivaron en medios que contenían fenolftaleína difosfato 0,01M. A las placas se les agregó hidróxido de amonio. Actividad fosfatasa se indicó por la presencia de un halo fucsia alrededor de la colonia (Hankin y Anagnostakis, 1975).

Actividad Glucosa Oxidasa. Las células se cultivaron en medio YEP. A las placas se les agregó buffer m-Mclivaine pH 7,0 y la actividad se indicó por la presencia de un halo café alrededor de la colonia (Hodgkins y cols., 1993).

Actividad Gelatinasa. Las células se cultivaron en placas con medio YM, que en lugar de agar, fue suplementado con gelatina al 16% para su gelificación. Sobre una base de medio YM-agar al 1,5%. La actividad positiva se observó por un cambio de textura en el medio alrededor de la colonia.

Actividad Invertasa. Las células se cultivaron en medio YNB 0,67%, sacarosa 2%, bacto agar 1,5% y verde bromocresol 0,003%. La actividad se observó al obtener un viraje de color de verde a amarillo en la placa.

Determinación de los halos de actividad enzimática Los halos de actividad (de degradación o precipitación) y el diámetro de las colonias fueron medidos con una regla con el fin de calcular el tamaño de los halos de hidrólisis. Se calculó el tamaño de los halos de hidrólisis aplicando la formula $A-B=2C$, como se observa en la Figura 1; donde A hace referencia al diámetro de la colonia más el halo de hidrólisis, B es el diámetro de la colonia y C es el resultado de la diferencia de las dos medidas dividido en 2, equivalente al halo de actividad.

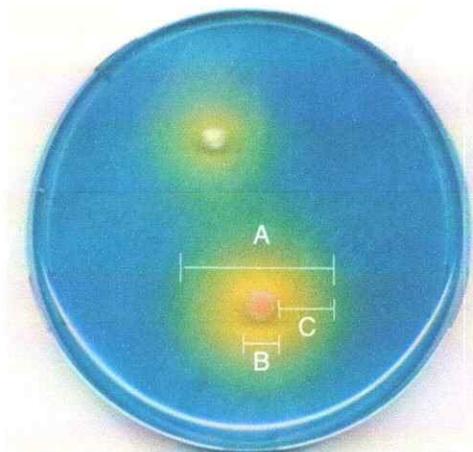


Figura 1. Determinación de halo de actividad invertasa en la cepa control *Rhodotorula mucilaginosa*. (A) diámetro del halo de hidrólisis; (B) diámetro de la colonia y (C) halo de actividad resultado de las diferencias entre A y B $(A - B)/2$

Obtención de proteínas extracelulares totales

Los cultivos celulares de 100 ml se centrifugaron a 6000g por 10 min y a 4°C. El sobrenadante se filtró con una membrana de fluoruro de polivinilideno de 0,45mm de diámetro (Millipore). Posteriormente, se agregó sulfato de amonio (80% final) en agitación a 4°C por 40 min para precipitar las proteínas presentes en el sobrenadante. Se centrifugó durante 15 min a 10000g y el pellet obtenido se suspendió en 4 ml de Buffer Tris-HCl (100 mM pH 7). Las muestras se dializaron (10 kDa tamaño corte) en 1000 ml de Buffer Tris-HCl (100 mM, pH 7) durante 12 h a 4°C. Finalmente, las proteínas se almacenaron a -80°C para su posterior análisis en la determinación de actividades hidrolíticas extracelulares y antimicrobiana de las cepas en estudio.

Análisis de actividad antimicrobiana

Para los ensayos se confeccionaron "césped celulares" mezclando 25 ml de medio YM 1,5 % agar fundido, 250 μ l de 0,3% de azul de metileno y 2,5 ml de cultivo celular de levaduras, el cual se vertió sobre una placa de Petri y se incubó a temperatura ambiente hasta que gelificara. Sobre estos césped se sembraron las levaduras a ensayar o se confeccionaron pocillos de 1 cm, en los cuales se depositó 100 μ l de extracto proteico. Una zona de inhibición alrededor del inóculo indicó producción de toxina (Baeza y cols., 2010; Schmitt y Tipper, 1990).

Extracción de RNA total

Los pellets celulares obtenidos de los cultivos, se resuspendieron en 400 μ L de buffer de lisis (Acetato de Na 0,02 M, pH 5,5 + SDS 0,5% + EDTA 1 mM, en agua DEPC 0,1%). Se adicionó 250 μ l de perlas de vidrio de 0,5 mm de diámetro (BioSpec Products, Inc.) y se agitó por 1,5 min en el equipo "Minibead beeter" (Biospec). Pasado el tiempo se agregó 800 μ L de TriReagent, manteniendo una agitación constante por 2 min, posteriormente se procedió a incubar a temperatura ambiente (10 min). Se agregó 400 μ L de cloroformo y se agitó manualmente por 15 s y se incubó a T° ambiente por otros 10 min. Se procedió a centrifugar 15 min a 14.000 g, a 4 °C. Se rescató la fase acuosa, se agregaron 250 μ L de agua libre de nucleasas y finalmente se adicionó 600 μ L de isopropanol. Se realizó incubación a temperatura ambiente (15 min) para

proceder a centrifugar 15 min a 14000 g, 4°C. Se lavó el pellet con Etanol 75%. Una vez seco, el pellet se resuspendió en 20 µl agua libre de nucleasas. Las muestras de RNA total fueron tratadas con Nucleasa S1 y analizadas en geles de agarosa al 1%.

3. RESULTADOS

3.1. Análisis de actividades enzimáticas en colonias de levaduras

Para llevar a cabo este objetivo, todas las cepas previamente, se refrescaron y crecieron en placas, a sus respectivas temperaturas óptimas de crecimiento. Posteriormente todas las cepas fueron sembradas en las placas correspondiente para evaluar cada una de las actividades enzimáticas estudiadas, cuya elaboración se detalla en metodología. La presencia de un halo claro u opaco reveló una actividad enzimática, donde el diámetro del halo se utilizó como una aproximación de la dimensión de la actividad enzimática por parte de la cepa.

3.1.1 Actividad Amilasa: El almidón al estar en contacto con el yodo da una coloración azulada. Si el almidón es degradado, el color azulado disminuye comprobando la acción de la enzima, por lo que la presencia de un halo claro alrededor de la colonia revela una actividad enzimática extracelular positiva. Bajo estos parámetros, las

cepas que mayor actividad presentaron fueron: *Leuconurospora sp.*, *Mrakia frigida* y *Cryptococcus sp.2* .

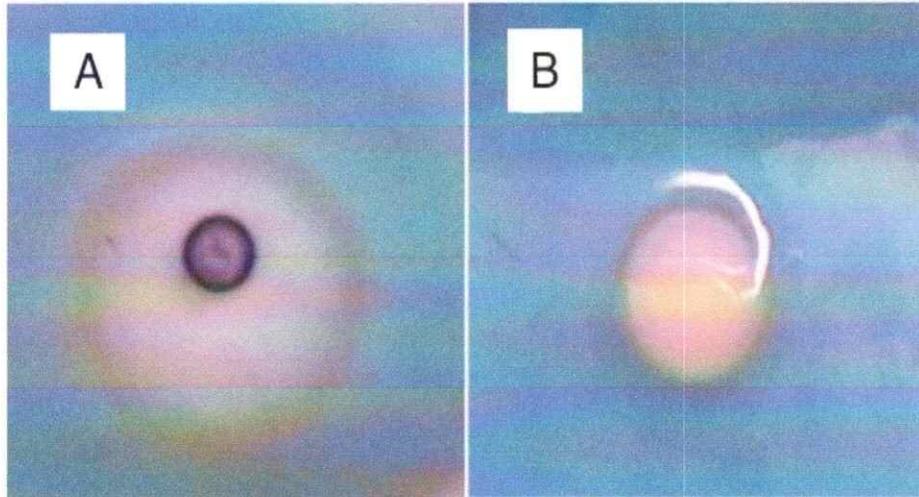


Figura 2. Ensayos de actividad Amilasa. En la imagen **A)** se muestra actividad enzimática extracelular positiva de la cepa *M. frigida* con un halo de 10 mm. En la imagen **B)** *R. pallida* donde no se percibe halo.

3.1.2 Actividad Lipasa: Esta actividad se ve representada por un halo opaco alrededor de las colonias. El halo traslúcido se debe a la hidrólisis de los enlaces éster formados entre los ácidos grasos y el glicerol formándose un precipitado de los ácidos grasos, debido a que el medio fue enriquecido con tributirín (triglicérido). Esta actividad se mostró positiva para todas las cepas estudiadas, pero las que mostraron un halo mayor fueron: *Sporobolomyces roseus*, *Rhodotorula pallida*, *Cryptococcus sp.2*

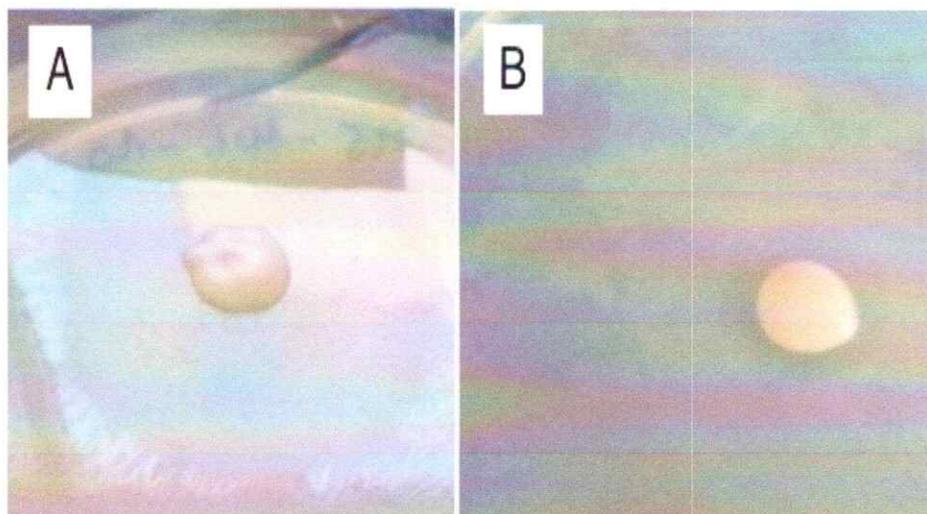


Figura 3. Ensayos de actividad Lipasa. En **A)** *Cryptococcus sp.2* con un halo de 13 mm, en contraste se puede apreciar en la imagen **B)** un halo pequeño (5 mm) de la cepa *Cryptococcus sp.1*.

3.1.3 Actividad Esterasa: La actividad positiva se ve representada como un halo opaco alrededor de la colonia formado de cristales insolubles producto de los ácidos grasos liberados del sustrato utilizado Tween 80 unidos con el calcio incorporado en el medio (CaCl_2). Fueron 10 las cepas que presentaron halo de actividad siendo *Cryptococcus victoriae* M5 la que presentó el halo mayor (Figura 4).



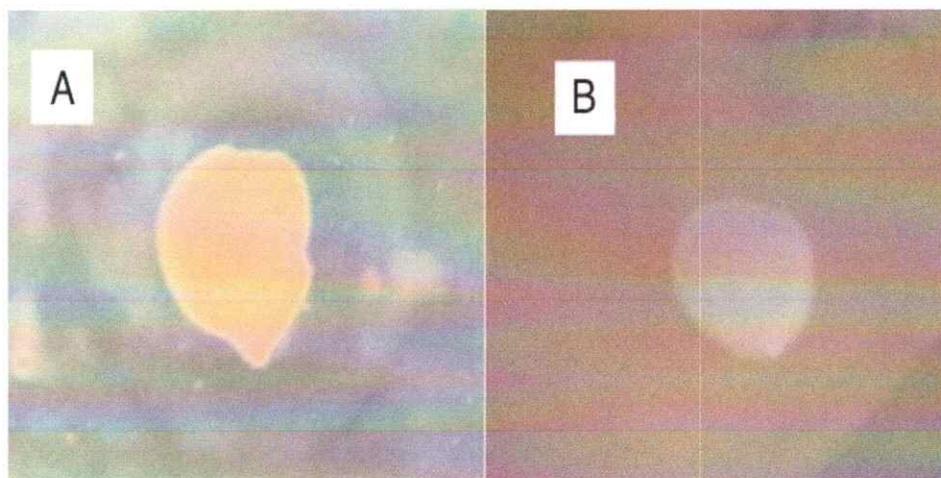


Figura 4. Ensayos de actividad Esterasa. En **A)** *C. victoriae* M5 con un halo de 10 mm. En **B)** *Rhodotorula glacialis* M17, ausencia de halo.

3.1.4 Actividad Pectinasa: Para revelar la actividad pectinolítica, se cubrió la superficie del medio en la placa con bromuro hexadeciltrimetilamonio. Este reactivo precipita la pectina intacta en el medio, de modo que las zonas transparentes alrededor de las colonias, contrastan con el resto de la superficie que es opaca e indican la degradación de la pectina. Las cepas más representativas corresponden a: *Cryptococcus sp.2*; *M. frígida* y *Rhodotorula glacialis* M22.

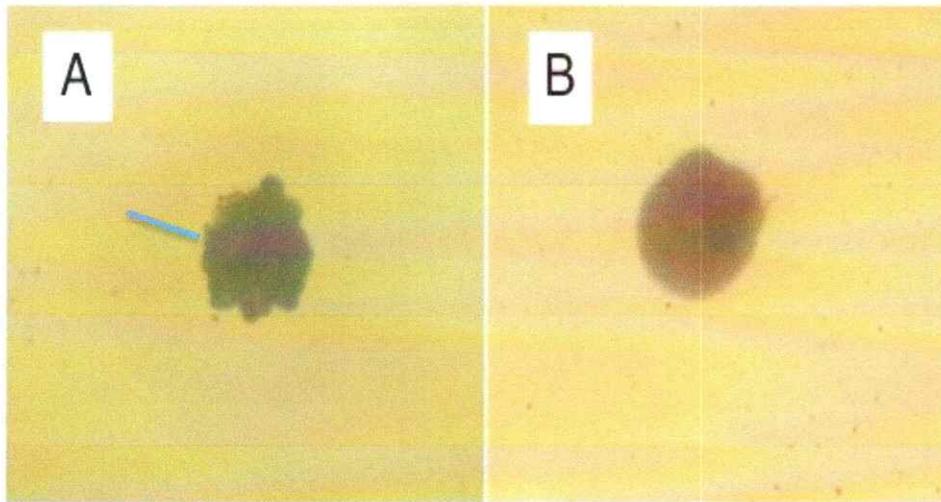


Figura 5. Ensayos de actividad Pectinasa. En **A)** *Rh. glacialis* M22 cuyo halo alcanza los 10 mm (señalado con barra azul) y en **B)** *Rhodotorula laryngis* D27 con ausencia de halo.

3.1.5 Actividad Proteasa: En esta actividad las colonias proteolíticas se evidencian porque durante el desarrollo activo, las proteasas difunden en el agar degradando la caseína, se genera un producto de alto peso molecular que forma un precipitado blanquecino. Tanto mayor sea el área de difusión de las proteasas, mayor será el diámetro del halo de precipitado. De todas las cepas analizadas, sólo una presentó esta actividad, *S. roseus*, con un halo de actividad de 8 mm.

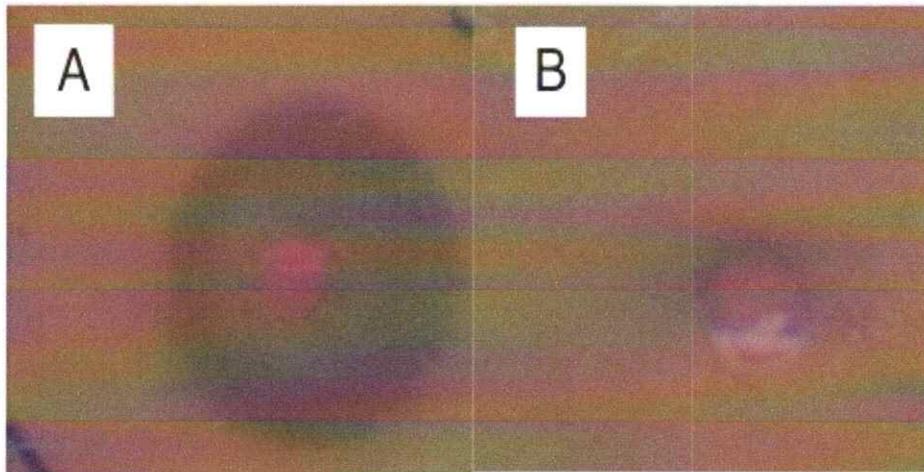


Figura 6. Ensayos de actividad proteasa. En **A)** se observa a *S. roseus* cuyo halo alcanza los 8 mm y en **B)** *Rhodotorula laryngis* M22 con ausencia de halo.

3.1.6 Actividad Gelatinasa: La gelatina es una proteína que tiene la capacidad de gelificar. Cuando es hidrolizada por gelatinasa, pierde su característica de gelificar, lo que da lugar a halos de degradación. Las cepas que presentaron una mayor actividad fueron: *M. frigida*, *Rh. glacialis* M22 y *Rh. laryngis* M22, quienes presentaron halo de 10, 7 y 5 mm cada una respectivamente.

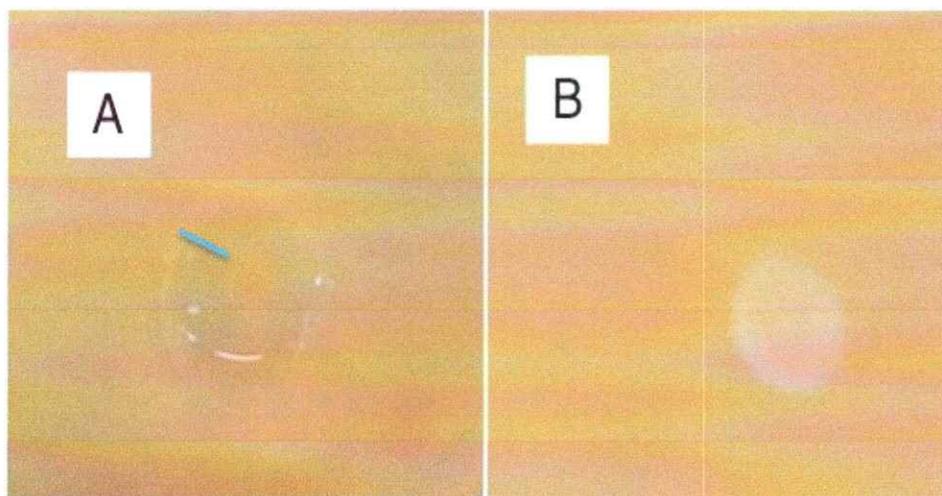


Figura 7. Ensayos de actividad Gelatinasa. En **A)** *Rh. laryngis* M22 con un halo de 5 mm (señalado con barra azul) y en **B)** *Cryptococcus* sp.1 sin actividad.

3.1.7 Actividad Ureasa: Este enzima hidroliza la urea y origina amonio, lo que produce un incremento del pH que puede detectarse con el indicador de pH azul de bromotinol (cambia de amarillo a azul frente a un medio básico). Por lo tanto, la actividad positiva se visualizó como la imagen A de la figura 8, donde se observa un halo de color azul. Se detectó esta actividad en 9 de las 16 cepas estudiadas. La cepa que presentó el halo de mayor tamaño fue *Leuconeurospora* sp.

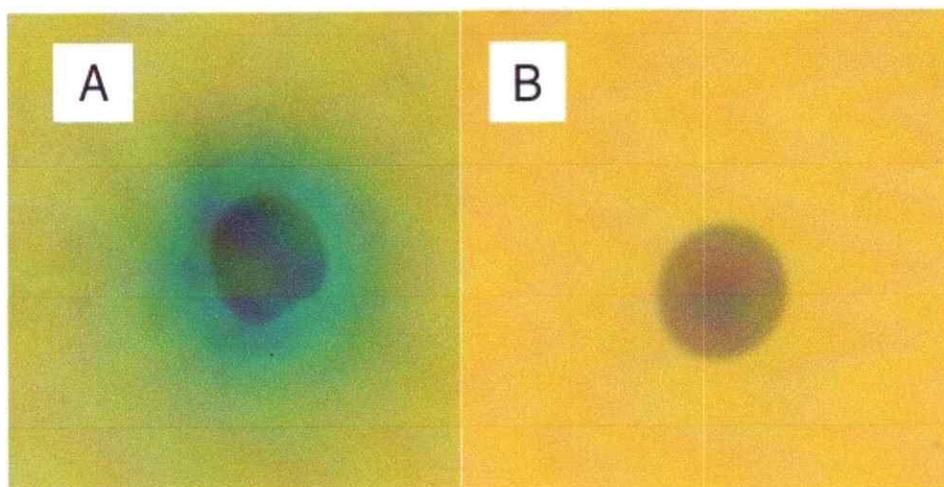


Figura 8. Ensayos de actividad Ureasa. En **A)** la cepa *C. victoriae* M5 con un halo de 5 mm y en **B)** *Rhodotorula fragaria* en la que no se detectó actividad.

3.1.8 Actividad Celulasa : El colorante rojo congo utilizado para revelar la actividad permite diferenciar entre celulosa intacta o degradada, ya que forma complejos con polímeros de polisacáridos. La actividad se visualiza como un halo anarajado alrededor de la colonia en contraste con un fondo rojo. Bajo estos parámetros, 7 presentaron esta actividad y *M. Frigida* fue la que presentó el mayor halo de actividad (7 mm).

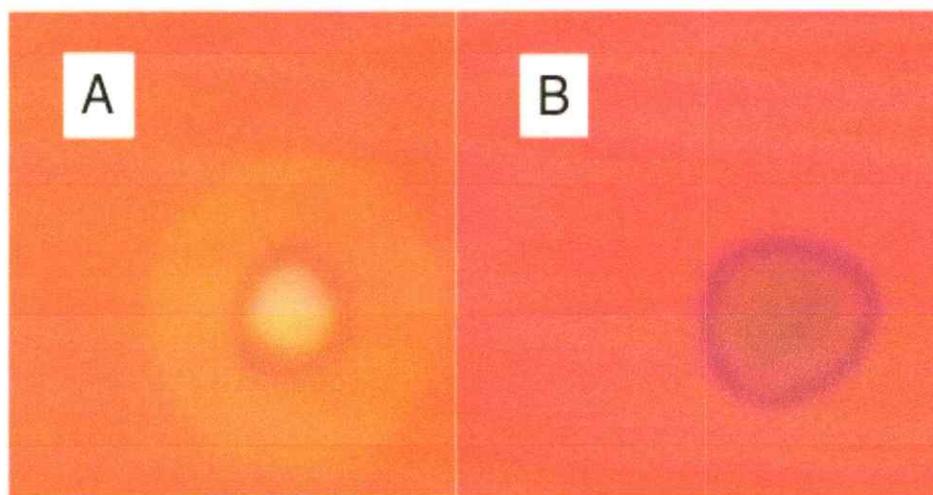


Figura 9. Ensayos de actividad Celulasa. En **A)** *Leuconeurospora sp.* con halo de actividad de 5 mm; en **B)** *Cryptococcus sp.1* que no presenta actividad.

3.1.9 Actividad Fosfatasa: las fosfatasa hidrólizan el difosfato de fenolftaleína liberando fenolftaleína, la que al reaccionar con el álcali (hidróxido de amonio) entrega una coloración rosa a rojo brillante en el medio. Por lo tanto, la actividad fosfatasa se visualiza en un halo de color magenta característico. Bajo este supuesto, las cepas que mostraron actividad en este trabajo fueron 15, *Leuconeurospora sp.* fue la única que no presentó esta actividad enzimática, Las cepas en las que se observó un mayor halo de actividad fueron *Rh. laryngis* D27, *Rh. fragaria*, *M frigida*, *Cryptococcus victoriae* D27 y *Rh. glacialis* M17, todas ellas presentaron un halo de 10 mm.

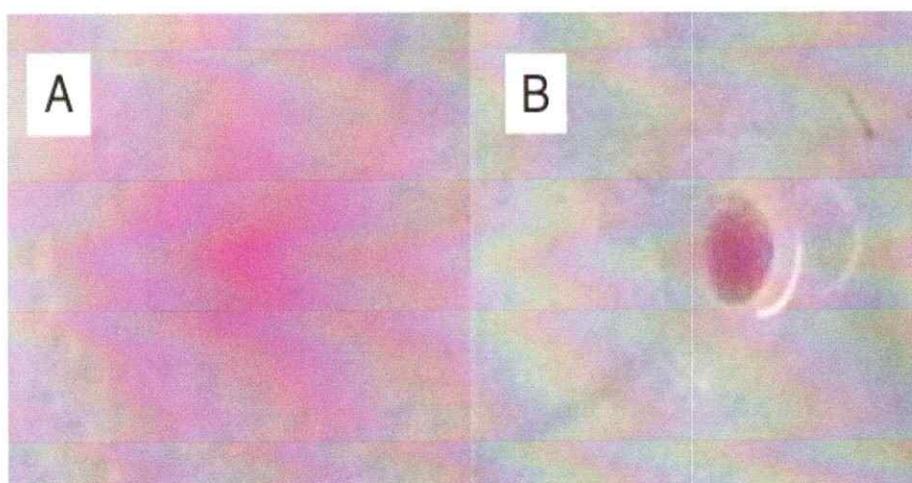


Figura 10. Ensayos de actividad Fosfatasa. En **A)** *Cryptococcus gilvescens* con halo de actividad de 5 mm; en **B)** *Leuconeuropsora sp.* sin actividad.

3.1.10 Actividad Glucosa Oxidasa: la hidrólisis de la glucosa presente en el medio en presencia de la enzima glucosa oxidasa genera ácido glucónico y peróxido de hidrógeno. En presencia del peróxido de hidrógeno producido, la o-dianisidina se transforma en o-dianisidina oxidada de color marrón por la peroxidasa suministrada en el buffer, Bajo estos parámetros no se obtuvieron resultados positivos, ya que ningún halo de actividad fue observado, a excepción del control positivo (*Candida parapsilosis*) que ensayado en placa mostró un halo tenue de color marrón.

3.1.11 Actividad Invertasa: El verde de bromocresol es un indicador de pH y facilita la diferenciación de colonias. El medio se torna de color verde debido a la difusión del verde de bromocresol (reacción alcalina). Los productos finales de las colonias productoras de invertasa que difunden al medio más la

reducción del pH provocan que el colorante vire a amarillo. Esta actividad se evidenció en 13 cepas, la que presentó mayor actividad fue *Rh. laryngis* D27 con un halo de 11 mm.

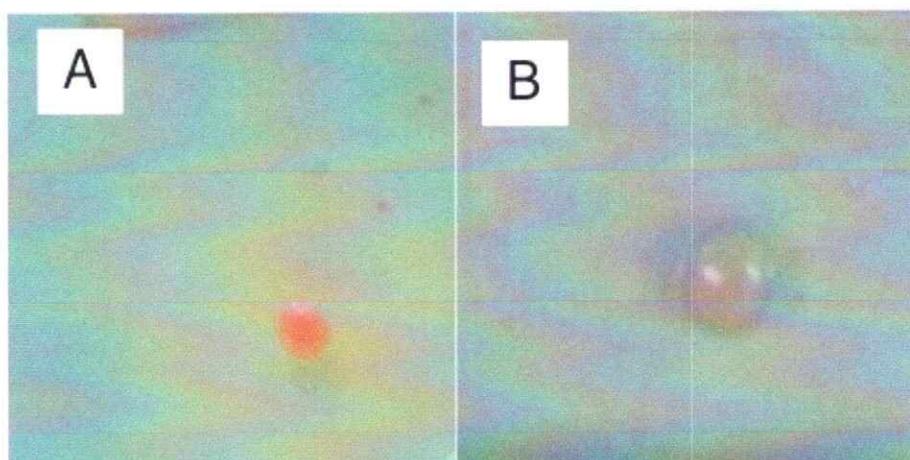


Figura 11. Ensayos de actividad Invertasa. En **A)** *Rhodotorula mucilaginosa* con halo de actividad de 7 mm; en **B)** *Rh. laryngis* M22 sin actividad.

3.1.12 Actividad Xilanasa : La placa es opaca por el xilano agregado. La actividad se evidencia como un halo transparente alrededor de la colonia debido a la hidrólisis por las xilanasas del hongo. En este estudio las cepas no presentaron esta actividad enzimática, aunque el control positivo empleado (*Dioszegia fristingensis*) si presentó .

Los perfiles de actividades enzimáticas de las 16 cepa en estudio obtenidos para las 12 actividades practicadas se detallan a continuación (Tabla 3).

Tabla 3. Actividades enzimáticas en colonias

NOMBRE CEPA	ACTIVIDAD ENZIMÁTICA											
	Prot	Amil	Lip	Pec	Est	Cel	Xil	Ure	Fost	G.O.	Inv	Gel
<i>Rh. pallida</i>	0	0	8	0	3	0	0	5	3	0	0	0
<i>Cr. gilvescens</i>	0	0	2	0	2	0	0	5	5	0	9	0
<i>Cryptococcus. sp.1</i>	0	0	5	5	2	0	0	5	5	0	7	0
<i>Cr. victoriae</i> D27	0	0	7	0	0	3	0	0	10	0	5	0
<i>Cr. victoriae</i> M5	0	5	6	0	10	5	0	5	5	0	5	0
<i>Cryptococcus sp.2</i>	0	6	13	20	5	0	0	0	2	0	10	0
<i>Leuconeurospora sp.</i>	0	8	5	0	2	5	0	10	0	0	1	0
<i>Mrakia frigida</i>	0	10	3	15	0	7	0	0	10	0	7	10
<i>Rh. fragaria</i>	0	0	7	7	2	0	0	0	10	0	10	0
<i>Rh. glacialis</i> M17	0	3	3	0	0	0	0	5	10	0	0	0
<i>Rh. glacialis</i> M22	0	3	6	10	0	1	0	0	5	0	5	7
<i>Rh. laryngis</i> M22	0	0	6	0	7	0	0	0	5	0	0	5
<i>Rh. laryngis</i> D27	0	0	5	0	0	1	0	4	10	0	11	3
<i>Rh. mucilaginoso</i>	0	0	5	0	0	0	0	5	5	0	7	1
<i>Rh. psychropholica</i>	0	5	3	1	0	3	0	0	5	0	2	1
<i>Sp. roseus</i>	8	0	10	0	3	0	0	4	5	0	8	3

Prot: proteasa; Amil: amilasa; Lip: lipasa; Pec: petinasa; Est: esterasa; Cel: celulasa; Xil: xilanasa; Ure: ureasa; Fost: fosfatasa; G.O: glucosa oxidasa; Inv: invertasa; Gel: gelatinasa. Los números indican el tamaño de los halos en milímetros.

3.2. Análisis de actividades enzimáticas en extractos proteicos

Con el objetivo de argumentar que las actividades enzimáticas presentes en colonias son consecuencia de una proteína secretada al medio extracelular, se extrajeron las proteínas extracelulares de cultivos de las levaduras estudiadas. Las pruebas para amilasa, lipasa, pectinasa, proteasa, esterasa, celulasa, ureasa, fosfatasa, invertasa y gelatinasa dieron positivas en al menos una de las cepas ensayadas, por lo que se postula que estas actividades se deben como consecuencia de una proteína excretada al medio extracelular, ya que la actividad se perdió completamente al incubar los extractos durante 15 min a 100° C (figura 12). Los detalles de los perfiles de actividad enzimática con extractos de proteínas se detallan en la Tabla 4.

Al comparar los resultados obtenidos en colonias y extractos (presentados en la Tabla 3 y Tabla 4 respectivamente) se puede observar que las cepas que presentan actividad por extractos proteicos son coincidentes con las que presentaron actividad por colonias, aunque se ve disminuido el número de actividades por cepa al analizar los resultados por extractos proteicos.

De las 5 cepas que presentaron mayor cantidad de actividades extracelulares, sólo dos mantienen este perfil: *Mrakia frigida* (amilasa, invertasa y gelatinasa) y *Rhodotorula glacialis* M22 (fosfatasa, invertasa y gelatinasa). Lipasa y fosfatasa siguen siendo las actividades más frecuentes entre las cepas. Se suma la actividad amilasa que en colonias no destaca dentro del grupo de actividades más frecuentes.

Tabla 4. Actividades enzimáticas en extractos proteicos.

NOMBRE CEPAS	ACTIVIDAD ENZIMÁTICA											
	Prot	Amil	Lip	Pec	Est	Cel	Xil	Ure	Fost	G.O	Inv	Gel
<i>Rh. pallida</i>	0	0	5	0	2	0	0	0	0	0	0	0
<i>Cr. gilvescens</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	15	0
<i>Cryptococcus. sp.1</i>	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Cr. victoriae</i> D27	0	0	0	0	0	2	0	0	10	0	0	0
<i>Cr. victoriae</i> M5	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
<i>Cryptococcus sp.2</i>	0	1	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Leuconeurospora sp.</i>	0	4	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
<i>Mrakia frigida</i>	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	20	20
<i>Rh. fragaria</i>	0	0	0	1	0	0	0	0	3	0	0	0
<i>Rh. glacialis</i> M17	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Rh. glacialis</i> M22	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0	20	15
<i>Rh. laryngis</i> M22	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
<i>Rh. laryngis</i> D27	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0
<i>Rh. mucilaginoso</i>	0	0	0	0	0	0	0	10	0	0	0	0
<i>Rh. psychrophenolica</i>	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Sp. roseus</i>	2	0	0	0	0	0	0	0	5	0	0	0

Prot: proteasa; Amil: amilasa; Lip: lipasa; Pec: petinasa; Est: esterasa; Cel: celulasa; Xil: xilanasa; Ure: ureasa; Fost: fosfatasa; G.O: glucosa oxidasa; Inv: invertasa; Gel: gelatinasa. Los números indican el tamaño de los halos en milímetros.

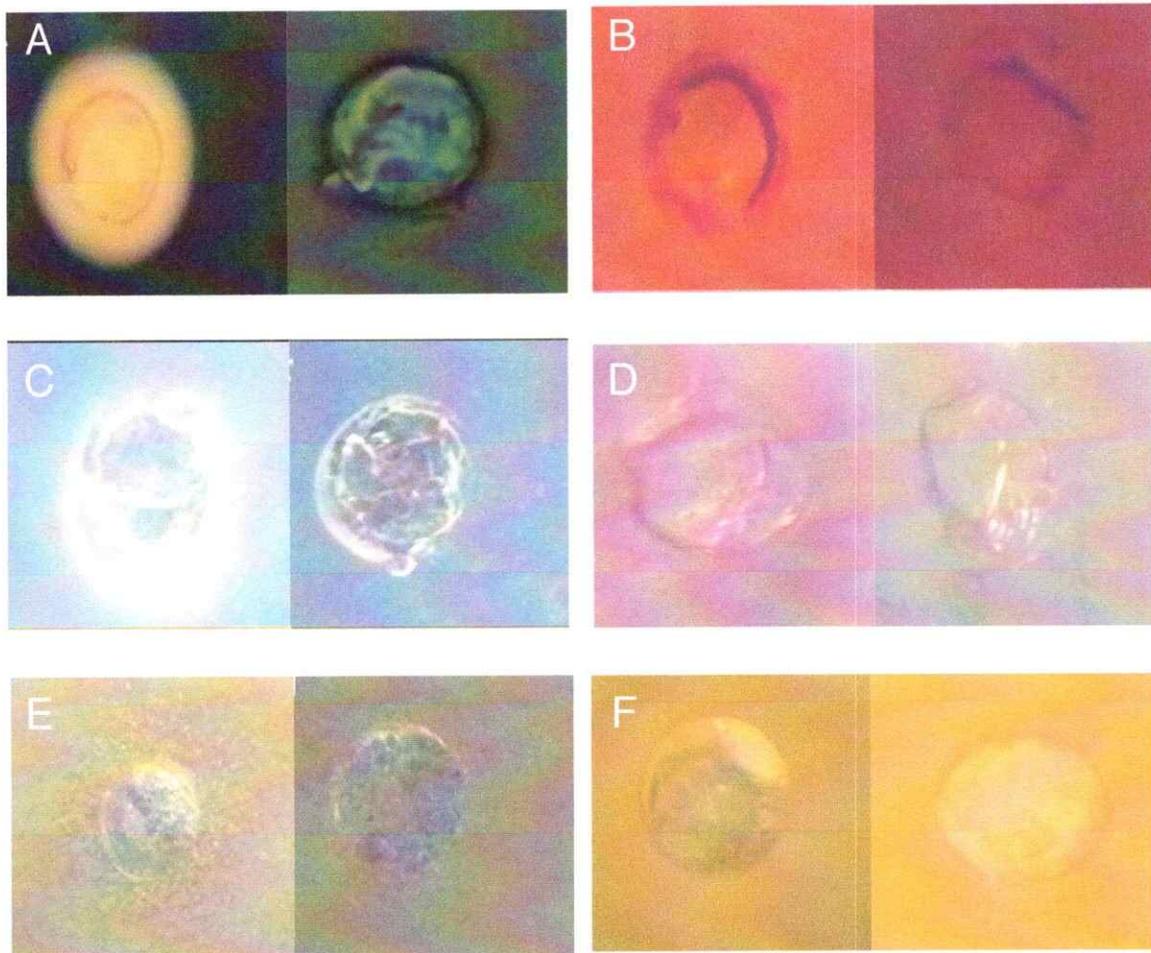


Figura 12. Ensayos de Actividad enzimática por extractos protéicos. Cada pareja corresponde al mismo ensayo de actividad enzimática, realizado con el extracto proteico (a la izquierda) y con el extracto previamente incubado a 100°C por 15 min (a la derecha). Los ensayos realizados fueron: **A)** Actividad amilasa, se puede apreciar el halo de actividad de 4 mm aproximadamente de la cepa *Leuconeuropa sp.*, **B)** Actividad celulasa, se puede ver un halo claro muy tenue alrededor del posillo con los extractos protéicos de *C. victoriae D27*, en **C)** Actividad esterasa en *Rh. pallida* cuyo halo de actividad es de 2 mm aproximadamente en **D)** Actividad fosfatasa en extractos de *S. roseus*, cuyo halo de actividad alcanza los 5 mm. **E)** Actividad Lipasa en *Rh. pallida*, se observa un halo traslucido de aproximadamente 5 mm en **F)** Actividad Pectinasa con extractos de la cepa *Cryptococcus sp.2*, se puede observar halo de degradación alrededor del pocillo.

3.3. Análisis de Actividad Antimicrobiana en colonias

Para evidenciar si las cepas presentan algún grado de competencia, ya sea por espacio o alimento, se realizaron ensayos cruzados entre ellas a sus respectivas temperaturas de crecimiento 4°, 10°, 15° y 22° C (Tabla 5). Para esto se suplementó el medio YM con azul de metileno al 1%, que ingresa a las células muertas, es por esto que de existir una actividad fungicida se evidencia un halo cuyo límite esta formado por la precipitación de azul de metileno. De existir una actividad fungistática las células no mueren, pero la toxina inhibiría la reproducción de las levaduras, lo que se visualiza como un halo opaco de inhibición que carece de límite azul (Figura13).

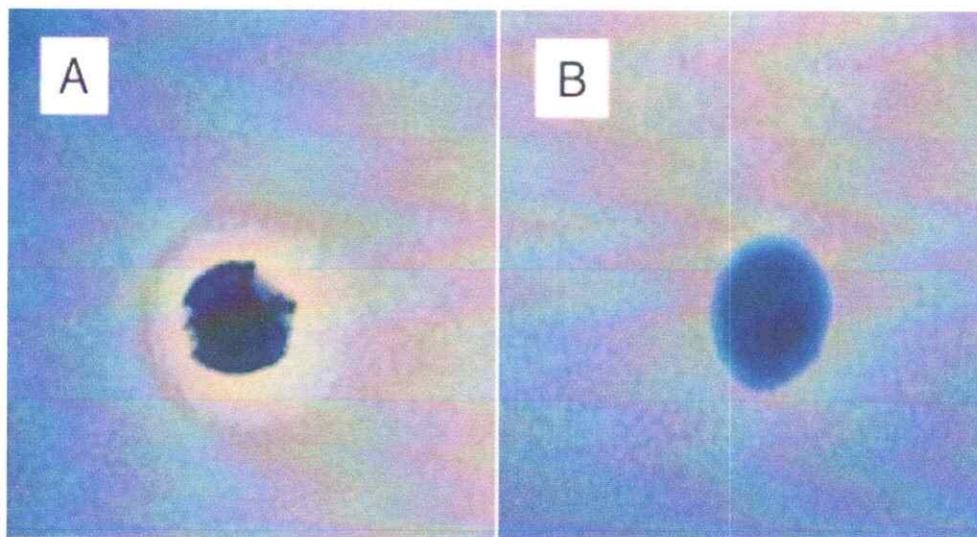


Figura 13. Actividad Antimicrobiana en colonias. A) *Rh. fragaria* con un halo de inhibición de 2 mm (actividad fungistática) en césped *C. gilvescens*, incubada a 10° C. **B)** *Cryptococcus sp.1* sin actividad en el cesped *Cryptococcus victoriae* D27.

Se realizaron ensayos a todas las temperaturas de crecimiento de las cepas estudiadas, pero sólo hubieron resultados positivos a las temperaturas mas bajas (4 y 10° C). Las únicas dos especies cuyas temperaturas optimas de crecimiento es a 4° C presentaron actividad antimicrobiana entre ellas, ambas pertenecen al género *Cryptococcus*, también poseen temperatura optima a 10° C donde presentaron diferentes espectros de actividades; *Cryptococcus Sp1*. presentó actividad contra *Rh. mucilaginosa*, *Rh. fragaria* y *C. gilvescens*. Mientras que *C. gilvescens* presentó actividad contra *Rh. mucilaginosa* y *Rh. fragaria*. Las otras cepas cuyas temperaturas optimas es 10° C son: *Rh. mucilaginosa*, presentó actividad contra *Rh. fragaria*, *Cryptococcus sp1*, *C. gilvescens*; *Rh. fragaria* presentó actividad contra *Rh. mucilaginosa*, *Cryptococcus sp1* y *C. gilvescens*; y *C. victoriae* D27 presentó actividad contra ambas especies de *Rhodotorulas* y *Cryptococcus*.

3.4 Análisis de actividad antimicrobiana en extractos

Para determinar si esta actividad es producto de proteínas secretadas al medio extracelular, se extrajeron proteínas de cultivos celulares crecidos en medio YM, y se procedió a realizar los ensayos cruzados (Tabla 6). Las cepas *Cryptococcus* sp1 y *Rh. fragaria* mostraron actividad antimicrobiana contra las mismas cepas sensibles (cepas que ven afectada por la toxina) en colonias. Las otras tres cepas no mostraron actividad al ensayarlas con sus extractos proteicos. Como esta actividad es dependiente de múltiples factores como temperatura, pH y salinidad no se descarta que realmente esta actividad pueda ser producto de la secreción de alguna proteína extracelular, ya que la actividad se perdió completamente cuando los extractos fueron incubados previamente a 100°C, por 15 min (Figura 14).

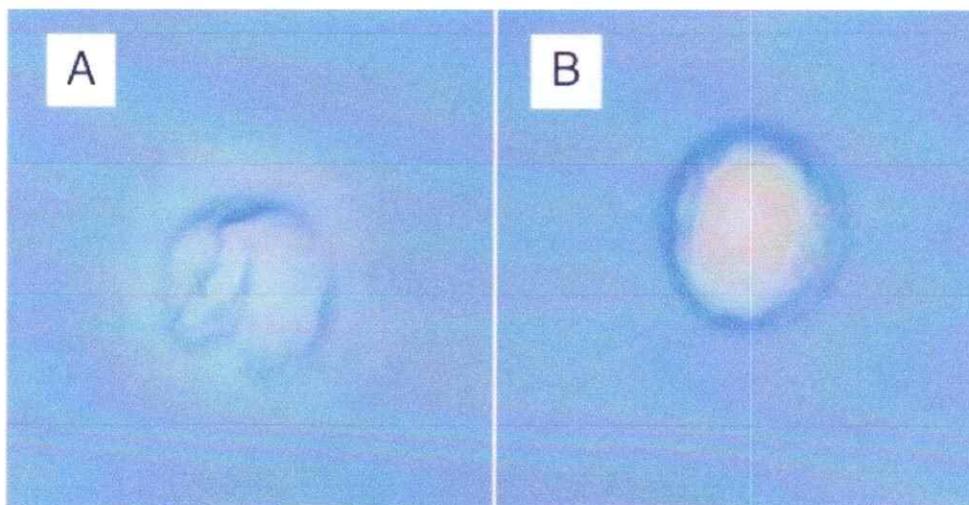


Figura 14. Actividad Antimicrobiana por extractos en placas. Ensayo de extracto de proteico extracelular (100 μ l en un pocillo de 1 cm de diámetro) **A)** *Rh. fragaria* con un halo de inhibición de 2 mm (actividad fungistática) en césped *C. gilvoscens*, incubada a 10°C. **B)** *Rh. fragaria* sin actividad, producto de la denaturación a 100° C por 15 min, en el mismo césped .

Tabla 6. Ensayos cruzados de actividad antimicrobiana con extractos proteicos de levaduras.

Levaduras sembradas	Céspedes																		
	4° C				10° C				15° C				22° C						
	Cr. Sp1	Cr. gil	Rh. muc.	Rh. frag.	Cr. vic. D27	Cr. Sp1	Cr. gil	L. sp.	Rh. gla M17	R. pall	Rh. lar M22	Mr. fr.	Cr. vic. M5	Cr. sp2	Rh. gla M22	Rh. psy	Sp. ros	Rh. lar D27	
Cryptococcus Sp1	-	2																	
Cr. gilvescens.	0	-																	
Rh. mucilaginoso			-	0	0	0	0												
Rh. fragaria			3	-	0	2	2												
Cr. victorinae D27			0	0	-	0	0												
Cryptococcus. Sp 1			3	3	0	-	2												
Cr. gilvescens			0	0	0	0	-												
Leuconeuropora sp.							-	0											
Rh. glacialis M17							0	-											
Rh. pallida									-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Rh. laryngis M22										-	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Mr. frigida											0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cr. Victorinae M5											0	0	0	-	0	0	0	0	0
Cryptococcus Sp.2											0	0	0	-	0	0	0	0	0
Rh. glacialis M22											0	0	0	0	-	0	0	0	0
Rh. psychrophenolica											0	0	0	0	0	-	0	0	0
Sp. roseus											0	0	0	0	0	0	0	0	0
Rh. laryngis D27											0	0	0	0	0	0	0	0	0

Cr. Sp1: *Cryptococcus* Sp.1; Cr. gil: *Cryptococcus gilvescens*; Rh. muc.: *Rhodotorula mucilaginoso*; Rh. frag.: *Rhodotorula fragaria*; Cr. vic. D27: *Cryptococcus victorinae* D27; L. sp.: *Leuconeuropora* sp.; Rh. gla. M17: *Rhodotorula glacialis* M17; R. pall.: *Rhodotorula pallida*; Rh. lar. M22: *Rhodotorula laryngis* M22; Mr. fri.: *Mrakia frigida*.; Cr. vic. M5: *Cryptococcus victorinae* M5; Cr. sp.2: *Cryptococcus* sp.2; Rh. gla. M22: *Rhodotorula glacialis* M22; Rh. psy: *Rhodotorula psychrophenolica*; Sp. ros: *Sporobolomyces roseus*; Rh. lar. D27: *Rhodotorula laryngis* D27. Los números indican tamaño del halo en milímetros. Las celdas en blanco indican ausencia de ensayo por incompatibilidad de temperatura entre las cepas.

3.5 Presencia de Elementos Genéticos Extracromosómicos (EGEs).

Para este punto se analizó la presencia de dsRNAs en las levaduras estudiadas con la finalidad de correlacionar la existencia de estos y su actividad antimicrobiana. Para ella se extrajo ARN de todas las cepas en estudio y posteriormente se les adicionó Nucleasa S1, pero ninguna de ellas fueron resistentes al tratamiento (Fig.15). Esta nucleasa digiere ADN o ARN de cadena sencilla. Por lo que se concluye que las cepas en estudio no presentan dsRNA y por tanto no se puede relacionar la existencia de este tipo de EGE con la actividad antimicrobiana que presentaron las levaduras en este estudio.

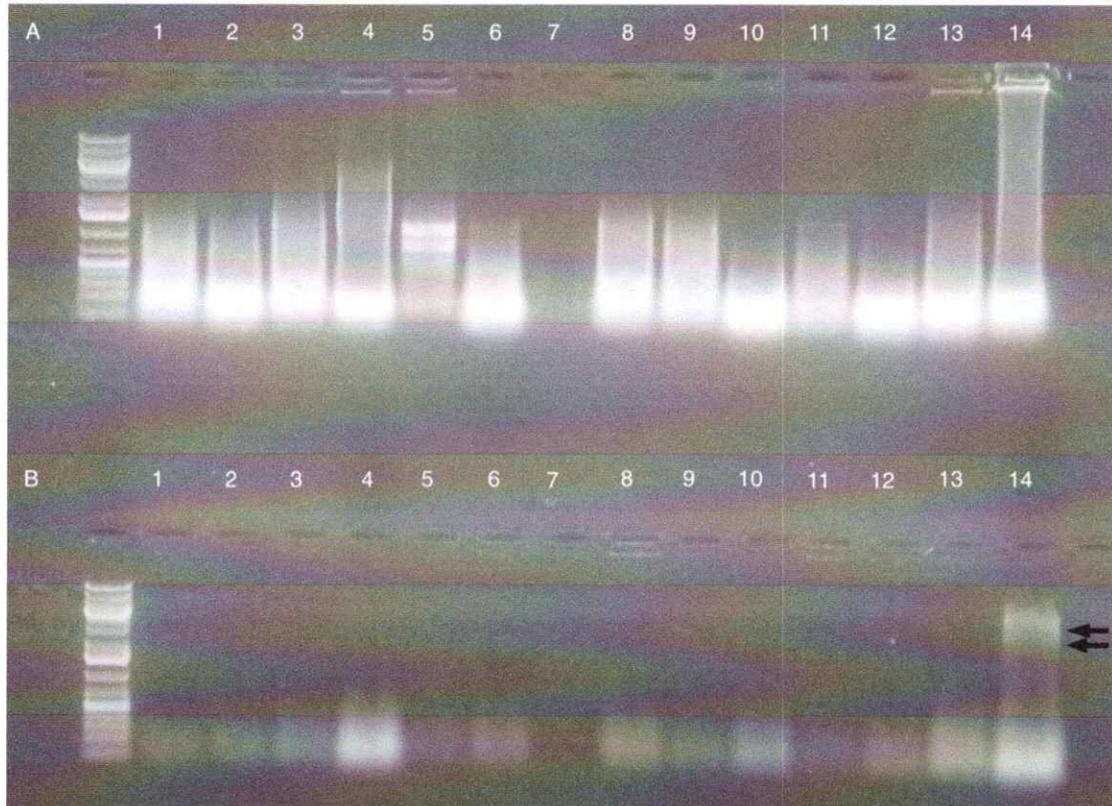


Figura 15. Perfiles de RNA de levaduras antárticas. A) RNA totales. B) RNA totales tratados con Nucleasa S1. 1: *Rh. fragaria*; 2: *Cryptococcus* sp.1; 3: *C. gilvescens*; 4: *Rh. mucilaginosa*; 5: *Rh. pallida*; 6: *C. victoriae* D27; 7: *Rh. psychropholica*; 8: *Rh. laryngis* M22; 9: *M. frigida*; 10: *Cryptococcus* sp.2; 11: *C. victoriae* M5; 12: *Rh. glacialis* M17; 13: *Leuconeurospora* sp.14: control positivo (*Xanthophyllomyces dendrorhous*), en la imagen se observan dos dsRNA cuyos tamaños corresponden a 5 y 4 kb (se indican con las flechas) Estándar de peso molecular de 1 Kb.

4. DISCUSION

Los datos derivados del análisis de los phylum encontrados en el presente estudio, sugieren que las levaduras Basidiomycetes están más adaptados a los ecosistemas antárticos que levaduras ascomycetes, esto se infiere ya que existe una única cepa Ascomycete en este estudio (*Leuconeurospora* sp) . Resultados similares también se han obtenido a partir de estudios en diferentes ambientes fríos (Connell y cols., 2008; Turchetti y cols., 2008; Vaz y cols., 2011; Uetake y cols., 2012; Carrasco y cols., 2012). Levaduras Basidiomycetes se han encontrado principalmente en ambientes fríos, incluyendo las especies de *Cryptococcus*, *Mrakia* y *Rhodotorula* (Vishniac, 2006). En el presente estudio, las levaduras obtenidas pertenecen a los géneros *Rhodotorula* y *Cryptococcus* predominantemente, obtenidos de 22 puntos de muestreo perteneciente a las Islas de Shetland del Sur (Isla Decepción, Isla Snow, Punta Hannan, Isla Dee, Isla Nelson, Isla Litchfield, Base Prat y península de Coppermine).

La mayoría de las levaduras presentes en los ecosistemas antárticos son psicotolerantes y pocos son psicrófilos obligados. Esto es posiblemente debido a una respuesta a las fluctuaciones de temperatura en el micro-hábitat libre de

hielo, que permiten a los microorganismos sobrevivir en entornos inestables (Ruisi y cols.,2007). Este estudio no fue la excepción ya que 9 cepas son psicrotolerantes y 7 psicrófilas obligadas.

4.1 Actividades enzimática extracelulares

La mayor parte de las levaduras lipolíticas conocidos (por ejemplo, *Candida*, *Yarrowia* y *Saccharomyces*) pertenecen al phylum ascomycota (Vakhlu y Kour, 2006). En el presente estudio, todas las cepas, basidiomycota y ascomycota son productores de lipasas. Dado que se sabe poco acerca de la producción de lipasa por las levaduras basidiomycetes, estas especies derivadas Antárticas pueden representar nuevas enzimas con diferentes aplicaciones biotecnológicas. El elevado número de cepas lipasa positivos (100%) en el presente estudio podría estar relacionado con el hábitat natural a partir del cual se aislaron estos microorganismos. Hay cantidades significativas de lípidos en el fitoplancton y en los sedimentos de esta región (Henderson et al 1991;. Fabiano y Danovaro 1999)

Las enzimas proteolíticas o proteasas como ya hemos visto, son enzimas hidrolíticas que catalizan la descomposición de los enlaces peptídicos en las proteínas. Proteasas microbianas son objeto de una atención considerable y representa el 60% del mercado de enzimas mundial (Bon y cols., 2008). Sin embargo, la secreción de proteasas por las levaduras no es una propiedad común (Turkiewicz y cols., 2003). En el presente estudio, 1 cepa, *S. roseus*,

presentó esta actividad, a los 5 días de incubación a su temperatura óptima de crecimiento (22° C).

Celulasa positiva fueron las cepas *Leuconurospora sp*, *M. frígida*, *C. Victoriae* D27, *C. Victoriae* M5, *Rh. glacialis*, *Rh. psychrophenolica* y *Rh. laryngis*. Quien obtuvo halo de actividad mayor fue *M. frígida*, esta actividad se ha reportado para esta especie en estudios previos de nuestro laboratorio y en la literatura científica en estudios de suelos antárticos (Krishnan y cols., 2011; Vaz y cols., 2011). Las tres cepas del género *Rhodotorula*, son datos nuevos para nuestro equipo de trabajo, pues hasta ahora no se habían reportado actividades celulasa para estas cepas.

Las xilanasas activas a bajas temperaturas se han utilizado para la producción de harina de hemicelulosas, así como en el campo de los biocombustibles y biorremediación (Frisvad, 2008). Los estudios que investigan la producción de xilanasas en las levaduras son todavía escasos, ya que las xilanasas de unas pocas especies se han caracterizado. Se sabe que el phylum basidiomycetes son productores de estas enzimas (Gomes y cols., 2000; Scorzetti y cols., 2000), pero en el presente estudio no se encontraron cepas productoras de xilanasas. Resultados similares se encontraron en estudios anteriores en nuestro laboratorio (Carrasco y cols., 2012) donde sólo *Dioszegia fristingensis* presentó dicha actividad. Diversos investigadores han puesto de manifiesto que la producción de xilanasas está fuertemente influenciada por la naturaleza de la fuente de carbono. En este sentido, Kubackova y cols (1975),

demonstraron que en algunos basidiomycetos, la síntesis de esta enzima está totalmente inhibida en presencia de monosacáridos. Wiacek y cols (1994) mostraron, asimismo, que en *Chaetomium globosum* y *Ch. celluloliticum* sólo aparecen elevadas concentraciones de xilanasas en presencia de hemicelulosas y celulosa. De esta forma podemos explicar, porque es que existen en este estudio cepas con actividad celulasa y ninguna con actividad xilanasas, siendo que ambas son componentes importantes de la pared celular de los vegetales.

Gran parte de las levaduras estudiadas presentaron actividad Ureasa, la mayoría pertenecen al género *Cryptococcus* y *Rhodotorula*, lo que concuerda con estudios previos realizados en nuestro laboratorio de cepas obtenidas en Isla Rey Jorge del territorio Antártico chileno (Baeza y cols., 2010) y con otros trabajos realizados en zonas frías como el ártico (Singh y cols, 2013). Esta actividad también se hizo presente en las cepa *Leuconeurospora* sp., la cual presenta el mayor halo de actividad (10 mm) y *S. roseous* con un halo de 4 mm. Ambas cepa no han sido descritas en la literatura científica con actividad ureasa.

La producción de actividad invertasa ha sido estudiada tanto intra y extracelular en cepas de interés como: *Saccharomyces*, *Candida*, *Lipomyces*, *Rhodotorula*, *Candida utilis* y *Rhodotorula glutinis* (Dworschack y Wickerham., 1961; Belcarz y cols., 2002; Rubio y cols., 2002), pero todos estos trabajos se han realizado en cepas mesófilas. En este estudio la gran mayoría de las cepas

que mostraron actividad, corresponden a cepas psicrófilas y en alguna de ellas, no se les ha reportado esta actividad en la literatura científica, tampoco con anterioridad en nuestro laboratorio (*Leuconeurospora*, *S. roseus*, *Rh. laryngis*, *Rh. fragaria* y *Rh. psychropholica*).

La actividad gelatinasa se ve representada principalmente por las cepas del género *Rhodotorula* en el presente trabajo. Ninguna de las cepas pertenecientes al género *Cryptococcus* mostraron actividad. *M. frígida* fue quien mostró mayor actividad lo que coincide con datos obtenidos en ensayos anteriores de nuestro laboratorio, y de lo cual no se ha reportado aún en literatura científica. *S. roseus*, es otra cepa que mostró actividad, pero de la cual no se han encontrado reportes previos de esta actividad positiva en aislados antárticos.

La actividad fosfatasa se presentó en casi todas las cepas en estudio, la excepción fue *Leuconeurospora sp*; las cepas que presentaron mayor actividad fueron: *Rh. laryngis* D27, *Rh. fragaria*, *Rh. glacialis* M17, *C. victoriae* D27 y *M. frígida*. Existen reportes de esta actividad en *Cryptococcus*, donde cepas mesófilas fueron testeadas positivamente (García-Martos y cols., 2000). En nuestro laboratorio también se ha reportado esta actividad a 22°C en diversas cepas, pero no existen reportes de actividad fosfatasa en cepas psicrófilas del género *Cryptococcus* como tampoco del género *Rhodotorula*, por lo que el presente estudio aporta con esta nueva información.

La glucosa oxidasa es una enzima comercialmente importante, que se aplica en la industria farmacéutica como un biosensor para la determinación enzimática de la glucosa en la fermentación de bebidas alcohólicas, bebidas (Malherbe y cols., 2003) y los fluidos corporales (Yang y cols., 2011) y en la industria alimentaria para la eliminación de glucosa y/o oxígeno para mejorar el color, la textura y el tiempo de conservación de diversos productos (Parpinello y cols., 2002) y en la industria de la cocción para mejorar la textura de la miga (Bonet y cols., 2006). Ha sido purificada a partir de una variedad de hongos, principalmente del género *Aspergillus* (Tsuge y cols., 1975; Fiedurek y Gromada., 2000) y *Penicillium* (Kusai y cols., 1960 ; Bhatti y Saleem, 2009), pero *A. niger* es el hongo más común que se utiliza para la producción de GOX (Pluschkell y cols., 1996). En el presente estudio no se encontró actividad en ninguna de las cepas testeadas a sus respectivas temperaturas óptimas de crecimiento, aunque el equipo de trabajo de nuestro laboratorio ha encontrado actividad en cepas psicotolerantes como *Cryptococcus gastricus*, *Rhodotorula laryngis*, *Leucosporidiella creatinivora*, *Cryptococcus gilvescens* y *Sporidiobolus salmonicolor*. No se encontraron estudios científicos sobre esta actividad con respecto a las cepas aquí estudiadas.

Actividad amilasa se ha descrito en varias cepas aisladas desde ambientes tropicales y fríos (Brizzio y cols., 2007). En el presente trabajo se encontró en las cepas el género *Leuconeurospora*, *Mrakia*, *Cryptococcus* y *Rhodotorula*, lo que se apoya en resultados obtenidos en nuestro laboratorio

con anterioridad (Carrasco y cols., 2012). *Rh. psychrophenolica* no ha sido ensayada en nuestro laboratorio con anterioridad, tampoco se ha respotado informacion de esta cepa en estudios previos, en literatura científica.

Esterasa se encontró en este estudio en las cepas del género *Leuconeurospora*, *Sporobolomyces*, *Rhodotorula* y *Cryptococcus*. Es coincidente con otros estudios (Brizzio y cols., 2007; Vaz y cols., 2011) y con resultados previos de nuestro laboratorio (Carrasco y cols., 2012). *Rh. pallida*, en el presente estudio entregó datos importantes ya que mostró actividad pectinasa, nunca antes ha sido ensayada en nuestro laboratorio y sin datos científicos al respecto.

Cryptococcus sp 2, fue la cepa que mayor halo de actividad ha presentado para actividad Pectinasa, fue ensayada a 22° C (temperatura optima), lo cual es coincidente con estudios obtenidos por Brizzio y cols., 2007, pero no con los resultados previos obtenidos para esta especie en nuestro laboratorio, aislada desde muestras de tierra de la Isla Rey Jorge (Carrasco y cols., 2012), cuyo temperatura optima a ensayar fue de 15° C. *Rh. fragaria* y *Rh. psychrophenolica* se incorporan como datos nuevos a nuestro laboratorio, ya que no han sido ensayadas anteriormente, tampoco se encontraron reportes de esta actividad para ellas en estudios de tierras antarticas.

Como podemos ver, la alta cantidad de actividades encontradas en este trabajo son reflejo de las diversas adaptaciones que las levaduras poseen para

poder sobrevivir a este clima extremo. El clima frío permanente, y por el otro lado, la baja concentración de materia orgánica polimérica requiere de un conjunto eficiente de enzimas extracelulares que actúen a bajas temperaturas para alcanzar una captación eficaz de nutrientes. Estrategias de adaptación a ambientes fríos incluyen una flexibilización inusual de la estructura de la proteína que permite que las enzimas reduzcan la energía de activación, lo que resulta en una alta eficiencia catalítica y baja temperatura óptima (Huston y cols., 2000). Por otra parte las levaduras aquí probadas para la actividad enzimática, mostraron resultados positivos, lo que sugiere que la comunidad microfungal del suelo juega un papel importante en los procesos de descomposición en la Antártica.

Si consideramos que nuestros sitios de muestreo incluyen áreas con vegetación, animales de contacto y algunas se encuentran cerca del mar, entonces podemos entender porque las levaduras presentan esta variada gama de actividades enzimáticas ya que, la celulosa es uno de los hidratos de carbono más abundantes producidos por las plantas (Kasana y Gulati, 2011) y como se mencionó anteriormente, existen cantidades significativas de lípidos en el fitoplancton y en los sedimentos de esta región.

3.2 Actividad Micocida y perfiles de dsRNA

Las levaduras constituyen un amplio grupo de microorganismos que se caracterizan por una fuerte capacidad de competir con por nicho de colonización. Los mecanismos de competencia han sido ampliamente

estudiados, y entre ellos, los antimicrobianos parecen desempeñar un papel principal.

Se analizó en el presente estudio la presencia de actividad micocida, con la finalidad de demostrar si existía alguna especie de competencia entre las cepas. La actividad micocida conocido como fenómeno "killer" de levadura fue descubierto por primera vez por Bevan y Makower, 1963, quienes observaron que ciertas cepas de *S. cerevisiae* podrían matar a cepas sensibles de la misma especie. Se encontró posteriormente que las levaduras asesinas actúan mediante la secreción hacia el medio de un factor proteico tóxico para el que los propios "killer" eran inmunes. Hasta la fecha, las levaduras asesinas se han reportado en cepas de varios géneros de levadura, incluyendo: *Saccharomyces*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Hansenula*, *Kluyveromyces*, *Pichia* y *Torulopsis*, *Ustilago*, *Rhodotorula*, *Trichosporon*, *Hanseniaspora*, *Williopsis* y *Zygowilliopsis*, *Zygosaccharomyces* y *Metschnikowia* (Schmitt y Breinig, 2002; Walker y cols., 1995). Por lo tanto, carácter Killer se distribuye ampliamente entre los géneros de levaduras y las toxinas "killer" descritas hasta la fecha son efectivas contra una variedad de diferentes levaduras a menudo fuera del género y especie de la cepa productora (Hodgson y Button, 1995; Young y Yagiu, 1978).

En el presente estudio, la actividad micocida se presenta en cepas del género *Cryptococcus* y *Rhodotorula* cuando crecen a temperaturas óptimas de 4°C y 10°C. El indicador azul de metileno no fue capaz de ingresar a las células

(ausencia de halo azul), por lo que se propone que la actividad antimicrobiana se limita a inhibir el crecimiento de las cepas sensibles, pero no las mata. Por lo que las cepas presentarían una actividad fungistática. Walker y cols, en el año 1995, sugieren que la diversa sensibilidad que presentan algunas cepas para la actividad killer fungica se debe a la naturaleza de la toxina o a las diferencias estructurales de los receptores para la toxina en las paredes celulares de estas levaduras, por lo que sería un objeto de estudio importante a analizar en trabajos posteriores en nuestro laboratorio, para ayudar mejor al entendimiento de la ecología de cepas psichrófilas.

La producción de estos compuestos tóxicos no son sin costos. Estos incluyen carga energética para la producción de la toxina y mantenimiento de la inmunidad por parte de la cepa productora de la toxina (Lenski y Riley, 2002). En un ambiente extremo el cual posee escasos compuestos carbonados, como es el hábitat de origen de las cepas en este estudio, este gasto energético extra podría ser superada por la presencia de las variadas actividades enzimáticas hayadas y además porque según plantearon Chao y Levin, 1981 en una generación dada, sólo una pequeña fracción de la cepa asesina realmente produce toxina, permitiendo que las cepas productoras prosperen y no mueran por falta de recursos. Por lo tanto la competencia entre las especies se vería promovida principalmente por la captacion de recursos para la sobrevivencia y en segundo lugar doblemente potenciada para abastecer este gasto extra de energía para la producción de las toxinas y resistencia a las mismas por parte de las cepas productoras. Si las cepas productoras de las toxinas logran por

tanto matar o inhibir el crecimiento de las cepas sensibles, generan una concentración de los recursos, para hacer uso de ellos.

Por otra parte, en el presente estudio se analizó la presencia de dsRNA para correlacionar la presencia de estos EGEs con la actividad antimicrobiana, no obteniéndose resultados positivos en la pesquisa. Se propone que EGEs no se encontrarían porque las cepas no poseen actividad micocida como tal, sino que sólo fungistática y ésta estaría codificada más bien en el material genético nuclear u otro tipo de EGE como plasmidios, por lo que sería un interesante objeto de estudio posterior.

4. CONCLUSIONES

1. Las levaduras analizadas presentaron distintos perfiles de actividades hidrolíticas extracelular.
2. Existen levaduras con la capacidad de matar o inhibir el crecimiento de otras levaduras.
3. Se logró confirmar que tanto las actividades enzimáticas extracelulares y antimicrobianas son de naturaleza protéica.
4. No se encontró dsRNA en las levaduras con actividad antimicrobiana, por lo que los determinantes genéticos de dicho fenotipo serian de origen cromosomicos u otro tipo de EGE.

5. BIBLIOGRAFÍA

Adams BJ, Bardgett RD, Ayres E, Wall DH, Aislabie J, Bamforth S, Bargagli R, Cary C, Cavacini P, Connell L, Convey P, Fell JW, Frati F, Hogg ID, Newsham KK, O'Donnell A, Russell N, Seppelt RD, Stevens MI. 2006. Diversity and distribution of Victoria Land biota. *Soil Biology Biochemistry*. 38:3003-3018

Arthur H. y Watson K. 1976. Thermal adaptation in yeast: growth temperatures, membrane lipid, and cytochrome composition of psychrophilic, mesophilic, and thermophilic yeasts. *Journal of Bacteriology*. 128: 56–68.

Baeza M, Flores O, Carrasco M, Rozas JM, Oviedo V, Barahona S y Cifuentes V. 2010. The inter-generic fungicidal activity of *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Journal of Microbiology*. 48: 822-8.

Belcarz A, Ginalska G, Lobarzewski J, Penel C. 2002. The novel nonglycosylated invertase from *Candida utilis* (the properties and the conditions of production and purification). *Biochimica et Biophysica Acta*. 1594:40-53.

Bevan EA, Herring AJ y Mitchell DJ. 1973. Preliminary characterization of two species of dsRNA in yeast and their relationship to the "killer" character.

Nature (London). 245:81-86.

Bevan EA. y Makower M. 1963. The physiological basis of the killer character in yeast. Proceedings of the XIth International Congress on Genetics. 1: 202–203.

Bhatti HN. y Saleem N. 2009. Characterization of glucose oxidase from *Penicillium notatum*. *Food Technology and Biotechnology*. 47: 331-335.

Block W. 1984. Terrestrial Microbiology, Invertebrates and Ecosystems. In: *Antarctic Ecology* .1: 163-236. Academic Press, London.

Bockheim J y Haus NW. 2014. Distribution of Organic Carbon in the Soils of Antarctica. In *Soil Carbon*. 373 -380. Springer International Publishing.

Bokhorst S, Huiskes A, Convey P, Aerts R. 2007. External nutrient inputs into terrestrial ecosystems of the Falkland Islands and the Maritime Antarctic region. *Polar Biology*. 30:1315-1321.

Bon EP, Costa RB, Silva MVA, Leitao VSF, Freitas SP, Ferrara MA. 2008. Mercado e Perspectivas de Uso de Enzimas Industriais e Especiais no Brasil. In: *Enzimas en Biotecnología-Producción, Aplicación en el Mercado*, Ed. Interciencia. 20:463–488. Río de Janeiro.

Bonet A, Rosell CM, Caballero PA, Gómez M, Pérez- Munuera I y Lluch MA. 2006. Glucose oxidase effect on dough rheology and bread quality: a study from macroscopic to molecular level. *Food Chemistry*. 99:408- 415.

Bridge PD. y Spooner BM. 2012. Nonlichenized Antarctic fungi: transient

visitors or members of a cryptic ecosystem? *Fungal Ecology*. 5:381–394.

Brizzio S, Turchetti B, De García V, Libkind D, Buzzini P y Van Broock M. 2007. Extracellular enzymatic activities of basidiomycetous yeasts isolated from glacial and subglacial waters of northwest Patagonia (Argentina). *Canadian Journal of Microbiology*. 53: 519-525.

Broady PA. 1996. Diversity, distribution and dispersal of Antarctic terrestrial algae. *Biodiversity and Conservation*. 5:1307-1335.

Buzzini P. y Martini A. 2002. Extracellular enzymatic activity profiles in yeast and yeast-like strains isolated from tropical environments. *Journal of Applied Microbiology*. 93:1020–1025.

Carrasco M, Rozas JM, Barahona S, Alcaíno J, Cifuentes V, Baeza M. 2012. Diversity and extracellular enzymatic activities of yeasts isolated from King George Island, the sub-Antarctic region. *BMC Microbiology*. 12:251.

Cavicchioli R. y Tortzen T. 2000. Extremophilic. *Encyclopaedia of Microbiology*. En Lederberg J, (ed). 2: 317 – 337. London.

Chao L. y Levin BR. 1981. Structured habitats and the evolution of anticompetitor toxins in bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 78:6324–6328.

- Connell L, Redman R, Craig S, Scorzetti G, Iszard M, Rodriguez R.** 2008. Diversity of soil yeasts isolated from South Victoria Land, Antarctica. *Microbial Ecology* 56:448–459.
- Conti S, Magliani W, Gerloni M, Salati A, Dieci E, Arseni S, Fisicazo P, Polonelli L.** 1998. A transphyetic anti-infectious control strategy based on the killer phenomenon. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*. 22: 151-161.
- Convey P.** 2013. Antarctic Ecosystems. *Encyclopedia of Biodiversity*. S.A. Levin (ed). 2: 179-188. Elsevier, San Diego.
- Convey P, Chown SL, Clarke A, Barnes DKA, Cummings V, Ducklow H, Frati F, Green TGA, Gordon S, Griffiths H, Howard-Williams C, Huiskes AHL, Laybourn-Parry J, Lyons B, McMinn A, Peck LS, Quesada A, Schiaparelli S, Wall D.** 2014. The spatial structure of Antarctic biodiversity. *Ecological Monographs* 84:203-244.
- Dworschack RG. y Wickerham LJ.** 1961. Production of extracellular and total invertase by *Candida utilis*, *Saccharomyces cerevisiae*, and other yeasts. *Applied and Environmental Microbiology*. 9(4): 291-294.
- Fabiano M. y Danovaro R.** 1999. Meiofauna distribution and mesoscale variability in two sites of the Ross Sea (Antarctica) with contrasting food supply. *Polar Biology* . 22:115–123.

Feller G. y Gerday C. 2003. Psychrophilic enzymes: hot topics in cold adaptation. *Nature Reviews Microbiology*. 1:200–208.

Ferrari BC, Zhang CD. y Dorst J. 2011. Recovering greater fungal diversity from pristine and diesel fuel contaminated sub-Antarctic soil through cultivation using both a high and a low nutrient media approach. *Frontiers in Microbiology*. 2:1-14.

Fiedurek J. y Gromada A. 2000. Production of catalase and glucose oxidase by *Aspergillus niger* using unconventional oxygenation of culture. *Applied Microbiology*. 89: 85-89.

Frisvad JC. 2008. Fungi in cold ecosystems. In: Margesin R, Schinner F, Marx JC, Gerday C (eds) *Psychrophiles: from biodiversity to biotechnology*. pp 137–156. *Springer, Berlin*,

García-Martos P, Martín P, Hernández-Molina JM, García-Agudo L, Aoufi S y J. Mira J. 2000. Extracellular enzymatic activity in 11 *Cryptococcus* species. *Mycopathologia*. 150: 1–4.

Greenfield LG. 1992. Precipitation nitrogen at Maritime Signy Island and Continental Cape-Bird, Antarctica. *Polar Biology*. 11:649-653.

Golubev W. y Shabalin Y. 1994. Mycocin production by the yeast *Cryptococcus humicola*. *FEMS Microbiology Letters*. 119: 105-110.

Gopinath SC, Anbu P. y Hilda A. 2005. Extracellular enzymatic activity

profiles in fungi isolated from oil-rich environments. *Mycoscience*. 46:119–126.

Gomes J, Gomes I. y Steiner W. 2000. Thermolabile xylanase of the Antarctic yeast *Cryptococcus adeliae* : production and properties. *Extremophiles*, 4:227–235.

Hankin L. y Anagnostakis SL. 1975. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. *Mycologia*. 67:597–607.

Henderson RJ, Olsen RE. y Eilertsen HC. 1991. Lipid composition of phytoplankton from the Barents Sea and environmental influences on the distribution pattern of carbon among photosynthetic end products. *Polar research*. 10:229–238.

Hodgkins M, Mead D, Ballance DJ, Goodey A, Sudbery P. 1993. Expression of the glucose oxidase gene from *Aspergillus niger* in *Hansenulapolyomorpha* and its use as a reporter gene to isolate regulatory mutations. *Yeast*. 9: 625-635.

Hodgson VJ, Button D. y Walker GM. 1995. Anti-Candida activity of a novel killer toxin from the yeast *Williopsis mrakii*. *Microbiology*. 141:2003-2012.

Huston AL, Krieger-Brockett BB. y Deming JW. 2000. Remarkably low temperature optima for extracellular enzyme activity from Arctic bacteria and

sea ice. *Environmental Microbiology*. 2:383–388.

Joseph B, Ramteke PW. y Thomas G. 2008. Cold active microbial lipases: some hot issues and recent developments. *Biotechnology Advances*. 26:457–470.

Kappen L. 1993. Lichens in the Antarctic region. In: *Antarctic microbiology*. Wiley-Liss. p. 433-490. New York.

Kasana RC. y Gulati A. 2011. Cellulases from psychrophilic microorganisms: a review. *Journal of Basic Microbiology*. 51:572–579.

Krishnan A, Alias SA, Wong CMVL, Pang K-L, Convey P. 2011. Extracellular hydrolase enzyme production by soil fungi from King George Island, Antarctica. *Polar Biology*. 34:1535–1542.

Kubackova M, Karacsonyi S. y Varadi J. 1975. Studies on xylanase from Basidiomycetes. Selection of strains for the production of xylanase. *Folia Microbiologica*. 20: 29-37.

Kumar L, Awaṣṡhi G. y Singh B. 2011. Extremophiles: A novel source of industrially important enzymes. *Biotechnology* 10(2): 121-135.

Kusai K, Sekuzu I, Hagihara B, Okunuki K, Yamauchi S, Nakai M. 1960. Crystallization of glucose oxidase from *Penicillium amagasakiense*. *Biochimica et Biophysica Acta*. 40:555-557.

Lenski RE. y Riley MA. 2002. Chemical warfare from an ecological perspective. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 99: 556-8.

Malherbe D, Du Toit M, Cordero Otero R, Van Rensburg P, Pretorius I. 2003. Expression of the *Aspergillus niger* glucose oxidase gene in *Saccharomyces cerevisiae* and its potential applications in wine production. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 61: 502-511.

Margesin R. y Miteva V. 2011. Diversity and ecology of psychrophilic microorganisms. *Research in Microbiology*. 162:346–361.

Margesin R, Zacke G y Schinner F. 2002. Characterization of heterotrophic microorganisms in alpine glacier cryoconite. *Artic, Antarctic Alpine Research*. 34: 88–93.

Marquina D, Santos A y Peinado JM. 2002. Biology of killer yeasts. *International Microbiology*. 5: 65-71.

McCarthy AJ, Peace E y Broda P. 1985. Studies on the extracellular xylanase activity of some thermophilic actinomycetes. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 21:238–244.

Morita RY. 1975. Psychrophilic bacteria. *Bacteriology Reviews*. 39:144–167.

Onofri S, Selbmann L, Hoog GS, Grube M, Barreca D, Ruisi S, Zucconi L. 2007a. Evolution and adaptation of fungi at boundaries of life. *Advances in*

Space Research. 40:1657–1664.

Nedzarek A y Rakusa-Suszczewski S. 2004. Decomposition of macroalgae and the release of nutrients in Admiralty Bay, King George Island, Antarctica. *Polar Bioscience*. 17:16–35.

Onofri S, Zucconi L y Tosi S. 2007b. Continental Antarctic fungi. p. 1-247. Eching bei Munchen: *IHW-Verlag*, ISBN: 978-3-930167-67-8.

Parpinello GP, Chinnici F, Versari A, Riponi C. 2002. Preliminary study on glucose oxidase-catalase enzyme system to control the browning of apple and pear purees. *Food Science and Technology*. 35: 239-243.

Pickard J. y Seppelt RD. 1984. Phytogeography of Antarctica. *Journal Biogeography*. 11:83-102.

Pluschkell S, Hellmuth K. y Rinas U. 1996. Kinetics of glucose oxidase excretion by recombinant *Aspergillus niger*. *Biotechnology and Bioengineering*. 51: 215-220.

Quanfu W, Yanhua H, Yu D, Peisheng Y. 2012. Purification and biochemical characterization of a cold-active lipase from Antarctic sea ice bacteria *Pseudoalteromonas sp.* NJ70. *Molecular Biology Reports*. 39:9233–9238.

Raspor P. y Zupan J. 2006. Yeast in extreme environments. *Yeast*

Handbook. Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts. Rosa CA & Peter G, (eds). pp. 371–417. Springer-Verlag, Berlin.

Read DJ. Y Perez-Moreno J. 2003. Mycorrhizas and nutrient cycling in ecosystems a journey towards relevance? *New Phytologist*. 157:475-492.

Robinson CH. 2001. Cold adaptation in Arctic and Antarctic fungi. *New Phytologist*. 151:341–353.

Rubio MC, Rosa R. y Navarro AR. 2002. Invertase from a strain of *Rhodotorula glutinis*. *Phytochemistry*. 61:605– 609.

Ruisi S, Barreca D, Selbmann L, Zucconi L, Onofri S. 2007. Fungi in Antarctica. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology* 6:127–141.

Sambrook J. y Russell D. 2001. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor. Laboratory Press. N.Y.

Schmitt M, y Breinig F. 2002. The viral killer system in yeast: from molecular biology to application. *FEMS Microbiology Reviews*. 26: 257-76.

Schmitt MJ. y Breinig F. 2006. Yeast viral killer toxins: lethality and self-protection. *Nature Reviews Microbiology*. 4:212–221.

Schmitt M. y Tipper D. 1990. K28, a unique double-stranded RNA killer virus of *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology* 10: 4807-

4815.

Scorzetti G, Petrescu I, Yarrow D, Jack, Fell J. W. 2000. *Cryptococcus adeliensis* sp. nov., a xylanase producing basidiomycetous yeast from Antarctica. *Antonie van Leeuwenhoek*. 77(2)153.

Shivaji S. y Prasad GS. 2009. Antarctic yeasts: biodiversity and potential applications. In: Satyanarayana T, Kunze G (eds) *Yeast biotechnology: diversity and applications*. Springer. pp 3–18. Amsterdam.

Singh P, Tsuji M, Mohan S, Singh S, Roy U y Hoshino T. 2013. Taxonomic characterization, adaptation strategies and biotechnological potential of cryophilic yeasts from ice cores of Midre Lovénbreen glacier, Svalbard, Arctic. *Cryobiology*, 66: 167–175.

Slifkin M. 2000. Tween 80 opacity test responses of various *Candida* species. *Journal of Clinical Microbiology*. 38:4626.

Smith RIL. 1984. Terrestrial plant biology of the Sub-Antarctic and Antarctic. In: *Antarctic Ecology*. Academic Press. pp. 61-162. London.

Strauss ML, Jolly NP, Lambrechts MG, Van Rensburg P. 2001. Screening for the production of extracellular hydrolytic enzymes by non-*Saccharomyces* wine yeasts. *Journal of Applied Microbiology*. 91:182–190.

Sulo P. y Michalcakova S. 1992. The K3 type killer strains of genus *Saccharomyces* for wine production. *Folia Microbiologica*. 37: 289-294.

Sulo P, Michalcakova S. y Reiser V. 1992. Construction and properties of K1 type killer wine yeasts. *Biotechnology Letters*. 14: 55-60.

Teather RM. y Wood PJ. 1982. Use of Congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. *Applied and Environmental Microbiology*. 43:777.

Tsuge H, Natsuaki O. y Ohashi K. 1975. Purification, properties, and molecular features of glucose oxidase from *Aspergillus niger*. *Journal of Biochemistry*. 78: 835-843.

Turchetti B, Buzzini P, Goretti M, Branda E, Diolaiuti G, D'Agata C, Smiraglia C, Vaughan-Martini A. 2008. Psychrophilic yeasts in glacial environments of Alpine glaciers. *FEMS Microbiology Ecology*. 63:73–83.

Turkiewicz M, Pazgier M, Kalinowska H, Bielecki S. 2003. A cold- adapted extracellular serine proteinase of the yeast *Leucosporidium antarcticum*. *Extremophiles*. 7:435–442.

Uetake J, Yoshitaka Y, Naoko N, Hiroshi K. 2012. Isolation of oligotrophic yeasts from supraglacial environments of different altitude on the Gulkana Glacier (Alaska). *FEMS Microbiology Ecology*. 82:279–286.

Vakhlu J. y Kour A. 2006. Yeast lipases: enzyme purification, biochemical properties and gene cloning. *Electronic Journal of Biotechnology*. 9:69–85.

Vaz ABM, Rosa LH, Vieira ML, Garcia V, Brandao LR, Teixeira LCRS, Moliné M, Libkind D, Van BMG, Rosa CA. 2011. The diversity, extracellular enzymatic activities and photoprotective compounds of yeasts isolated in Antarctica. *Brazilian Journal of Microbiology*. 43:937–947.

Velasco-Castrillon A, Schultz MB, Colombo F, Gibson JAE, Davies KA. 2014. Distribution and Diversity of Soil Microfauna from East Antarctica: Assessing the Link between Biotic and Abiotic Factors. *PLoS ONE* 9(1): e87529.

Villarreal P, Carrasco M, Barahona M, Alcaíno J, Cifuentes C, Baeza M. 2016. Tolerance to ultraviolet radiation of psychrotolerant yeasts and analysis of their carotenoid, mycosporine, and ergosterol content. *Current Microbiology*. 72:94-101.

Vishniac HS. 2006. Yeast biodiversity in the Antarctic. In: Rosa CA, Peter G (eds) *Biodiversity and ecophysiology of yeasts*. pp 221–240. Springer, Berlin.

Vishniac HS. 1987. Psychrophily and systematics of yeast-like fungi. *Studies in Mycology*. 30: 389-402.

Walker GM, McLeod AH, y Hodgson VJ. 1995. Interactions between killer yeasts and pathogenic fungi. *FEMS Microbiology Letters*. 127:213–222.

Wiacek-Zychlinska A, Czakaj J, Sawicka-Zukowska R. 1994. Xylanase production by fungal strains in solid-state fermentations. *Bioresources*

Technology. 49: 13-16.

Yang L, Xiong H, Zhang X, Wang S, Zhang X. 2011. Direct electrochemistry of glucose oxidase and biosensing for glucose based on boron-doped carbon-coated nickel modified electrode. *Biosensors and Bioelectronics*. 26: 3801-3805.

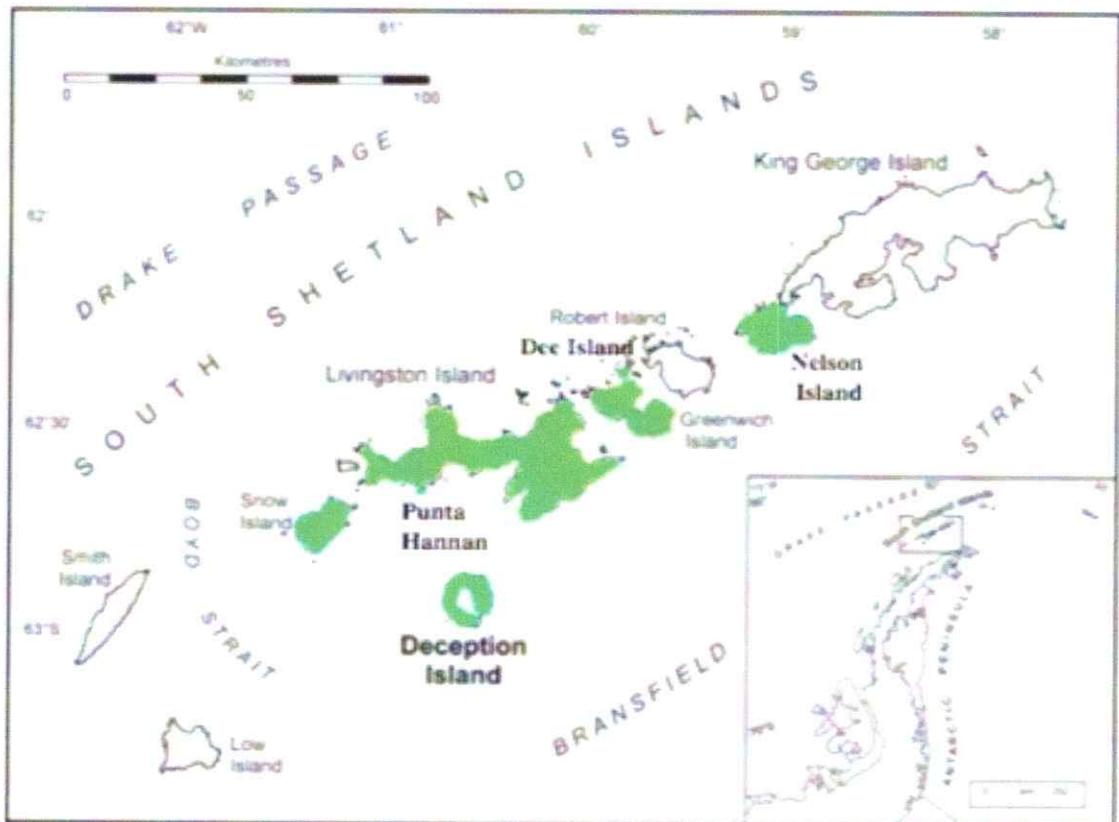
Yergeau E, Kowalchuk GA. 2008. Responses of Antarctic soil microbial communities and associated functions to temperature and freeze thaw cycle frequency. *Environmental Microbiology*. 10:2223–2235.

Yergeau E, Kang S, He Z, Zhou J, Kowalchuck GA. 2007. Functional microarray analysis of nitrogen and carbon cycling genes across and Antarctic latitudinal transect. *ISME Journal*. 1:163-179.

Young TW. y Yagiu M. 1978. A comparison of the killer character in different yeasts and its classification. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 44:59-77.

6. ANEXOS

7.1 Mapa toma de muestras (en verde)



Mapa 1: Archipiélago de las Islas Shetland del Sur, mostrando la ubicación de las Islas Nelson, Dee, Decepción, Snow, Greenwich (Base Prat) y Livingston (Pta. Hannan)