

Aislamiento y caracterización bioquímica de levaduras antárticas, y análisis de actividad enzimática extracelular.

Memoria de Título
Entregada a la Universidad De Chile
En cumplimiento parcial de los requisitos para optar
al título de

Ingeniero en Biotecnología Molecular
Facultad De Ciencias

Por

Juan Manuel Rozas Andaur
Agosto, 2011.

VCH-FC
Biotecnología

R.893

C.1

ESCUELA DE PREGRADO – FACULTAD DE CIENCIAS – UNIVERSIDAD DE CHILE



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por el Sr.

JUAN MANUEL ROZAS ANDAUR

“AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LEVADURAS ANTÁRTICAS, Y ANÁLISIS DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EXTRACELULAR”

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

Dr. Marcelo Baeza C.
Director de seminario de título

Comisión de Evaluación

Dr. Michael Handford
Presidente Comisión

Dr. Nicolás Guiliani
Evaluador

Michael Handford

BIOGRAFÍA



Nací un lunes 26 de Octubre de 1987 en la ciudad de Santiago, hijo de Juan Rozas Garrido y Ángela Andaur Cabezas. Realicé la enseñanza básica y media en el Instituto La Salle, ubicado en la Comuna de La Florida. Desde pequeño fui fanático del fútbol y del gran equipo Colo-Colo, formé parte de las selecciones de fútbol de mi colegio, al cual representé hasta salir de cuarto medio. Al finalizar esta etapa, llegaba el momento de entrar a la universidad. Opté por estudiar Ingeniería en Biotecnología, debido a que siempre me gusto la ciencia y a través de ella, descubrir cosas nuevas para luego poder aplicarlas a nivel industrial. Ingresé a estudiar esta carrera el año 2006, donde luego de tres años de formación, en el año 2008, empecé a realizar un seminario bibliográfico en el Laboratorio de Genética respecto a las partículas tipo virus y al fenotipo killer que presentan las levaduras. Luego realicé dos unidades de investigación relacionadas a este mismo tema, hasta que el año 2010 cambié mi línea de investigación, puesto que comencé a realizar esta Memoria de Título, sobre aislamiento y caracterización bioquímica de levaduras antárticas. Actualmente soy estudiante del Magíster en Ciencias Biológicas con mención Microbiología de la Facultad de Ciencias de la Universidad, continuando con la línea de investigación de este trabajo.



**A mi madre Ángela y
abuelos Amina, Chela y
Willy (Guatón)....**

AGRADECIMIENTOS

Agradezco en primer lugar a mi mamá, Ángela. Tú me diste la vida, me cuidaste y criaste y gracias a ti nunca me faltó nada. Lo que más valoro de ti, es que nadie nace sabiendo ser madre, pero tú fuiste padre y madre a la vez cumpliéndolo de manera increíble. Eres un ejemplo de mujer, madre y persona. Todo lo que soy te lo debo a ti. A mi abuela Amina y tía-abuela Chela, por cuidarme desde pequeño, aguantar cada una de mis tonteras y por entregarme un amor infinito sin condición. A mi tío-abuelo, padrino y padre Willy (Guatón), por entregarme cariño, escucharme y aconsejarme. Por ser una imagen paterna y comportarte como tal. Se que desde el cielo me sigues cuidando y ayudando a lograr mis metas, es por eso que cada uno de mis logros van dedicados a ti, mi padre.

Al Laboratorio de Genética de la Facultad de Ciencias que me abrió las puertas y me permitió crecer como científico. Al Dr. Marcelo Baeza por creer en mi y darme la oportunidad de unirme a su grupo de trabajo, por siempre estar ahí para responder cualquier duda y por lo consejos tanto laborales como personales. Al Dr. Víctor Cifuentes por permitirme realizar la tesis en su laboratorio, por aceptarme aún siendo del Colo-Colo y por no echarme cuando llegaba con la polera del campeón luego de haberle ganado al archirrival la "U". A la Dony y Jenny por ayudarme a desenvolverme mejor en el laboratorio, escuchar cada una de mis preguntas y tener la disposición de responderlas siempre. Mención especial al Salva, por ayudarme constantemente en el laboratorio dejando incluso de lado sus cosas, por aclarar cada una de mis dudas, desde como utilizar un equipo hasta decirme donde se almacena tal o cual producto, gracias. A todos mis compañeros de Lab, por hacer menos monótono cada día de trabajo, por siempre estar

tirando la talla y riéndonos de cada cosa que pasaba o que alguien decía. Al notable grupo de trabajo Killer-Antártico, conformado por Ori, Natty, Pablo (Papáblo) y Mario, por siempre tirar la talla en nuestro mesón, por apoyarnos cuando fue necesario y por aportar cada uno con sus consejos al desarrollo de esta Memoria de Título. Finalmente, cómo no agradecer cada una de las salidas extraprogramáticas de GenLab y cada cumpleaños celebrado en nuestro laboratorio.

A mis compañeros y amigos de colegio, Blago, Keno, Perro, JuanPa, Nico L., Nico R., Nacho, etc. por seguir siendo amigos aunque pasen los años y porque por más que cada uno haya seguido su camino, el fútbol nos mantiene unidos.... bueno, además de los carretes, asados, etc. A mi grupo de "estudio" durante el transcurso de mi carrera: Lela, Lea, José y Pablo, que más que estudiar nos juntábamos a conversar, contar chistes y molestar al Leandro. Al Pablo por llevar su PlayStation, dos controles y el famoso Winning. Y como no hacer mención, al despertador de Leandro "Cambiate al amarillo..." de Lipigas.

Por último agradezco a mis amigos: Mario, Blago, Mauro, Keno, JuanPa, Ori, Sandra, Dani y Lele, por estar siempre ahí, por escucharme cuando tuve un problema y por los varios carretes para salir de la rutina y estrés. En forma especial agradezco a Tam, por estar este último tiempo a mi lado, ayudándome en todo, aguantándome y haciéndome feliz día a día. Finalmente agradezco al Instituto Chileno Antártico que a través de su proyecto T-23-09 financió este trabajo.

ÍNDICE DE MATERIAS

ÍNDICE DE MATERIAS.....	2
ÍNDICE DE TABLAS.....	4
ÍNDICE DE FIGURAS.....	5
ABREVIATURAS.....	6
RESUMEN.....	8
ABSTRACT.....	10
1. INTRODUCCIÓN	12
1.1 Microorganismos psicrófilos.	13
1.2 Levaduras aisladas desde ambientes fríos.....	15
1.3 Levaduras aisladas desde el territorio Antártico.	15
1.3.1 Isla Rey Jorge, Antártica.....	16
1.4 Aislamiento y caracterización de levaduras psicrófilas desde muestras ambientales.	17
1.5 Identificación y caracterización basada en morfología y fisiología.	17
1.6 Enzimas activas a bajas temperaturas.	19
1.7 Levaduras Antárticas y su potencial uso biotecnológico.	20
2. HIPÓTESIS.....	23
3. OBJETIVOS	25
3.1 Objetivo general	26
3.2 Objetivos específicos.....	26
3.2.1 Aislar levaduras desde muestras de suelo y agua recolectadas en el territorio Antártico.....	26
3.2.2 Analizar y agrupar las levaduras obtenidas de acuerdo con sus características morfológicas y determinar sus temperaturas de crecimiento.....	26
3.2.3 Determinar la capacidad de las levaduras para asimilar diferentes fuentes de carbono.	26
3.2.4 Determinar las actividades enzimáticas extracelulares presentes en las levaduras. ...	26
4. MATERIALES Y MÉTODOS	27

4.1 Materiales.....	28
4.1.1 Muestras.....	28
4.1.2 Reactivos Químicos.....	30
4.1.3 Medios de cultivo.....	30
4.2 Métodos.....	30
4.2.1 Aislamiento de levaduras desde muestras de tierra.....	30
4.2.2 Aislamiento desde muestras de agua.....	31
4.2.3 Caracterización macromorfológica.....	31
4.2.4 Preservación de levaduras.....	32
4.2.5 Asimilación de distintas fuentes de carbono.....	32
4.2.6 Ensayos de actividades enzimáticas extracelulares.....	33
5. RESULTADOS.....	36
5.1 Aislamiento de levaduras desde el territorio antártico chileno.....	37
5.2 Caracterización macromorfológica de los aislados.....	38
5.3 Determinación de la temperatura óptima de crecimiento.....	40
5.4 Caracterización bioquímica e identificación tentativa de levaduras.....	43
5.5 Actividades enzimáticas extracelulares.....	50
6. DISCUSIÓN.....	53
6.1 Aislamiento de levaduras desde el territorio antártico chileno.....	54
6.2 Caracterización macromorfológica de los aislados.....	55
6.3 Temperaturas de crecimiento.....	56
6.4 Caracterización bioquímica e identificación tentativa de los aislados.....	59
6.5 Actividades enzimáticas extracelulares.....	64
6.5.1 Actividad lipasa.....	64
6.5.2 Actividad esterasa.....	65
6.5.3 Actividad proteasa.....	66
6.5.4 Actividad amilasa.....	67
6.5.5 Actividad celulasa.....	67
7. CONCLUSIONES.....	70
8. PROYECCIONES.....	72
9. BIBLIOGRAFÍA.....	74
10. ANEXOS.....	80

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Enzimas utilizadas a nivel industrial.....	22
Tabla 2. Procedencia y características de las muestras.....	29
Tabla 3. Agrupamiento de los aislados según sus características macromorfológicas.....	39
Tabla 4. Crecimiento de los aislados a distintas temperaturas.....	42
Tabla 5. Identificación de levaduras mediante el software <i>apiweb</i> TM bioMérieux.....	49
Tabla 6. Ensayos de actividades enzimáticas extracelulares en placas de agar.....	52
Tabla 7. Asimilación de distintas fuentes de carbono.....	81



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Actividad enzimática dependiente de temperatura.....	20
Figura 2. Locación de las zonas de muestreo. Isla Rey Jorge, Antártica chilena.....	29
Figura 3. Procesamiento de una muestra con el Monitor 55-Plus.....	31
Figura 4. Levaduras aisladas desde el territorio Antártico chileno.....	37
Figura 5. Evaluación de la utilización de las distintas fuentes de carbono.....	45
Figura 6. Determinación del bionúmero en base a la asimilación de distintas fuentes de carbono.....	48
Figura 7. Actividades enzimáticas extracelulares presentes en levaduras aisladas desde el territorio Antártico chileno.....	51



ABREVIATURAS

2KG: 2-cetogluconato potásico

ACT: Cicloheximida

ARA: L-arabinosa

CEL: D-celobiosa

ERY: Eritritol

ESC: Esculina

GAL: D-galactosa

GLN: Glucosamina

GLU: D-glucosa

GLY: Glicerol

GNT: Gluconato potásico

GRT: Glucuronato sódico

INO: Inositol

LAC: D-lactosa

LAT: Ácido láctico

LVT: Ácido levulínico

MAL: D-maltosa

MAN: D-manitol

MDG: Metil-ad-glucopiranosida

MEL: D-melibiosa

MLZ: D-melecitosa

NAG: N-acetil-glucosamina



PLE: Palatinosa

RAF: D-rafinosa

RHA: L-rhamnosa

RIB: D-ribosa

SAC: D-sacarosa

SBE: L-sorbosa

SOR: D-sorbitol

TRE: D-trehalosa

XYL: D-xilosa

hsp: heat shock proteins

YM: Yeast Medium, Medio completo para levaduras

RESUMEN

El continente Antártico comprende un área de 14 millones de kilómetros cuadrados del cual el 99% esta cubierto de hielo y nieve. Es considerado un ambiente extremo por el hecho de que es el más seco, con más viento y es el más helado de todos los hábitats conocidos en el mundo, presentando además una alta radiación solar durante la época de verano. A pesar de estas características, la Antártica hospeda una serie de formas de vida, entre las que se encuentran, bacterias, levaduras, hongos, líquenes, pequeños invertebrados, muchas especies de aves y mamíferos, las que han desarrollado distintos mecanismos que les permiten sobrevivir en estas condiciones. Muchas de las propiedades desarrolladas por los microorganismos antárticos son de gran importancia biotecnológica.

Las levaduras son un grupo de microorganismos eucariontes muy diverso que presenta una alta heterogeneidad en sus habilidades nutricionales, que les permite sobrevivir en distintos hábitats. En el continente Antártico se han encontrado levaduras pertenecientes a los géneros *Bullera*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Cystofilobasidium*, *Debaryomyces*, *Kondoa*, *Leucosporidium*, *Metschnikowia*, *Mrakia*, *Pseudozyma*, *Rhodotorula*, *Sakaguchia*, *Sporopachydermia*, *Sympodiomyces* y *Trichosporon*.

De acuerdo a lo anterior, el objetivo de este trabajo fue aislar levaduras desde el territorio Antártico chileno, caracterizarlas bioquímicamente y analizar la presencia de actividad enzimática extracelular. Para esto, las muestras de tierra y agua recolectadas en distintas zonas de la Isla Rey Jorge, ubicada en el territorio Antártico chileno, se

sembraron en placas de agar suplementadas con cloranfenicol las que fueron incubadas a diferentes temperaturas. Las levaduras obtenidas fueron agrupadas de acuerdo a su macromorfología, obteniendo 22 grupos. Se evaluó el crecimiento de las levaduras a 4, 10, 15 y 22 °C. El 79% presentó crecimiento en las cuatro temperaturas ensayadas, el 11% presentó crecimiento sólo a 4 °C y el 5% presentó crecimiento a temperaturas bajo 22 °C, indicando que las levaduras psicrófilas facultativas predominan en esta zona de estudio. De cada grupo se seleccionaron levaduras representativas, considerando la zona de aislamiento y temperatura óptima de crecimiento, y se determinó su capacidad para utilizar distintas fuentes de carbono. Las fuentes de carbono más utilizadas fueron D-glucosa, D-xilosa, D-sorbitol, D-sacarosa, D-manitol, glicerol, D-trehalosa y D-rafinosa; mientras que las menos utilizadas fueron D-lactosa, eritritol, inositol, ácido levulínico, ácido láctico, metil-ad-glucopiranosida, L-rhamnosa, D-melibiosa, L-sorbosa y glucosamina. Según los perfiles de asimilación se logró realizar una identificación preliminar de levaduras pertenecientes a los géneros *Cryptococcus*, *Sporobolomyces*, *Rhodotorula*, *Candida* y *Zygosaccharomyces*, mientras que 11 de las levaduras no pudieron ser identificadas.

Además se analizó la presencia de actividades enzimáticas extracelulares con potencial aplicación biotecnológica mediante ensayos en placas de agar, encontrándose levaduras que presentan actividad lipasa, esterasa, proteasa, amilasa y celulasa. En este trabajo se reporta por primera vez la presencia de actividad esterasa en levaduras aisladas desde el territorio Antártico.

ABSTRACT

The Antarctic Continent has an area of 14 million square kilometers, with 99% covered by ice and snow. The Antarctica is considered to be an extreme habitat because it is the driest, windiest, and coldest environment known on earth, and also is under high solar radiation in the summer season. Despite these characteristics, the Antarctic is colonized by living organisms where we can find bacteria, yeasts, fungus, lichens, little invertebrates, many bird and mammal species, which have developed different mechanisms that allow them to survive in these inhospitable conditions. Several of the properties developed by Antarctic microorganisms have potential applications in biotechnology.

Yeasts are a group of eukaryotic microorganisms that have diverse nutritional abilities necessary for their survival in different habitats. Yeasts belonging to different genera such as *Bullera*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Cystofilobasidium*, *Debaryomyces*, *Konodoa*, *Leucosporidium*, *Metschnikowia*, *Mrakia*, *Pseudozyma*, *Rhodotorula*, *Sakaguchia*, *Sporopachydermia*, *Symptodiomyces*, and *Trichosporon* have been isolated from the Antarctic Continent.

The objective of this work was to isolate yeasts from the Chilean Antarctic territory, characterize them biochemically and analyze their extracellular enzymatic activities. For this, soil and water samples were collected from different zones of Isla Rey Jorge, located in the Chilean Antarctic territory; they were seeded in agar plates supplemented with chloramphenicol, and incubated at different temperatures. The yeast

obtained were grouped according to their macromorphology, obtaining 22 groups. The growth of yeast was evaluated at 4, 10, 15, and 22 °C. 79% of them grew at the four temperatures, 11% grew only at 4°C, and 5% grew under 22°C, indicating that facultative psychrophilic yeast, dominate in the study area. Representative yeasts were selected from each group, considering their isolated zone and their optimum temperature of growth, and characterized according to the assimilation of different carbon sources. The most used carbon sources were D -glucose, D-xylose, D-sorbitol, D-sucrose, D-mannitol, glycerol, D-trehalose y D-raffinose, and the less used were D-lactose, erythritol, inositol, levulinic acid, lactic acid, methyl-ad-glucopyranoside, L-rhamnose, D-melibiose, L-sorbose, and glucosamine. According to these profiles it was possible to identify yeast belonging to the genus *Cryptococcus*, *Sporobolomyces*, *Rhodotorula*, *Candida* and *Zygosaccharomyces*, while 11 yeasts could not be identified.

The presence of extracellular enzymatic activity was also analyzed, finding yeasts that possess lipase, esterase, protease, amylase and cellulase activities. The presence of esterase activity in yeasts from the Antarctic territory was found for the first time in this work.

1. INTRODUCCIÓN

Los microorganismos presentes en el suelo y agua son un área de estudio de interés para la microbiología ambiental, debido a que aún falta mucho por descubrir, caracterizar e identificar, principalmente en ambientes hostiles para el crecimiento y desarrollo de vida microbiana. Uno de estos ambientes hostiles, son las regiones frías del planeta, como las profundidades del mar, montañas y zonas polares. Estas extremas condiciones han dificultado a los investigadores en el estudio de los microorganismos presentes ya que se requiere la utilización de técnicas poco comunes o equipo especializado (Brenchley, 1996). En la actualidad, los avances en tecnología y técnicas de laboratorio han permitido estudiar de mejor forma estos microorganismos psicrófilos, pudiendo ser aislados desde muestras ambientales y cultivados en laboratorios (Connell y cols., 2008)(Xin y Zhou, 2007).

1.1 Microorganismos psicrófilos.

Los microorganismos que han logrado colonizar satisfactoriamente ambientes fríos son llamados psicrófilos, los que dependiendo de su temperatura óptima de crecimiento, son denominados como psicrotolerantes o psicrotrofos (Margesin, 2007). Independientemente de cómo ellos hayan sido definidos, los microorganismos “psicro” están adaptados a vivir a bajas temperaturas y poseen propiedades diferentes de los que viven a temperaturas mayores. En la literatura los microorganismos capaces de crecer a bajas temperaturas, pero que su temperatura óptima se encuentra en torno a los 20-30 °C son denominados psicrófilos facultativos, en cambio aquellos en que su temperatura óptima se encuentra entre los 15-18 °C son denominados psicrófilos obligados, siendo

capaces incluso de crecer a temperaturas cercanas a 0 °C. Por último, aquellos microorganismos que poseen una temperatura óptima a 4 °C, y que sólo son capaces de crecer a temperaturas bajo los 15 °C son denominados psicrófilos extremos (Margesin, 2007)(Ramesh, 2011). Estos microorganismos han superado dos importantes desafíos, el efecto de las bajas temperaturas sobre la velocidad de las reacciones enzimáticas y el aumento de la viscosidad del entorno acuoso (D'Amico y cols., 2006). A bajas temperaturas las membranas citoplasmáticas tienden a ser menos “flexibles” afectando la permeabilidad y el transporte de nutrientes y desechos (Goodchild y cols., 2004)(Ratkowsky y cols., 2005). La replicación del DNA, transcripción y traducción, también se ven afectadas por la exposición a bajas temperaturas, debido a la formación de estructuras secundarias o estructuras “supercoil” (D'Amico y cols., 2006). Es por esto que la mayoría de estos microorganismos tienen adaptaciones especiales en sus enzimas, membranas y otros componentes celulares, que les permiten crecer en bajas temperaturas a tasas comparables con organismos mesófilos a temperaturas moderadas (Russell, 2006).

Además de las bajas temperaturas, la presión osmótica, la radiación solar, el estrés oxidativo y la disponibilidad de nutrientes, son otros factores que los microorganismos psicrófilos deben superar para sobrevivir en estas condiciones. A pesar de estos inconvenientes se puede encontrar una amplia biodiversidad microbiana, representada principalmente por bacterias, levaduras y microalgas. Las bacterias comúnmente reportadas corresponden a α -, β - y γ -proteobacteria, el phylum *Cytophaga*–

Flavobacterium-Bacteriodes, *Arthrobacter* sp. y *Micrococcus* sp. Mientras que levaduras psicrófilas de la especie *Cryptococcus* spp. han sido comúnmente aisladas desde muestras de suelo, siendo consideradas por algunos investigadores la forma de vida más importante presente en el suelo antártico (Vishniac, 1986).

1.2 Levaduras aisladas desde ambientes fríos.

Se han logrado aislar diversas levaduras psicrófilas desde Japón, Alpes Italianos, montañas del Himalaya y deshielos de glaciares en la Patagonia, las que pertenecen principalmente a los géneros *Cryptococcus*, *Mrakia*, *Cystofilobasidium*, *Aureobasidium*, *Naganishia*, *Rhodotorula*, *Rhodospiridium*, *Leucosporidiella*, *Dioszegia*, *Sporobolomyces*, *Udeniomyces* y *Candida* (Nakagawa y cols., 2004)(de García y cols., 2007)(Shivaji y cols., 2008). Sin embargo, en trabajos anteriores se ha aislado un importante número de levaduras no antes descritas, indicando que aún queda mucho por descubrir.

1.3 Levaduras aisladas desde el territorio Antártico.

En la década del 60 se aislaron levaduras desde el territorio Antártico que fueron identificadas como miembros de los géneros *Cryptococcus* y *Rhodotorula* (Di Menna, 1960). En trabajos recientes, nuevas especies de *Mrakia psychrophila* y basidiomicetes aún no identificados han sido aislados desde suelo Antártico (Xin y Zhou, 2007)(Connell y cols., 2008). En los pocos estudios realizados en este territorio, la mitad de las levaduras aisladas corresponden a especies no descritas, graficando el limitado

conocimiento que poseemos de las levaduras psicrófilas cultivables presentes en estas zonas polares.

1.3.1 Isla Rey Jorge, Antártica.

Las muestras analizadas en este trabajo fueron obtenidas desde la Isla Rey Jorge, la cual es la isla más grande del archipiélago Islas Shetland del Sur. Esta se encuentra en el sector noroeste de la Península Antártica, en la Antártica marítima. La Isla Rey Jorge alberga distintos ecosistemas y hábitats, que van desde suelos y vegetación originarias, hábitats influenciados por vertebrados como son las colonias de pingüinos, focas y las áreas de descanso de estas, hasta sitios donde existen distintos niveles de impacto humano (Krishnan y cols., 2011). Como se ha mencionado anteriormente, la diversidad microbiana presente en la Antártica está poco documentada, sin embargo 197 especies de hongos han sido reportadas desde la Península Antártica y 76 de éstas han sido reportadas desde la Isla Rey Jorge (Krishnan y cols., 2011)(Bridge y Spooner, 2008).

Se han realizado estudios a través de los cuales se han analizado las variaciones de temperatura del suelo en la Isla Signy (Davey y Pickup, 1992)(Bokhorst y cols., 2007), la cual presenta un clima marítimo y predominantemente nublado, similar al clima que presenta el archipiélago Islas Shetland del Sur. Estos estudios indican que la temperatura mínima del suelo en invierno esta comúnmente amortiguada por la nieve que lo cubre y se mantiene entre los -5 y -9 °C. Del mismo modo, es común que la

temperatura máxima del suelo a corto plazo se mantenga entre 14 – 26 °C (Krishnan y cols., 2011).

1.4 Aislamiento y caracterización de levaduras psicrófilas desde muestras ambientales.

El aislamiento de levaduras ambientales cultivables se realiza principalmente mediante el método de dilución en placas, en conjunto con el uso de medios de cultivo selectivos (Davet, 1997).

La caracterización e identificación de microorganismos ha sido ampliamente estudiada por diversos investigadores (Di Menna, 1960)(Shivaji y cols., 1989) (Rashidah y cols., 2007), utilizándose principalmente dos metodologías, la caracterización e identificación bioquímica y/o la caracterización e identificación molecular. La presente memoria de título se centra en la primera metodología.

1.5 Identificación y caracterización basada en morfología y fisiología.

Dentro de las herramientas de identificación y caracterización, se distinguen principalmente los siguientes métodos:

1.5.1 Medios de cultivo selectivo: Se utilizan diversos medios para favorecer o inhibir el crecimiento de una levadura en particular. Por ejemplo al suplementar con cicloheximida el medio de cultivo se favorece el crecimiento de algunas especies de *Candida* que son resistentes a este compuesto. Por otra parte, mediante el uso de

diferentes fuentes de carbono se favorece el crecimiento de distintas levaduras, basándose en la capacidad de asimilar distintos azúcares.

1.5.2 Temperatura de crecimiento: La temperatura óptima de crecimiento es variable entre levaduras y se ha utilizado como criterio para caracterizar diferentes especies ya que usualmente estas poseen tasas de crecimiento óptimas cercanas a 25 °C, exceptuando algunas como *Leucosporidium antarcticum* que sólo crecen a temperaturas bajo los 25 °C (Barnett y cols., 2000).

1.5.3 Análisis microscópico del crecimiento de filamentos: Éstas características permiten diferenciar entre distintas especies de levaduras, algunas de estas son capaces de producir filamentos, por ejemplo *Candida albicans*, que forma tanto pseudo hifas e hifas verdaderas, mientras que *Saccharomyces cerevisiae* puede formar pseudo hifas y otras como *Cryptococcus albidus* no producen filamentos (Barnett y cols., 2000).

1.5.4 Habilidad para utilizar diferentes compuestos como una única fuente de carbono en crecimiento aeróbico: Es posible distinguir entre las distintas especies de levaduras por sus habilidades para utilizar diferentes fuentes de carbono, los que incluyen azúcares y ácidos orgánicos entre otros. Ensayos denominados “tests de asimilación”, son usados para evaluar la habilidad que posee cada levadura para crecer en condiciones aeróbicas en medios que contienen sólo una fuente de carbono. Estos se pueden llevar a cabo de diferentes maneras: (i) en medio líquido, (ii) auxanogramas, (iii)

plaqueo en replicado y (iv) mediante kits comerciales (galerías API, Candifast, Albicans ID, etc.).

1.6 Enzimas activas a bajas temperaturas.

La presión selectiva más importante que ejercen las bajas temperaturas afecta a las distintas reacciones químicas, de las cuales la mayoría decae de manera exponencial acorde a la disminución de temperatura. A pesar de esto, los psicrófilos producen enzimas activas a bajas temperaturas que poseen actividades altamente específicas (figura 1), incluso mostrando un orden de magnitud mayor en comparación con las actividades observadas en sus contrapartes mesófilas (D'Amico, 2003)(Georlette y cols., 2004)(Russell, 2000). La posible explicación a esta capacidad se sustenta en la hipótesis de la relación que existe entre actividad-estabilidad-flexibilidad, la cual sugiere que las enzimas psicrófilas aumentan la flexibilidad de su estructura para compensar el efecto de congelamiento que producen las bajas temperaturas de los ambientes fríos (Johns y Somero, 2004).

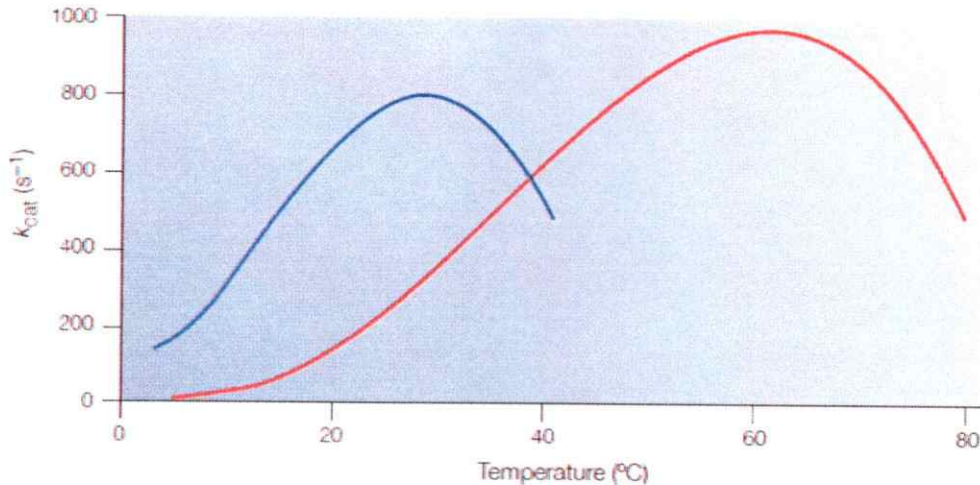


Figura 1: Actividad enzimática dependiente de temperatura. Enzimas psicrófilas (curva azul) son hasta diez veces más activas a temperaturas bajas y moderadas (hasta 20 °C y 30 °C) en comparación con sus homólogos mesófilos (curva roja). Esta actividad elevada compensa la inhibición inducida por el frío a las velocidades de reacción (adaptado desde Feller y Gerday, 2003).

1.7 Levaduras Antárticas y su potencial uso biotecnológico.

La necesidad de los organismos psicrófilos de adaptar todos sus componentes celulares al frío, implica que podemos encontrar en ellos productos con potencial aplicación a procesos biotecnológicos. Estos productos pueden ser utilizados en un amplio rango de procesos industriales, agrícolas y médicos, sin embargo, estos han sido poco utilizados. Avances recientes, particularmente con enzimas activas a bajas temperaturas prevén un rápido crecimiento en esta área de investigación, puesto que estos microorganismos producen enzimas que pueden funcionar en ambientes fríos, las cuales tienen una estructura más flexible que les permiten realizar cambios conformacionales necesarios para la catálisis con una baja demanda de energía (Arpigny y Lamotte, 1997). Además estas enzimas presentan alta actividad catalítica a bajas temperaturas, baja termoestabilidad y especificidades inusuales (Russell, 2000).

La alta actividad que presentan las enzimas psicrófilas a bajas y moderadas temperaturas ofrece potenciales beneficios económicos, como el ahorro de energía en procesos a gran escala al no requerir incrementar la temperatura de los reactores. En la Tabla 1, se muestran las enzimas comúnmente utilizadas a nivel industrial y sus características. Incluso éstas enzimas podrían ser usadas a nivel doméstico, por ejemplo, lavar ropas a bajas temperaturas protege los colores originales de fábrica de estas, por lo que las enzimas que contienen los detergentes podrían ser reemplazadas por enzimas psicrófilas. Se ha propuesto la utilización de microorganismos psicrófilos para la biorremediación de suelos contaminados y para limpiar desechos de las aguas en países templados durante el invierno, cuando la capacidad de degradación de la microflora endógena se encuentra drásticamente disminuida por efecto de las bajas temperaturas.

En trabajos previos se han descrito enzimas extracelulares de interés industrial que son producidas por levaduras obtenidas desde el territorio antártico, como son lipasas (Shivaji y Prasad, 2009)(Turkiewicz y cols., 2003), proteasas (Vishniac, 1985)(Turkiewicz y cols., 2003)(Ray y cols., 1992), amilasas (De Mot y Verachtert, 1987) y celulasas (Krishnan y cols., 2011). Sin embargo, la mayoría de los metabolitos han sido aislados desde bacterias (Morita y cols., 1997)(Cavicchioli, 2002). El estudio de enzimas extracelulares producidas por hongos provenientes de suelo antártico capaces de hidrolizar compuestos es aún escaso, y prácticamente ninguno de estos estudios se ha llevado a cabo en la Antártica marítima (Krishnan y cols., 2011).

Tabla 1: Enzimas utilizadas a nivel industrial*.

Enzimas utilizadas en procesos industriales		
Industria	Enzimas	Aplicación
Detergentes	Proteasa	Remoción de manchas causadas por proteínas
	Lipasa	Remoción de manchas causadas por lípidos
	Celulasa	Limpieza, clarificación del color, anti-redeposición (algodón)
	Amilasa	Remoción de manchas causadas por almidón
Almidón y combustible	Amilasa	Licuefacción de almidón y sacarificación
	Proteasa	Proteasa (nutrición de levaduras – combustible)
Alimento (incluido productos lácteos)	Proteasa	Coagulación de la leche, fórmulas para lactantes (bajo en alérgicos), sabor
	Lipasa	Sabor del queso
Hornear	Amilasa	Suavidad y volumen del pan, ajuste de la harina
	Lipasa	Estabilidad de la masa y acondicionamiento
	Proteasa	Galletas
Bebidas	Amilasa	Tratamiento de jugos, cerveza baja en calorías
Textil	Celulasa	Ablandamiento del algodón
	Amilasa	Cálculo del tamaño
Pulpa y papel	Lipasa	Control de intensidad, control de contaminantes
	Proteasa	Remoción del biofilm
	Amilasa	Capa de almidón, destintado, mejora de drenaje
	Celulasa	Destintado, mejora de drenaje, modificación de la fibra
Grasas y aceites	Lipasa	Transesterificación
Síntesis orgánica	Lipasa	Resolución de alcoholes quirales y amidas

*Kirk y cols. (2002).

2. HIPÓTESIS

“Existen zonas en la Antártica que no están intervenidas por el hombre, posiblemente habitadas por microorganismos que aún no conocemos. Desde muestras de esta región antártica se espera encontrar especies de levaduras psicrófilas aún no descritas, que podrán ser de gran interés biotecnológico”

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Aislar levaduras desde el territorio Antártico chileno, y caracterizarlas a nivel fisiológico y de actividades enzimáticas extracelulares.

3.2 Objetivos específicos

3.2.1 Aislar levaduras desde muestras de suelo y agua recolectadas en el territorio Antártico.

3.2.2 Analizar y agrupar las levaduras obtenidas de acuerdo con sus características morfológicas y determinar sus temperaturas de crecimiento.

3.2.3 Determinar la capacidad de las levaduras para asimilar diferentes fuentes de carbono.

3.2.4 Determinar las actividades enzimáticas extracelulares presentes en las levaduras.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Materiales

4.1.1 Muestras

Las muestras fueron recolectadas por Salvador Barahona desde la Isla Rey Jorge ($62^{\circ} 23' 0''$ S; $58^{\circ} 67' 0''$ O) del territorio Antártico chileno, en el mes de Enero durante la época de verano (figura 2).

4.1.1.1 Muestras de Tierra

Se utilizaron para el estudio 33 muestras de tierra (tabla 2) las cuales fueron almacenadas en tubos tipo Falcon de 50 mL. Las muestras provienen de las zonas: Cerro Picos Gemelos, Playa Elefante, Playa Lobos Marinos, Península de Barton, Punta Safield, Base China, Ardley, Bahía Almirantazgo, Lions Rump y Bahía Potter.

4.1.1.2 Muestras de Agua

Se utilizaron para el estudio 16 muestras de agua (500 mL) (tabla 2). Estas fueron obtenidas desde agua dulce y salada, provenientes de las zonas: Bahía Almirantazgo, Lions Rump, Bahía Potter, interior Bahía Fildes y Base Artigas, Collins.

Las muestras fueron trasladadas al laboratorio (Santiago, Chile) manteniendo una cadena de frío. Una vez obtenidas las muestras, estas fueron procesadas inmediatamente.

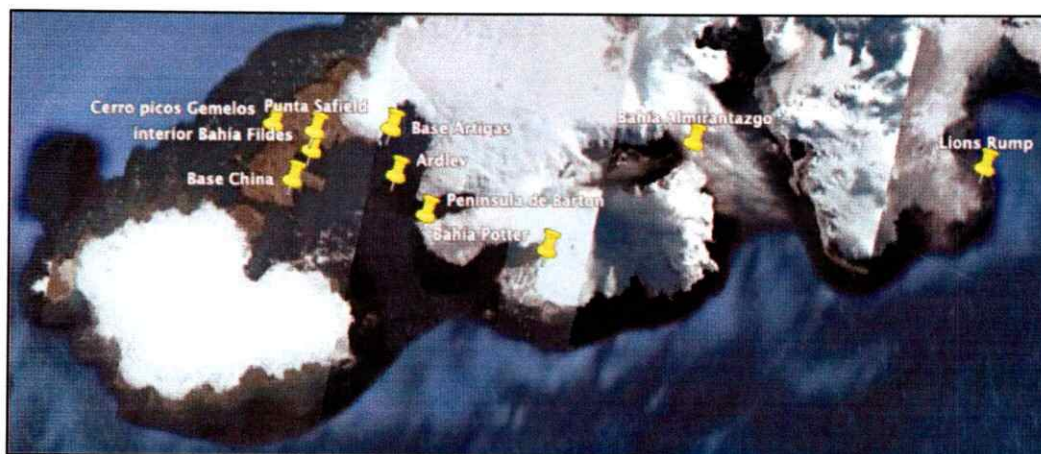


Figura 2: Locación de las zonas de muestreo. Isla Rey Jorge, Antártica chilena (Google Earth).

Tabla 2: Procedencia y características de las muestras.

Muestra*	Tipo de Muestra	Área	T° (°C)	Altura (m)
T1	Muestra de tierra	Cerro Picos Gemelos Isla Rey Jorge	1,3	34
T5	Muestra de tierra	Isla Rey Jorge	1,7	12
T8	Muestra de tierra	Isla Rey Jorge	0,2	32
T9	Muestra de tierra	Isla Rey Jorge	2	29
T11	Muestra de tierra	Península de Barton Isla Rey Jorge	11,6	0
T13	Muestra de tierra	Península de Barton Isla Rey Jorge	11	64
T15	Muestra de tierra	Península de Barton Isla Rey Jorge	4,4	74
T16	Muestra de tierra	Península de Barton Isla Rey Jorge	3,8	101
T17	Muestra de tierra	Península de Barton Isla Rey Jorge	3,9	43
T18	Muestra de tierra	Punta Safield Isla Rey Jorge	5,6	22
T19	Muestra de tierra	Punta Safield Isla Rey Jorge	5	27
T21	Muestra de tierra	Punta Safield Isla Rey Jorge	0,8	84
T26	Muestra de tierra	Arley	3,6	30
T27	Muestra de tierra	Bahía Almirantazgo	10,2	19
T29	Muestra de tierra	Lions Rump	3,08	20
T30	Muestra de tierra	Lions Rump	1,4	39
T31	Muestra de tierra	Lions Rump	1,1	80
T32	Muestra de tierra	Bahía Potter	9,2	0
T33	Muestra de tierra	Bahía Potter	7,4	0
T34	Muestra de tierra	Bahía Potter	5,8	0
H1	Muestra de agua	Bahía Almirantazgo	9,5	19
H5	Muestra de agua	Lions Rump	0,9	41
H14	Muestra de agua	interior Bahía Fildes	-	0

*Solo se describen las muestras desde las cuales se obtuvieron aislados de levaduras; -, dato no registrado.

4.1.2 Reactivos Químicos

Los componentes de los medios de cultivo fueron adquiridos en Merck y Difco Laboratorios. Los componentes para los análisis enzimáticos fueron adquiridos en Sigma Laboratorios. El antibiótico cloranfenicol fue adquirido en US Biological Laboratorios.

4.1.3 Medios de cultivo

Las muestras fueron crecidas en medio YM (0,3% de Extracto de levadura, 0,3% de Extracto de malta, 0,5% de Peptona), suplementado con 2% glucosa. Cuando fue necesario se adicionó cloranfenicol a una concentración final de 100 µg/mL. Para medios semisólidos se adicionó agar al 1,5 % p/v.

4.2 Métodos

4.2.1 Aislamiento de levaduras desde muestras de tierra

Se agregó 1 g de tierra a un tubo Falcón que contenía 5 mL de agua destilada estéril. Los tubos fueron agitados en vortex por 5 min, dejándose luego en reposo por 5 min a temperatura ambiente. Alícuotas de 200 µL de la suspensión fueron sembradas en placas de agar YM-cloranfenicol. Las placas fueron incubadas en triplicado a 4, 10, 15 y 22 °C y fueron inspeccionadas a diario para visualizar el desarrollo de levaduras. En la medida que se desarrollaban colonias, éstas fueron inmediatamente subcultivadas en placas de agar YM.

4.2.2 Aislamiento desde muestras de agua

Volúmenes de 500 mL de agua fueron filtrados y mantenidos en filtros de celulosa con medio de cultivo incorporado, utilizando el sistema de filtración de aguas Monitor 55-PlusTM, Millipore (Figura 3). Estos fueron crecidos a 4 y 10 °C, siendo inspeccionados a diario para visualizar el desarrollo de levaduras. Cuando una colonia apareció, esta inmediatamente fue subcultivada en placas de agar YM.



Figura 3: Procesamiento de una muestra con el Monitor 55-Plus (www.millipore.com).

4.2.3 Caracterización macromorfológica

La caracterización macromorfológica fue realizada según lo descrito en Barnett y colaboradores (Barnett y cols., 2000). Se analizaron las colonias de levaduras obtenidas, observándose: color, textura, forma, borde y elevación. En base a sus características similares se realizó un agrupamiento evaluando la diversidad morfológica presente en el territorio Antártico chileno.

4.2.4 Preservación de levaduras

Las levaduras fueron preservadas mediante 2 métodos: gotas de gelatina deshidratadas (Baeza y cols., 2009)(Marangon y cols., 2003), y criopreservación en 20% glicerol a -80 °C.

4.2.5 Asimilación de distintas fuentes de carbono

La asimilación de distintas fuentes de carbono se determinó mediante la utilización de la Galería API ID 32C (bioMérieux, Lion, Francia). Este sistema consiste en una galería compuesta de 32 cúpulas, de las cuales 29 contienen un substrato carbonado en forma deshidratada para ensayos de asimilación (carbohidratos, ácidos orgánicos y aminoácidos), un test de susceptibilidad (cicloheximida), un test colorimétrico (esculina) y un control negativo (sin substrato). Los procedimientos metodológicos fueron adaptados desde el manual del fabricante.

Se tomaron colonias de cada aislado de levadura suspendidas en 400 μ L de agua destilada estéril a una turbidez igual al patrón 2 de la escala "McFarland". Se tomaron 250 μ L de la suspensión y fueron transferidos a una ampolla de "API C Medium" (provista por el fabricante). Luego de homogenizar, 135 μ L de la solución fueron utilizados para inocular cada cúpula de la galería. Se tapó la galería y se incubó a la temperatura adecuada (temperatura óptima de crecimiento de cada levadura). La lectura de las galerías fue realizada de manera visual. Al comparar con el control negativo (0), el crecimiento fue determinado como positivo (+) o negativo (-) dependiendo de la

presencia o ausencia de turbidez, respectivamente. La interpretación fue realizada utilizando el programa informático de identificación *apiweb*TM, el cual transforma los signos (+) y (-) en un código numérico llamado “bionúmero”. Este bionúmero permitió una identificación preliminar de las levaduras y la comparación de su perfil de asimilación de fuentes de carbono.

4.2.6 Ensayos de actividades enzimáticas extracelulares

Los ensayos de análisis enzimáticos fueron adaptados a partir de lo descrito en Buzzini y Martini (Buzzini y Martini, 2002), que consiste en sembrar colonias de levaduras sobre placas de agar. La presencia de actividad enzimática se determina mediante la visualización de un halo alrededor de la colonia. Para evaluar las actividades enzimáticas de las diferentes levaduras, éstas fueron sembradas sobre medios específicos y las placas se incubaron hasta el desarrollo de colonias. Dichos medios se detallan a continuación:

4.2.6.1 Actividad amilasa

Composición del medio: 1% de glucosa; 0,3% extracto de levadura; 0,3% extracto de malta; 0,5% peptona; 2% almidón y 1,5% agar, pH 6,0 (Ankin y Anagnostakis, 1975). Una vez desarrolladas las colonias de levaduras se agregó a las placas 1 mL de solución de yoduro 0,5 M (Yarrow, 1998). Una halo de color amarillo pálido alrededor de la colonia, en contraste con el medio de color azul, es indicativo de presencia de actividad amilasa.

4.2.6.2 Actividad celulasa

Composición del medio: 1% glucosa; 0,3% extracto de levadura; 0,3% extracto de malta; 0,5% peptona; 0,2% carboximetilcelulosa y 1,5% agar (Strauss y cols., 2001). Después de observar crecimiento celular, la presencia de celulasas extracelulares fue detectada mediante el método de rojo Congo. Una vez desarrolladas las colonias se adiciona 1 mL de rojo Congo (1 mg/mL) por 15 min, luego de este periodo la solución de rojo Congo es eliminada de la placa de Petri y se adiciona 1 mL de NaCl 1 M por 15 min. La formación de un halo claro alrededor de la colonia indica la presencia de actividad celulasa. Para mantener estable la zona de hidrólisis por al menos dos semanas, se adiciona 1 mL de HCl 1 M con lo cual la zona de hidrólisis cambia a color azul e inhibe futura actividad enzimática (Teather, 1982).

4.2.6.3 Actividad esterasa

Composición del medio: 1% peptona; 0,5% NaCl; 0,4% $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 1% tween 80 y 1,5% agar, pH 6,8 (Slifkin, 2000). La presencia de actividad esterasa fue determinada por la presencia de un halo visible (halo opaco) alrededor de la colonia.

4.2.6.4 Actividad lipasa

Composición del medio: 1% glucosa; 0,3% extracto de levadura; 0,3% extracto de malta; 0,5% peptona; 1% tributirina y 1,5% agar, pH 6,0 (Atlas, 1993). La presencia de actividad lipasa fue observada mediante la aparición de un halo claro alrededor de la colonia, en contraste con el medio opaco.

4.2.6.5 Actividad proteasa

Composición del medio: 1% glucosa; 0,3% extracto de levadura; 0,3% extracto de malta; 0,5% peptona; 2% caseína y 1,5% agar, pH 6,5 (Strauss y cols., 2001). Una zona clara alrededor de la colonia indicó la presencia de actividad proteasa.

5. RESULTADOS

5.1 Aislamiento de levaduras desde el territorio antártico chileno

En la presente memoria se propuso aislar la mayor cantidad de levaduras a partir de muestras obtenidas desde la Isla Rey Jorge. Se utilizó medio completo YM suplementado con glucosa, y además se adicionó cloranfenicol, para inhibir el crecimiento bacteriano. Las incubaciones se realizaron a cuatro temperaturas diferentes (4, 10, 15 y 22 °C) y las placas se inspeccionaron diariamente para detectar la aparición de colonias. El tiempo de desarrollo de colonias a 4, 10, 15 y 22 °C fue de alrededor de 10, 6, 4 y 3 días, respectivamente. Un cuanto aparecía una colonia, ésta fue subcultivada en medios de cultivo frescos sin antibiótico (figura 4). Se obtuvo un total de 236 aislados, de los cuales 120 fueron levaduras. Del total de levaduras obtenidas el 79 % fueron obtenidas desde muestras de tierra y sólo el 21 % fueron obtenidas desde muestras de agua.

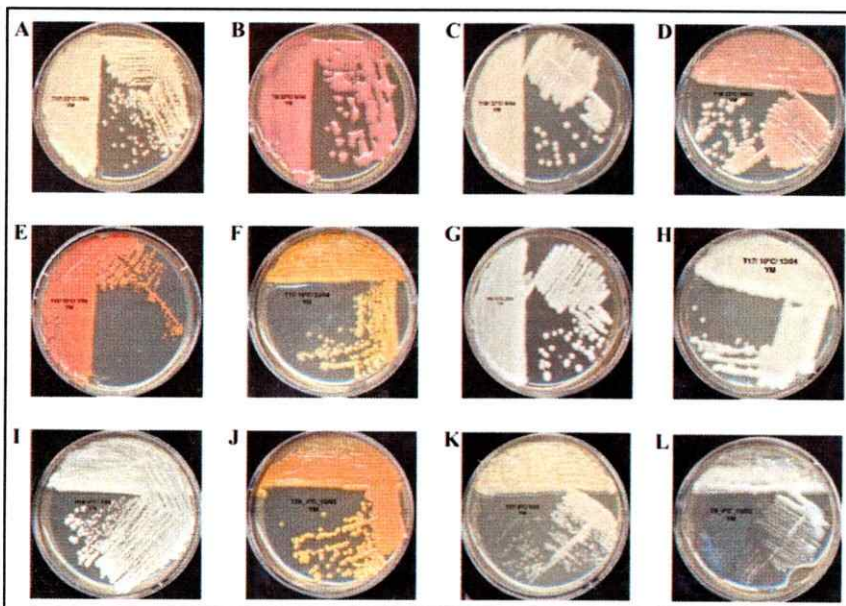


Figura 4: Levaduras aisladas desde el Territorio Antártico chileno. Levaduras aisladas desde muestras de tierra: A, B, C y D, incubadas a 22°C. E, incubada a 15°C. F y H, incubadas a 10°C. J, K y L, incubadas a 4°C. Levaduras aisladas desde muestras de agua: G, incubada a 10°C. I, incubada a 4°C.

5.2 Caracterización macromorfológica de los aislados

Los 120 aislados fueron agrupados según sus características macromorfológicas: color, textura, forma, borde y elevación. De estos 120 aislados, se seleccionaron 38 aislados representativos de acuerdo con sus características macromorfológicas. Se observaron 3 grandes grupos en base al color de los aislados seleccionados: rojo, naranja y blanco. Estos grupos fueron separados sucesivamente de acuerdo a las demás características macromorfológicas observadas, definiendo finalmente 22 grupos (tabla 3); sin embargo 17 de estos “grupos” están conformados sólo por un aislado.

Tabla 3. Agrupamiento de los aislados según sus características macromorfológicas.

Grupo	Aislados*	Características colonia: color; textura; forma; borde; elevación
1	T8 1 22C	rojo; mucosa, circular, liso, convexa
2	T13 2 22C	rojo, mucosa, circular, liso, pluvinate
3	T27 7 4C	rojo, cremosa, circular, liso, convexa
4	T1 3 22C, T16 1 22C, T21 1 22C, T21 6 10C, T27 2 10C, T27 5 22C, T29 1 22C, T31 2 10C, T32 2 22C, T34 2 10C	naranja, mucosa, circular, liso, convexa
5	T31 5 4C	naranja, mucosa, irregular, liso, convexa
6	T1 6 10C	naranja, cremosa, ovalada, liso, convexa
7	T11 1 15C, T18 1 22C, T19 1 22C, T9 15C	naranja, cremosa, circular, liso, convexa
8	T29 4 4C	naranja, cremosa, circular, liso, umbonate
9	T17 2 22C	naranja, cremosa, circular, filamentosos, convexa
10	T11 2 10C	naranja, dura, circular, filamentosos, elevada
11	T27 6 4C	naranja, dura, circular, filamentosos, convexa
12	T26 2 4C, T30 2 4C, T33 1 22C	blanco, mucosa, circular, liso, convexa
13	T17 1 10C, T18 1 10C	blanco, mucosa, circular, liso, pluvinate
14	H5 1 10C	blanco, mucosa, circular, liso, elevada
15	T5 3 4C	blanco, mucosa, circular, filamentosos, convexa
16	T9 3 4C	blanco, mucosa, circular, filamentosos, pluvinate
17	T15 22C	blanco, mucosa, irregular, liso, convexa
18	T19 1 4C	blanco, mucosa, irregular, filamentosos, convexa
19	T13 7 10C	blanco, cremosa, circular, liso, convexa
20	H14 1 4C, T11 1 10C	blanco, cremosa, circular, liso, pluvinate
21	H1 10C	blanco, cremosa, circular, liso, umbonate
22	H1 1 10C	blanco, cremosa, circular, liso, elevada

*Descripción del nombre de cada aislado, por ejemplo: T8_1_22C. T8, indica desde que muestra fue obtenido; 1, indica el número del aislado; 22C, indica la temperatura desde la cual fue obtenido.

5.3 Determinación de la temperatura óptima de crecimiento

Se determinó la temperatura óptima de crecimiento a todas las levaduras de la Tabla 3 (38), con el fin de caracterizar y lograr estandarizar la temperatura en la cual realizarían los ensayos bioquímicos y de actividad enzimática extracelular. Para esto las levaduras se crecieron en placas que se incubaron a 4, 10, 15 y 22 °C, por 10, 6, 4 y 3 días respectivamente.

En los resultados se observan diferencias en el crecimiento de las levaduras según las temperaturas de incubación (tabla 4). De acuerdo a estos se clasificaron en 5 grupos, basándose en la presencia o ausencia de crecimiento a cada temperatura ensayada. Los grupos obtenidos y el porcentaje de levaduras que lo componen fueron los siguientes:

1. Levaduras que presentaron crecimiento a las cuatro temperaturas ensayadas (4, 10, 15 y 22 °C): 79 %.
2. Levaduras que presentaron crecimiento sólo a 4 °C: 11 %.
3. Levaduras que presentaron crecimiento sólo a 4, 10 y 15 °C: 5 %.
4. Levaduras que presentaron crecimiento sólo a 10, 15 y 22 °C: 2,5 %.
5. Levaduras que presentaron crecimiento sólo a 22 °C: 2,5 %.

La mayoría de los aislados fueron capaces de crecer a las cuatro temperaturas ensayadas, presentando un mayor crecimiento a 22 °C. Por otro lado, se encontró una levadura (T27_6_4C) que presentó crecimiento sólo a 22 °C siendo incapaz de crecer a

las otras temperaturas ensayadas, lo cual resulta extraño teniendo en cuenta las condiciones climáticas presentes en las zonas desde donde fueron obtenidas las muestras.

Por el contrario, se lograron aislar levaduras que presentan crecimiento a bajas temperaturas, encontrándose levaduras que sólo crecen a 4 °C, las cuales son de gran importancia biotecnológica debido a las adaptaciones que éstas poseen para poder crecer a bajas temperaturas.

Tabla 4: Crecimiento de los aislados a distintas temperaturas.

Aislados	Temperaturas			
	22°C	15°C	10°C	4°C
H1_1_10C	+++	+++	++	++
H1_10C	+++	+++	+++	++
H5_1_10C	+++	+++	+++	++
H14_1_4C	+++	+++	+++	+++
T1_3_22C	+++	+++	+++	+++
T1_6_10C	+++	++	++	+
T5_3_4C	-	+	+	+++
T8_1_22C	+++	++	++	++
T9_15C	++	+++	++	+
T9_3_4C	-	-	-	+*
T11_1_10C	+++	+++	+++	+++
T11_1_15C	+	++	++	+++
T11_2_10C	+++	++	+	+
T13_2_22C	+++	+++	++	+++
T13_7_10C	++	+++	+++	+++
T15_22C	+++	++	++	++
T16_1_22C	+++	++	++	++
T17_1_10C	+++	+++	+++	+++
T17_2_22C	+++	+++	+++	-
T18_1_10C	+	++	++	+++
T18_1_22C	+++	++	++	+++
T19_1_22C	+++	+++	++	+++
T19_1_4C	-	-	-	+*
T21_1_22C	+++	+++	+++	+++
T21_6_10C	+++	++	++	+
T26_2_4C	-	-	-	+++
T27_2_10C	+++	++	++	+++
T27_5_22C	+++	+++	++	+++
T27_6_4C	+++	-	-	-
T27_7_4C	+++	++	++	+++
T29_1_22C	+++	++	++	++
T29_4_4C	-	-	-	+
T30_2_4C	-	+	+	+
T31_2_10C	+++	++	++	+
T31_5_4C	+++	+++	++	+++
T32_2_22C	+++	++	++	+
T33_1_22C	+++	++	++	++
T34_2_10C	+++	+++	+++	+++

(-) representa la ausencia de crecimiento; (+) a (+++) menor a mayor crecimiento. *, se observó crecimiento luego de 14 días de incubación.

5.4 Caracterización bioquímica e identificación tentativa de levaduras.

Se seleccionaron 28 aislados de acuerdo con sus características macromorfológicas, temperatura de crecimiento y zona de aislamiento, para la caracterización bioquímica. Las fuentes de carbono ensayadas en la galería API fueron 29: D-galactosa (GAL), D-sacarosa (SAC), N-acetil-glucosamina (NAG), ácido láctico (LAT), L-arabinosa (ARA), D-celobiosa (CEL), D-rafinosa (RAF), D-maltosa (MAL), D-trehalosa (TRE), 2-cetogluconato potásico (2KG), metil-ad-glucopiranosida (MDG), D-manitol (MAN), D-lactosa (LAC), Inositol (INO), D-sorbitol (SOR), D-xilosa (XYL), D-ribosa (RIB), glicerol (GLY), L-rhamnosa (RHA), palatinosa (PLE), eritritol (ERY), D-melibiosa (MEL), glucuronato sódico (GRT), D-melecitosa (MLZ), gluconato potásico (GNT), ácido levulínico (LVT), D-glucosa (GLU), L-sorbosa (SBE) y glucosamina (GLN). Además se realizaron otros 3 ensayos: i) prueba de susceptibilidad, cicloheximida (ACT); ii) prueba colorimétrica, esculina (ESC); y iii) un control negativo, sin substrato (0).

Las galerías fueron incubadas a distintas temperaturas y la lectura de éstas se realizó en dos tiempos diferentes, dependiendo de la temperatura óptima de crecimiento previamente establecida. Se determinó la capacidad de asimilar las distintas fuentes de carbono en base a la presencia (+) o ausencia de crecimiento (-), observada según la turbidez en las cúpulas. De las 28 levaduras ensayadas, los aislados T15_22C y T17_1_10C presentaron un crecimiento particular, en el cual no era posible observar turbidez homogénea en la cúpula, sino que presentaron crecimiento en forma de

aglomeraciones, asemejándose a pequeñas esferas en suspensión. Para estos aislados la presencia o ausencia de crecimiento fue determinada según la presencia (p) o ausencia (-) de aglomeraciones en las cúpulas, respectivamente (tabla 7).

En la determinación de la utilización de las fuentes de carbono (figura 5), se observa que las fuentes de carbono más utilizadas por las levaduras fueron: D-glucosa (100 %), D-xilosa (93 %), D-sorbitol (89 %), D-sacarosa (89 %), D-manitol (82 %), glicerol (79 %), D-trehalosa (75 %) y D-rafinosa (71 %). Por otro lado, las fuentes de carbono menos utilizadas fueron: D-lactosa (11 %), eritritol (14 %), inositol (29 %), ácido levulínico (29 %), ácido láctico (32 %), metil-ad-glucopiranosida (32 %), L-rhamnosa (36 %), D-melibiosa (36 %), L-sorbosa (36 %) y glucosamina (39 %).

Sólo algunas levaduras presentaron mayor crecimiento (+++) en ciertas fuentes de carbono. Éstas fueron las levaduras H1_1_10C, H1_10C y H5_1_10C que crecieron en metil-ad-glucopiranosida, glicerol y eritritol. Las levaduras H14_1_4C y T13_7_10C presentaron un mayor crecimiento en D-sorbitol. Finalmente, las levaduras T11_1_15C y T30_2_4C crecieron mejor en D-glucosa. Sólo una levadura creció en una única fuente de carbono, esta es la levadura T9_3_4C que creció sólo en D-glucosa.

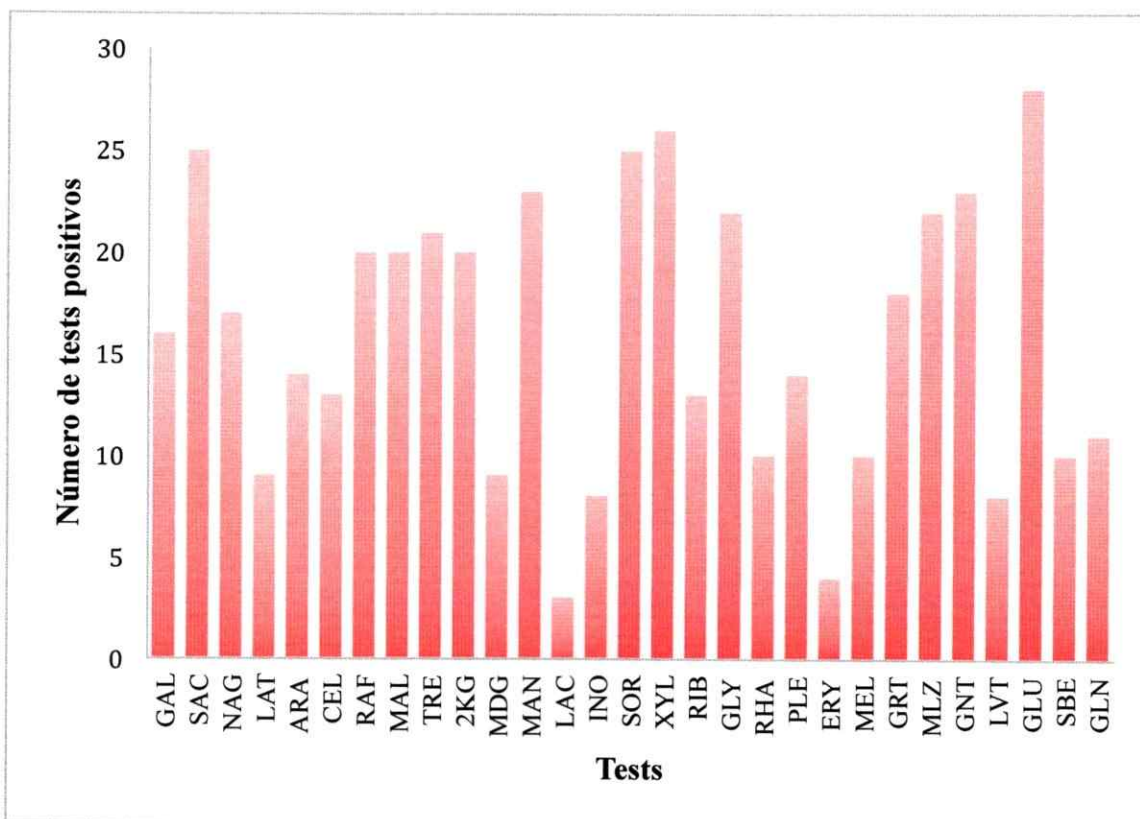


Figura 5: Evaluación de la utilización de las distintas fuentes de carbono.

Se determinó la utilización de cada fuente de carbono. En total, se realizaron 28 ensayos evaluando el número de veces que fue asimilada cada fuente de carbono. Los datos considerados fueron los obtenidos al mayor tiempo de incubación de cada galería (4 °C – 10 días; 15 °C – 4 días; 22 °C – 3 días).

Los datos obtenidos mediante la inspección visual de las galerías API ID 32 C, fueron analizados mediante el software *apiweb*TM de bioMérieux. Se agregaron los símbolos obtenidos + o - (presencia o ausencia de crecimiento) para cada fuente de carbono según corresponda. El software opera transformando estos símbolos en un bionúmero característico para cada levadura (figura 6), con el cual podemos determinar tentativamente a qué especie pertenece la levadura estudiada.

Los resultados obtenidos muestran que algunas levaduras agrupadas dentro del mismo grupo macromorfológico poseen el mismo bionúmero, por ejemplo: las levaduras T1_3_22C y T34_2_10C poseen el mismo bionúmero, por lo tanto posiblemente sean la misma levadura. Otras en cambio que pertenecen al mismo grupo morfológico, presentan un bionúmero diferente, como es el caso de los aislados T11_1_15C y T18_1_22C; T26_2_4C, T30_2_4C y T33_1_22C; T17_1_10C y T18_1_10C; H14_1_4C y T11_1_10C, lo que indicaría que estas levaduras son diferentes entre sí pero poseen características macromorfológicas similares.

Dentro de la identificación tentativa realizada, algunas levaduras presentaron perfiles inaceptables, imposibilitando así su identificación. La obtención de un perfil inaceptable no indica que el ensayo fue realizado incorrectamente o que el resultado no es correcto, si no que, el perfil bioquímico (bionúmero) de la levadura analizada no coincide con ningún bionúmero presente en la base de datos del programa *apiweb*TM. Entre las levaduras que sí pudieron ser identificadas mediante esta metodología, se encontraron desde perfiles dudosos hasta perfiles que entregaron una excelente

identificación, estos dependen del porcentaje de similitud del bionúmero obtenido con los bionúmeros presentes en la base de datos (*apiweb*TM).

En base a esta metodología se pudieron identificar 17 levaduras pertenecientes a 7 especies: *Rhodotorula minuta*, *Sporobolomyces salmonicolor*, *Cryptococcus laurentii*, *Zygosaccharomyces spp*, *Cryptococcus albidus*, *Candida pelliculosa* y *Candida parapsilosis*. En tanto, 11 levaduras no pudieron ser identificadas.

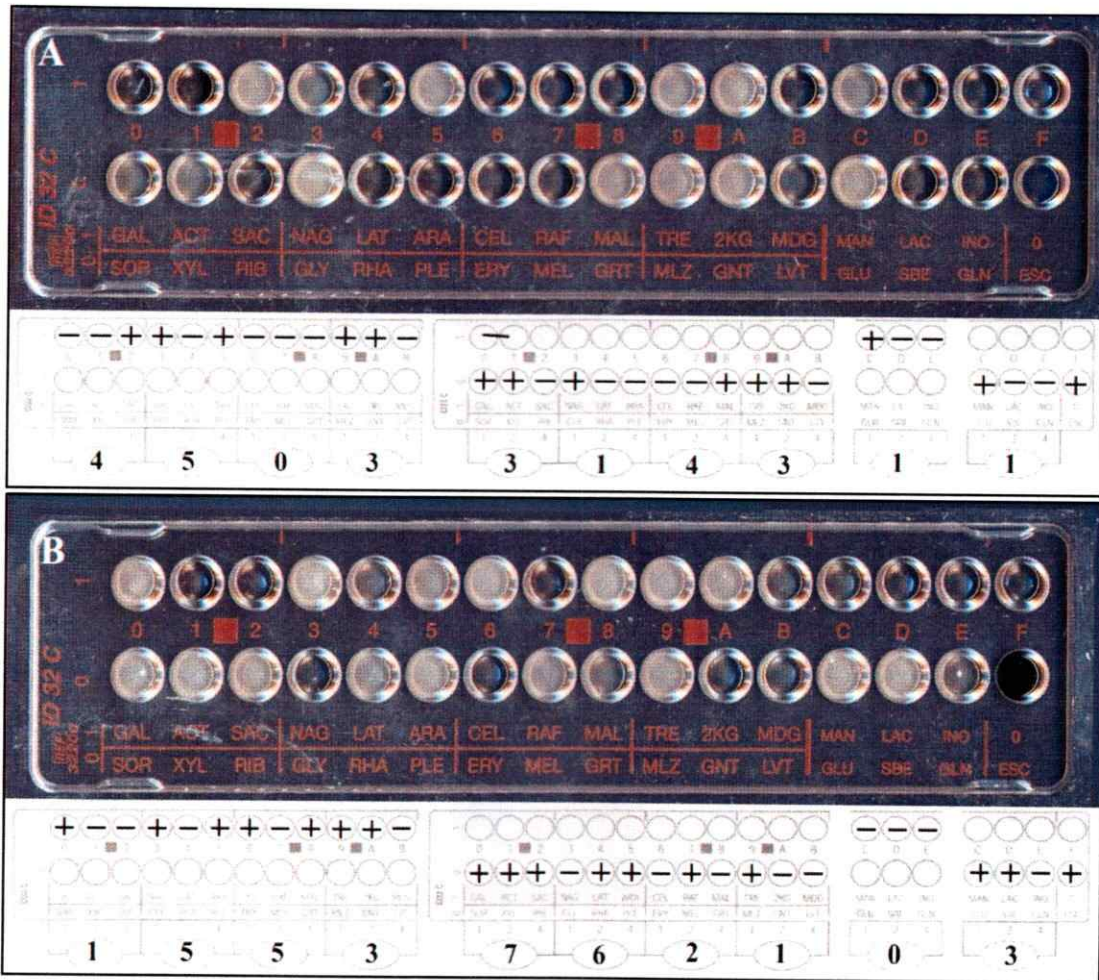


Figura 6: Determinación del bionúmero en base a la asimilación de distintas fuentes de carbono.

A, perfil bioquímico (excelente identificación) observado en la cepa T8_1_22C y el respectivo cálculo del bionúmero (4503 3143 11).

B, perfil bioquímico (perfil inaceptable) observado en la cepa T27_6_4C y el respectivo cálculo del bionúmero (1553 7621 03).

El cálculo del bionúmero se realiza sumando según corresponda los valores 1, 2 y 4 correspondiente a cada dígito del bionúmero. Si el símbolo es positivo el número es sumado, y si el símbolo es negativo el número no es tomado en cuenta para el cálculo de cada dígito del bionúmero.

Tabla 5: Identificación de levaduras mediante el software apiweb™ bioMérieux.

Cepas	Bionúmero	Perfil	Especie
T8_1_22C	4503 3143 11	Excelente identificación	<i>Rhodotorula minuta</i>
T13_2_22C	4703 3147 11	Buena Identificación	<i>Rhodotorula minuta</i>
T27_7_4C	4503 3143 11	Excelente Identificación	<i>Rhodotorula minuta</i>
T1_3_22C	4021 1002 11	Muy Buena Identificación	<i>Sporobolomyces salmonicolor</i>
T34_2_10C	4021 1002 11	Muy Buena Identificación	<i>Sporobolomyces salmonicolor</i>
T31_5_4C	4021 1002 11	Muy Buena Identificación	<i>Sporobolomyces salmonicolor</i>
T1_6_10C	4021 1002 11	Muy Buena Identificación	<i>Sporobolomyces salmonicolor</i>
T11_1_15C	5573 7443 11	Perfil Inaceptable	-
T18_1_22C	7577 7673 75	Muy Buena Identificación	<i>Cryptococcus laurentii</i>
T29_4_4C	5553 7643 11	Perfil Inaceptable	-
T17_2_22C	5552 7661 07	Perfil Inaceptable	-
T11_2_10C	5773 7763 35	Buena Identificación	<i>Cryptococcus laurentii</i>
T27_6_4C	1553 7621 03	Perfil Inaceptable	-
T26_2_4C	5173 1063 57	Perfil Inaceptable	-
T30_2_4C	0042 0000 01	Baja discriminacion	<i>Zygosaccharomyces spp</i>
T33_1_22C	4163 3541 13	Perfil Inaceptable	-
T17_1_10C	5472 2041 41	Buena identificacion	<i>Cryptococcus albidus</i>
T18_1_10C	5572 7163 53	Perfil Inaceptable	-
H5_1_10C	4264 3511 11	Muy Buena Identificación	<i>Candida pelliculosa</i>
T5_3_4C	5573 3363 57	Perfil Inaceptable	-
T9_3_4C	0000 0000 01	Baja Discriminación	<i>Zygosaccharomyces spp</i>
T15_22C	5176 7463 41	Perfil inaceptable	-
T19_1_4C	2573 3163 57	Perfil inaceptable	-
T13_7_10C	4062 3503 17	Perfil Inaceptable	-
H14_1_4C	5167 3507 17	Buena identificación en el género Perfil Dudoso	<i>Candida parapsilosis</i>
T11_1_10C	5577 7741 75		<i>Cryptococcus laurentii</i>
H1_10C	4264 3511 11	Muy Buena Identificación	<i>Candida pelliculosa</i>
H1_1_10C	4264 3511 11	Muy Buena Identificación	<i>Candida pelliculosa</i>

La identificación de las levaduras fue realizada utilizando el software apiweb™ bioMérieux. Al obtener un perfil inaceptable, no es posible identificar la levadura mediante esta metodología.

5.5 Actividades enzimáticas extracelulares.

Se analizaron distintas actividades enzimáticas extracelulares de importancia biotecnológica, las que se realizaron a 25 levaduras que fueron seleccionadas según criterios explicados anteriormente. La presencia de actividad se determinó observando un halo alrededor de la colonia, las que fueron sembradas en placas de agar semisólido. Se encontraron 5 actividades enzimáticas extracelulares presentes en levaduras, éstas fueron amilasa, celulasa, esterasa, lipasa y proteasa (figura 7). Las actividades enzimáticas fueron ensayadas a diferentes temperaturas y a distintos periodos de tiempo (tabla 6). Se encontraron levaduras que presentan desde sólo una actividad enzimática extracelular, por ejemplo H14_1_4C hasta levaduras que presentan 4 actividades por ejemplo H1_10C. Todas las levaduras presentaron al menos una actividad enzimática, pero ninguna presentó todas las actividades ensayadas. Según la temperatura de los ensayos, se encontró mayor presencia de algunas actividades enzimáticas, por ejemplo las levaduras ensayadas a 22°C presentaron mayoritariamente actividades lipasa, proteasa y esterasa. A 15 °C presentaron principalmente actividades esterasa y amilasa. Finalmente a 4 °C, se encontró mayor presencia de actividades esterasa y celulasa.

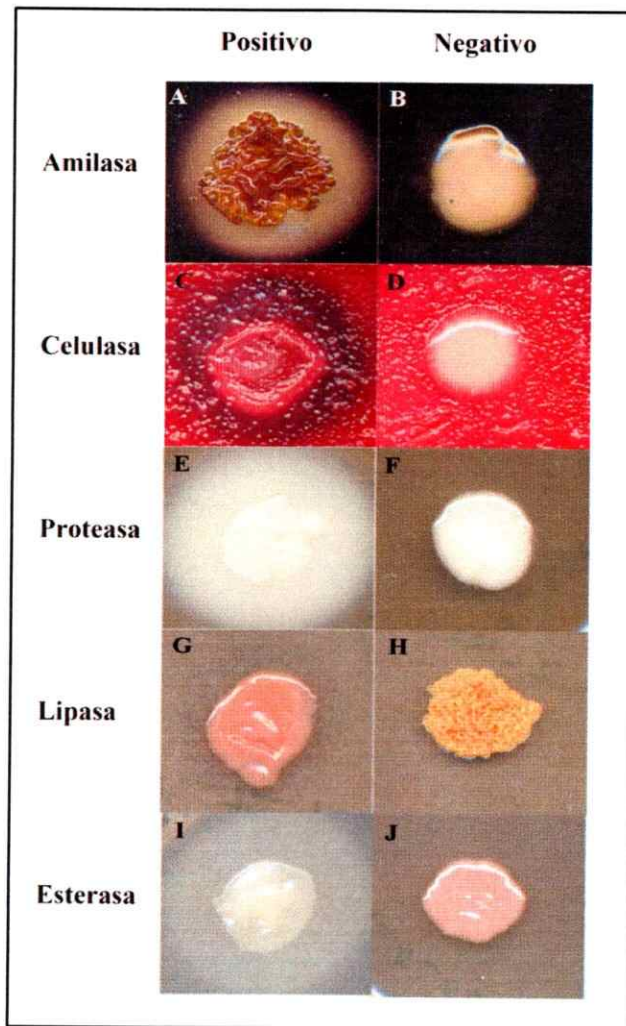


Figura 7: Actividades enzimáticas extracelulares presentes en levaduras aisladas desde territorio antártico chileno.

Las actividades enzimáticas extracelulares fueron medidas en placas de agar, encontrándose: Actividad amilasa: A positiva, B negativa; Actividad celulasa: C positiva, D negativa; Actividad proteasa: E positiva, F negativa; Actividad lipasa: G positiva, H negativa; Actividad esterasa: I positiva, J negativa. La presencia de un halo alrededor de la colonia indica la presencia de actividad enzimática extracelular.

Tabla 6: Ensayos de actividades enzimáticas extracelulares en placas de agar.

Aislados	Tº medición de actividad	Período de incubación (días)	Actividades enzimáticas				
			Lipasa	Proteasa	Esterasa	Amilasa	Celulasa
H1_10C	22°C	3	++	+++	+	-	+
H5_1_10C	22°C	3	++	+++	+	-	+
H14_1_4C	22°C	3	+	-	-	-	-
T1_3_22C	22°C	3	+	+	-	-	-
T1_6_10C	22°C	3	+	+	-	-	-
T8_1_22C	22°C	3	++	-	++	-	-
T11_1_10C	22°C	3	+	++	+	+	-
T11_2_10C	22°C	3	+	-	-	+++	++
T13_2_22C	22°C	3	++	-	+	-	-
T15_22C	22°C	3	+	+	-	++	-
T17_1_10C	22°C	3	+	+	-	++	-
T17_2_22C	22°C	3	+	+	+	-	++
T18_1_22C	22°C	3	++	-	++	-	++
T27_6_4C	22°C	3	+	+	+	-	+
T27_7_4C	22°C	3	++	-	+	-	-
T31_5_4C	22°C	3	+	+	-	-	-
T33_1_22C	22°C	3	+	-	+	-	-
T34_2_10C	22°C	3	+	+	-	-	-
T11_1_15C	15°C	4	-	-	+++	+	-
T18_1_10C	15°C	4	-	-	+	+	+++
T30_2_4C	15°C	4	-	-	+	-	-
T29_4_4C	4°C	7	-	-	+++	+	-
T29_4_4C	4°C	14	-	-	++++	+	-
T29_4_4C	4°C	21	-	-	++++	+	-
T26_2_4C	4°C	7	-	-	-	-	++++
T26_2_4C	4°C	14	-	-	-	-	++++
T26_2_4C	4°C	21	-	-	-	+	++++
T19_1_4C	4°C	7	-	-	+	-	++++
T19_1_4C	4°C	14	-	-	+++	-	++++
T19_1_4C	4°C	21	-	-	++++	-	++++
T9_3_4C	4°C	7	-	-	+	-	-
T9_3_4C	4°C	14	-	-	+++	-	-
T9_3_4C	4°C	21	-	-	+++	-	-

La determinación de presencia de actividad enzimática extracelular se realizó de manera visual, observándose la presencia de un halo alrededor de las colonias.(-) representa la ausencia de un halo; (+) a (+++++) menor a mayor distancia desde borde de la colonia hasta halo de actividad.

6. DISCUSIÓN

6.1 Aislamiento de levaduras desde el territorio antártico chileno.

La metodología utilizada en este trabajo para aislar levaduras desde muestras ambientales tiene como objetivo obtener la mayor cantidad de levaduras cultivables posibles. Las ventajas que esta presenta es ser una forma fácil, rápida y segura para encontrar levaduras cultivables que sean dominantes, pero limita la obtención de una apropiada valoración de la diversidad presente en muestras de suelo (Varma, 2007). La utilización de este método tiende a sobreestimar especies capaces de esporular en suelo, mientras que aquellas especies que se encuentran en estado de micelio o que tienen un crecimiento mas lento son en su mayoría no detectadas (Davet, 1997). Al utilizar un medio de cultivo completo o rico para el aislamiento, los nutrientes no son un factor limitante para el crecimiento de levaduras. Es por esto que las levaduras que presentan un metabolismo más rápido se vieron favorecidas al crecer mejor en exceso de nutrientes por sobre aquellas que tienen un metabolismo más lento y que su crecimiento se ve favorecido en escasez de nutrientes. Por consecuencia, utilizar este medio de cultivo puede disminuir el número de especies distintas de levaduras que se podrían aislar desde las muestras ambientales, obteniendo un número poco confiable de la diversidad de levaduras presentes en esta región (Bridge y Spooner 2003). El continuo aislamiento de levaduras similares utilizando esta metodología, indica que existen muchas otras que no responden fácilmente a este método de aislamiento (Varma 2007). Existe muy poco conocimiento acerca de las demandas medioambientales y nutricionales que presentan las levaduras que habitan el suelo, lo que presenta un problema para obtener una evaluación clara de las comunidades de levaduras presentes en dichas muestras (Varma,

2007). Se propone en futuros análisis realizar el cultivo de las muestras ambientales sobre medios mínimos o diferenciales para favorecer por ejemplo, el aislamiento de levaduras que presenten crecimiento lento. Algunas levaduras dependiendo de factores ambientales pueden presentar diferentes formas de vida, por ejemplo hifas vegetativas, esporas, estado de micelio, etc. Debido a esto, se propone analizar la composición orgánica del suelo, el pH y las condiciones ambientales del lugar desde donde provienen las muestras, para determinar condiciones que favorezcan el crecimiento de levaduras que presenten diferentes formas de vida y obtener así una mayor diversidad de especies. La diversidad de levaduras puede ser bastante alta en suelos y cada población o especie puede ocupar un nicho específico. Por lo tanto, no hay un sólo método apropiado para aislarlas todas eficientemente (Varma, 2007).

6.2 Caracterización macromorfológica de los aislados.

Realizar esta caracterización permite una clasificación inicial y describir de manera fácil y rápida las levaduras en base a sus características macromorfológicas, pudiendo estimar la diversidad de levaduras presentes en el territorio antártico chileno en base su morfología.

Se encontraron 3 grandes grupos de levaduras en base a la presencia o ausencia de pigmentación: rojo, naranja y blanco. Los pigmentos pertenecen al grupo de compuestos foto-protectores, es por esto que es esperable que un alto número de levaduras obtenidas desde el territorio antártico presenten pigmentación para protegerse

de los altos niveles radiación ultravioleta existente en esta región. En consecuencia, el 68 % de las levaduras analizadas en esta memoria, obtenidas desde muestras de tierra presentaron pigmentación (roja o naranja). En estudios anteriores ha sido posible aislar levaduras que presentan pigmentación desde muestras de agua dulce en la Patagonia argentina (Libkind y cols. 2004). En este trabajo no se obtuvieron levaduras pigmentadas a partir de muestras de agua. Esto posiblemente se debe al bajo número de aislados obtenidos (5) desde estas muestras, lo que no permite estimar correctamente la diversidad presente en ellas. La gran diferencia en el número de levaduras aisladas desde muestras de suelo en comparación con las aisladas desde muestras de agua, podría deberse a que en los ecosistemas terrestres Antárticos, la biodiversidad de levaduras incrementa con la disponibilidad de energía y agua. Además, las levaduras que habitan en agua se encuentran más diluidas en comparación con las levaduras que habitan en el suelo, lo que dificultaría su aislamiento obteniendo así un menor número de levaduras. Incluso, en estudios anteriores se sugiere que las levaduras predominan en la Antártica continental, comparado con hábitats marítimos y sub-Antárticos (Vishniac, 1996).

6.3 Temperaturas de crecimiento.

La mayoría de las levaduras fueron capaces de crecer en un amplio rango de temperaturas (4 °C a 22 °C). Dado que las muestras fueron obtenidas en la época de verano, estas regiones presentaron condiciones ambientales que permitieron encontrar levaduras capaces de crecer a 22 °C, puesto que algunas de estas fueron aisladas desde muestras en las que su temperatura variaba en un rango de 7,4 a 11,6 °C. En cambio,

otras levaduras capaces de crecer a 22 °C fueron aisladas desde muestras en que su temperatura variaba en un rango de 0,2 a 5,8 °C. Todas ellas corresponderían a levaduras psicrófilas facultativas, ya que según la literatura los microorganismos capaces de resistir bajas temperaturas pero que presentan una temperatura óptima de crecimiento por sobre los 20 °C, son llamados psicrófilos facultativos o psicrotolerantes.

Según antecedentes previos de levaduras aisladas desde el territorio antártico, éstas fueron crecidas a temperaturas iguales o bajo los 15 °C (Di Menna, 1960)(Connell y cols., 2008), otras en cambio, fueron incapaces de crecer a 25 °C (Connell y cols., 2010). Debido a esto, es importante evaluar el crecimiento de levaduras a distintas temperaturas para poder caracterizarlas de mejor manera contribuyendo al estudio de la diversidad que presenta el territorio antártico chileno. La mayoría de las levaduras aisladas (79 %) son capaces de crecer a 22 °C. Esto posiblemente se debe al clima presente en la región desde donde fueron tomadas las muestras, a la metodología utilizada para el aislamiento y el medio de cultivo donde fueron crecidas. Respecto al clima que presenta esta región, la Isla Rey Jorge se encuentra hacia el norte de la región Antártica marítima, experimentando un microclima que es fuertemente amortiguado por el océano circundante, permitiendo que el rango de temperaturas se encuentre entre los 5 y 10 °C, siendo esperable el rango de temperaturas de las muestras obtenidas (0,2 - 11,6 °C) para los suelos del norte de la Antártica marítima durante el verano austral (Davey y cols., 1992)(Arnold y cols., 2003). Esto posibilita encontrar un mayor porcentaje de levaduras capaces de crecer a 22 °C en esta región. Además, se ha planteado que la termotolerancia que presentan estos microorganismos a temperaturas sobre los 20 °C,

puede ser atribuido a la capacidad de estas levaduras para sintetizar “heat shock proteins” (hsp) y/o a la acumulación de trehalosa (Deegenars y Watson, 1997, 1998). La metodología de dilución en placas sobreestima a microorganismos capaces de esporular en suelo, dejando de lado especies que presentan un crecimiento lento. La esporulación puede ser favorecida por condiciones medioambientales adversas, como falta de luz o disponibilidad de nutrientes. Las bajas temperaturas presentes en el territorio antártico sumada la escasez de nutrientes, son factores que favorecen la esporulación como ciclo de vida en las levaduras en esta región. Es probable entonces que organismos que crecen óptimamente a temperaturas mesófilas (20 – 30 °C) sean capaces de resistir las bajas temperaturas presentes en el territorio antártico (psicrófilos facultativos), manteniendo un ciclo de vida de esporulación. Debido a la metodología utilizada, el aislamiento de este tipo de levaduras fue favorecido siendo éstas las más representativas. Por otro lado, las muestras ambientales fueron crecidas en medio completo o rico, favoreciendo a levaduras capaces de crecer a temperaturas más altas (psicrófilos facultativos) ya que éstas poseen un metabolismo más rápido, desplazando a otras levaduras que poseen un metabolismo más lento, apto para sobrevivir en escasez de nutrientes.

Además, se encontraron levaduras que sólo fueron capaces de crecer a temperaturas bajo 22 °C y otras sólo a 4 °C, las que en conjunto comprenden un 16 %. La importancia de encontrar levaduras con estas características radica en las adaptaciones que presentan para sobrevivir y crecer a bajas temperaturas, siendo más

interesante aún si sólo son capaces de crecer a un máximo de 4 °C, ya que podrían ser de gran importancia biotecnológica.

La levadura T27_6_4C creció sólo a 22 °C, esto posiblemente se debe a que el tiempo de incubación a temperaturas bajo 22 °C no fue suficiente para que esta levadura pudiera desarrollarse. Esto sugiere que las temperaturas 4, 10 y 15 °C son muy restrictivas para ésta levadura, por lo que necesitaría un mayor tiempo para su crecimiento.

6.4 Caracterización bioquímica e identificación tentativa de los aislados.

La caracterización bioquímica e identificación tentativa fue realizada de acuerdo a la capacidad de las levaduras para asimilar distintas fuentes de carbono. Los reportes existentes sólo informan la escasez de nutrientes que presenta la región Antártica en general, la que posee algunos de los niveles más bajos de fuentes de carbono en la tierra (Barrett y cols., 2006)(Burkins y cols., 2000), pero existe poca información acerca de los nutrientes existentes en la región llamada Antártica marítima. La investigación de las fuentes de carbono presentes en suelo y agua han sido principalmente estudiadas en zonas de clima altamente extremo presente en la zona sur de la Antártica, como es South Victoria Land, McMundo dry valleys y Taylor valley (Connell y cols., 2008)(Barrett y cols., 2006)(Burkins y cols., 2000). Las muestras estudiadas en este trabajo fueron obtenidas desde la zona norte de la Antártica, donde el clima es menos extremo en comparación con las regiones mencionadas anteriormente. Existe escasa información

acerca de la composición orgánica del suelo antártico, menos aún de la zona norte de éste. Es por esto que estudiar las fuentes de carbono en las cuáles las levaduras son capaces de crecer brinda una importante información acerca de la posible composición orgánica de la muestra.

Las levaduras aisladas desde muestras de agua presentan un mayor crecimiento en los compuestos metil-ad-glucopiranosida, glicerol, eritritol y D-sorbitol, sugiriendo que estas levaduras asimilan de mejor forma alcoholes o polialcoholes como fuente de carbono. Esto es similar a lo observado con levaduras aisladas desde las zonas Lions Rump y Bahía Almirantazgo. El glicerol está presente en todos los aceites y grasas animales y vegetales vinculados a los ácidos grasos para formar una molécula de triglicéridos. Se sugiere que el glicerol podría ser obtenido principalmente de los aceites y grasas de la piel de los pingüinos, focas y elefantes marinos presentes en esta región (Walton, 1984)(Tin y cols., 2009). De acuerdo con nuestros resultados (tabla 6), las levaduras aisladas de estas zonas producen lipasas extracelulares, las que permitirían la degradación de lípidos para obtener glicerol. Por otro lado, en la familia de los tetraalcoholes, sólo el eritritol se encuentra presente en la naturaleza, en algas, hongos y formando ésteres en los líquenes (Beyer, 1987). La flora presente en la Antártica se caracteriza por la presencia de hongos, líquenes, musgos y algas, y en el mar que circunda el Antártico existe una gran diversidad de algas marinas. En consecuencia, es probable que las levaduras asimilen el eritritol al estar en contacto con este, por lo que se observaría un mayor crecimiento sobre esta fuente de carbono. La levadura H14_1_4C, aislada desde el interior de Bahía Fildes presentó un mayor crecimiento en D-sorbitol. El

sorbitol se encuentra en cantidades apreciables en las algas rojas y según estudios anteriores se han encontrado distintas especies de algas rojas en el territorio Antártico (Eggert, 2000). Es probable que esta zona presente algas rojas, las que proveerían a la levadura sorbitol, explicando así la preferencia de esta levadura por este compuesto orgánico.

A diferencia de levaduras aisladas desde muestras de agua, en levaduras obtenidas desde muestras de suelo, sólo los aislados T11_1_15C, T13_7_10C y T30_2_4C (12,5 %) presentaron preferencia por alguna fuente de carbono (D-glucosa y D-sorbitol).

Finalmente, los compuestos orgánicos D-glucosa, D-sorbitol y glicerol son utilizados por un alto número de levaduras, a diferencia de metil-ad-glucopiranosida y eritritol, que se encuentran entre los compuestos menos utilizados por las levaduras.

Al caracterizar cada levadura según su habilidad para asimilar distintas fuentes de carbono se obtuvo un perfil bioquímico, el cual se transforma en un bionúmero característico, logrando discernir de mejor manera si los distintos aislados pertenecen o no a la misma especie. Se sugiere que las levaduras que presentan el mismo bionúmero (asimilan las mismas fuentes de carbono) pertenecen a la misma especie; y en otros casos, cuando el bionúmero es diferente (asimilan distintas fuentes de carbono), se sugiere que son levaduras que pertenecen a especies distintas. Esta nueva clasificación ayudó a agrupar de mejor manera los aislados obtenidos, ya que en conjunto con la

caracterización macromorfológica, se determinó de mejor manera la diversidad presente en las muestras analizadas.

La galería Api ID 32C está diseñada para identificar asilados clínicos de levaduras, mediante la comparación del bionúmero obtenido con la base de datos del programa *apiweb*TM (Ramani y cols., 1998). Es por esto que el bionúmero obtenido para cada levadura no sólo permitió comparar y agrupar las levaduras en base a este nuevo parámetro, sino que también permitió realizar una identificación a la que llamamos “tentativa” debido a que el perfil obtenido no siempre indicó una “excelente identificación”, sino que también se encontraron perfiles con “baja discriminación”. En base a esto, las levaduras identificadas pertenecen a 5 géneros (tabla 5): *Rhodotorula*, *Sporobolomyces*, *Cryptococcus*, *Zygosaccharomyces* y *Candida*. Este es un resultado esperable ya que en estudios anteriores se han aislado mayoritariamente levaduras pertenecientes a los géneros, *Rhodotorula*, *Candida* y *Cryptococcus* (Di Menna, 1960); *Sporobolomyces*, *Cryptococcus*, *Candida* y *Rhodotorula* (Pavlova y cols., 2001). La identificación tentativa realizada en este trabajo fue comparada con la identificación molecular realizada a estos mismos aislados en nuestro laboratorio (Carrasco, 2011). El 61 % de los aislados lograron ser identificados utilizando la galería api ID 32C. De éstos, en el 76 % de las levaduras la identificación molecular se correlacionó a nivel de género con la identificación bioquímica. En el 65 % de los casos, ambas metodologías coincidieron a nivel de especie. Esto muestra lo útil que es ésta metodología para realizar una identificación preliminar de levaduras provenientes de muestras ambientales, ya que es un método sencillo y de fácil interpretación.

El 39 % de las levaduras analizadas utilizando esta metodología no se lograron identificar, presentando un “perfil inaceptable”. Esto se debe a que la base de datos del programa *apiweb*TM sólo contiene los perfiles bioquímicos de 63 especies clínicas diferentes, existiendo la posibilidad de que distintos bionúmeros no coincidan con ningún otro bionúmero de la base de datos del programa.

Por otro lado, un estudio anterior ha evaluado la eficacia de esta galería en la identificación de aislados clínicos y no siempre ha sido posible identificar correctamente las levaduras (Ramani y cols., 1998). Se propone realizar otros ensayos, por ejemplo analizar la habilidad de las levaduras para utilizar azúcares anaeróticamente (fermentación), asimilación de fuentes de carbono no utilizadas en este trabajo y la utilización de compuestos nitrogenados en crecimiento aeróbico, para así lograr identificar un mayor número de aislados y con mayor eficacia.

En la actualidad, la identificación de levaduras se realiza principalmente mediante técnicas moleculares. Según lo descrito por Carrasco M. (2011) las levaduras T11_1_15C, T17_2_22C y T27_6_4C pudieron ser identificadas sólo a nivel de phylum, perteneciendo al Ascomycota, sin embargo según los resultados obtenidos en este trabajo, los bionúmeros correspondientes a las levaduras T11_1_15C, T17_2_22C y T27_6_4C son 5573 7443 11, 5552 7661 07 y 1553 7621 03 respectivamente. Las diferencias en estos bionúmeros indica que estas levaduras metabolizan distintas fuentes de carbono lo que sugiere que son distintas. Esto muestra que la identificación molecular

no siempre logra diferenciar correctamente levaduras, demostrando la importancia de la caracterización bioquímica.

6.5 Actividades enzimáticas extracelulares.

El aislamiento de levaduras del territorio antártico chileno, no sólo se realizó con la finalidad de conocer que especies de levaduras habitan esta región, sino que también, analizar el potencial biotecnológico que presentan estas levaduras, dadas sus características únicas que les permiten sobrevivir en esta fría región.

6.5.1 Actividad lipasa

Un 72 % de las levaduras aisladas presentó actividad lipasa (tabla 6), aunque sólo se encontró en ensayos realizados a 22 °C. Esto se corresponde con los resultados obtenidos por M. Fenice y cols. (1997) donde se ensayó actividad lipasa a 25 °C, y ésta estuvo presente en casi todas las cepas de estudio. Dentro de las levaduras que presentaron actividad lipasa la mayor actividad se observó en las levaduras H1_10C, H5_1_10C que pertenecen a las especies *Candida pelliculosa* (*Wickerhamomyces anomalus*), T8_1_22C, T27_7_4C pertenecientes a la especie *Rhodotorula minuta* (*Rhodotorula laryngis*) (tabla 5) y las levaduras T18_1_22C y T13_2_22C que según lo descrito por Carrasco (2011) pertenecen a la especie *Cryptococcus victoriae* y una especie no identificada dentro del género *Rhodoturula* respectivamente. No se encontraron antecedentes previos que indiquen que estas levaduras aisladas desde el territorio antártico presenten actividad lipasa, sólo se ha reportado para las levaduras *Pseudozyma antarctica* (*Candida antártica*) (Shivaji & Prasad, 2009) y

Leucosporidium antarcticum (Turkiewicz y cols., 2003). En estudios anteriores, levaduras del género *Cryptococcus* y *Rhodotorula* aisladas desde muestras glaciales y subglaciales del noreste de la Patagonia Argentina han presentado actividad lipasa a 20 °C (Brizzio y cols., 2007), lo cual concuerda con los resultados obtenidos en este trabajo. En el trabajo realizado por Brizzio y cols. (2007) la levadura *Rhodotorula laryngis* no presentó actividad lipasa a 20 °C, a diferencia del resultado encontrado en este trabajo donde sí presentó actividad (T8_1_22C, T27_7_4C). En el caso de la levadura *Wickerhamomyces anomalus*, se ha encontrado la presencia de actividad lipasa a 25 °C en aislados obtenidos desde la selva tropical brasileña (Buzzini y Martini, 2002), lo que corresponde con los resultados obtenidos (H1_10C, H5_1_10C).

6.5.2 Actividad esterasa.

Un 64 % de las levaduras ensayadas presentó actividad esterasa (tabla 6), encontrándose actividad a 4, 15 y 22 °C. Las levaduras T8_1_22C *Rhodotorula minuta* (*Rhodotorula laryngis*) (tabla 5) y T18_1_22C *Cryptococcus victoriae* (Carrasco, 2011) fueron las que presentaron mayor actividad a 22 °C. Este resultado es esperable puesto que se han aislado levaduras pertenecientes a estos géneros desde ambientes fríos (Brizzio y cols., 2007) y desde ambientes tropicales (Buzzini y cols., 2002) que presentan actividad esterasa. No se encontraron antecedentes que indiquen que levaduras aisladas desde el territorio Antártico presenten actividad esterasa. La levadura T11_1_15C perteneciente al phylum Ascomycota (Carrasco, 2011) presentó la mayor actividad enzimática a 15 °C. Las levaduras T19_1_4C y T9_3_4C identificadas como

Mrakia psychrophilia y *Levadura* sp. (Carrasco, 2011) presentaron la mayor actividad esterasa a 4 °C. Se han reportado levaduras pertenecientes al género *Mrakia* en los glaciares Alpinos italianos (Turchetti y Cols., 2007) y en aguas glaciales y subglaciales en la Patagonia Argentina (Brizzio y Cols., 2007) que presentan actividad esterasa a 4 °C. No se encontraron reportes que indiquen la presencia de actividad esterasa a 4 °C en levaduras *Mrakia psychrophilia* obtenidas desde el territorio antártico.

6.5.3 Actividad proteasa.

Al igual que la actividad lipasa, la actividad proteasa se encontró solamente a 22 °C (tabla 6), en un 44 % de las levaduras analizadas. Los aislados H1_10C y H5_1_10C pertenecientes a la especie *Candida pelliculosa* (*Wickerhamomyces anomalus*) (tabla 5), presentaron la mayor actividad. La levadura T11_1_10C presentó también una alta actividad. Esta levadura no logró ser identificada molecularmente (Carrasco, 2011). En base a su perfil bioquímico esta levadura podría pertenecer al género *Cryptococcus*. En estudios anteriores se han reportado levaduras aisladas desde el territorio antártico que presentan actividad proteasa; éstas son *Cryptococcus friedmannii* (Vishniac, 1985), *Leucosporidium antarcticum* (Turkiewicz y cols., 2003) y *Candida humicola* (Ray y cols., 1992). Se ha reportado que la levadura *Wickerhamomyces anomalus* aislada desde la selva tropical brasileña presenta actividad proteasa a 25 °C (Buzzini y Martini, 2002), pero no se encontraron antecedentes que indiquen que esta levadura aislada desde el territorio antártico presente actividad proteasa.

6.5.4 Actividad amilasa.

Un 32 % de las levaduras presentaron actividad amilasa (tabla 6), encontrándose esta actividad a 4, 15 y 22 °C. Las mayores actividades fueron encontradas a 22 °C en las levaduras T11_2_10C, T15_22C y T17_1_10C pertenecientes a las especies *Dioszegia* sp, *Cryptococcus terricola* y *Cryptococcus gilvescens* según lo descrito en Carrasco (2011). En estudios anteriores se ha reportado que la levadura *Candida antarctica* aislada desde el territorio antártico presenta actividad amilasa (De Mot y Verachtert, 1987). Además, se han encontrado levaduras pertenecientes al género *Cryptococcus* en aguas glaciales y subglaciales de la Patagonia Argentina que presentan actividad amilasa (Brizzio y cols., 2007), y también se han obtenido estas desde los glaciares Alpinos italianos (Turchetti y cols., 2007), pero no se han reportado levaduras perteneciente al genero *Cryptococcus* en el territorio Antártico que presenten actividad amilasa.

6.5.5 Actividad celulasa.

Un 36 % de las levaduras presentaron actividad celulasa (tabla 6). Esta se encontró a 4, 15 y 22 °C. La mayor actividad fue observada a 4 °C, en las levaduras T19_1_4C y T26_2_4C pertenecientes a la especie *Mrakia psychrophilia* (Carrasco, 2011). La levadura T18_1_10C de la especie *Mrakia blollopsis* presentó una alta actividad a 15 °C. Las levaduras que presentaron actividad celulasa a 22 °C mostraron menor actividad, estas fueron T11_2_10C, T17_2_22C y T18_1_22C las que pertenecen al género *Dioszegia*., al phylum Ascomicota y a la especie *Cryptococcus victoriae* (Carrasco, 2011). Existe muy poca información acerca de levaduras aisladas desde el

territorio Antártico que presenten actividad celulasa. Los resultados obtenidos por Krishnan y cols. (2011) muestran que la levadura *Mrakia frígida* obtenida desde la Península Fildes, Isla Rey Jorge, presentó actividad celulasa a 4 °C, lo que se corresponde con lo obtenido en este trabajo. En estudios anteriores donde se ha ensayado actividad celulasa en levaduras obtenidas desde ambientes fríos, esta actividad no ha sido detectada. En el trabajo reportado por Brizzio y cols. (2007) levaduras pertenecientes a los géneros *Cryptococcus* y *Dioszegia* no presentaron actividad celulasa a 20 °C. Así mismo, en el trabajo realizado por Buzzini y cols. (2005) levaduras aisladas desde glaciares de los Alpes italianos no presentaron actividad celulasa.

En el trabajo realizado por Brizzio y colaboradores (Brizzio y cols., 2007) se concluye que las levaduras podrían no estar involucradas directamente en la descomposición de celulosa en ambientes fríos. Según los resultados obtenidos en este trabajo, esta hipótesis no sería correcta ya que se obtuvieron levaduras que presentan actividad celulasa en el territorio antártico. Estas levaduras jugarían un rol importante en la degradación de macromoléculas insolubles como es la celulosa, obteniendo productos que podrían ser absorbidos por la misma célula (Oh y cols., 2000)(Gibb, 1988) o dejándolos disponibles para otros microorganismos de la cadena alimenticia (Krishnan, 2011). Por otro lado, en el trabajo realizado por Buzzini y Martini (2002) se aislaron levaduras desde la selva tropical brasileña pertenecientes al género *Cryptococcus* y a la especie *Wickerhamomyces anomalus* las que tampoco presentaron actividad celulasa. Esto indicaría que las levaduras *Candida pelliculosa* (*Wickerhamomyces anomalus*)

obtenidas en este trabajo son diferentes a las estudiadas en Buzzini y Martini (2002), ya que las analizadas en esta memoria presentaron actividad celular.

7. CONCLUSIONES

- Se lograron obtener levaduras psicrófilas cultivables desde la Isla Rey Jorge, donde predominan las levaduras psicrófilas facultativas por sobre otras levaduras psicrófilas.
- La asimilación de distintas fuentes de carbono logra identificar correctamente a nivel de género y en menor medida a nivel de especie levaduras presentes en muestras ambientales.
- Se encontraron levaduras que presentan actividades enzimáticas extracelulares con potencial aplicación biotecnológica que no han sido reportadas en levaduras que habitan el territorio antártico ni en ambientes fríos. Se observó la presencia de actividad enzimática extracelular en algunas especies de levadura de las que no se tiene antecedentes previos.

8. PROYECCIONES

Existen muy pocos trabajos que reportan la biodiversidad de levaduras existente en el territorio Antártico. La Antártica presenta condiciones climáticas que dificultan el desarrollo de distintos microorganismos, por lo que las adaptaciones que estos presentan para sobrevivir en esta región son de gran importancia biotecnológica.

En este trabajo se encontraron levaduras que presentaron distintas actividades enzimáticas extracelulares utilizadas a nivel industrial, por lo que se propone analizar el extracto de proteínas extracelulares para determinar su actividad y estabilidad, y así evaluar su posible producción a gran escala.

La Antártica presenta una alta radiación UV, por lo que las levaduras que habitan esta región deberían producir compuestos fotoprotectores para poder prevenir el daño causado por la radiación. Entre los compuestos fotoprotectores se encuentran los carotenoides y las micosporinas. En este trabajo, se aislaron levaduras que presentaban coloración, por lo que sería interesante identificar y cuantificar los pigmentos y micosporinas que estas producen, ya que son compuestos de importancia biotecnológica.

CONGRESOS

Juan Manuel Rozas*, Salvador Barahona, Mario Carrasco, Víctor Cifuentes, Marcelo Baeza. 2010. Aislamiento y caracterización bioquímica de levaduras Antárticas. LIII Congreso Chileno de Biología, Santa Cruz, Chile.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Ankin, L., y Anagnostakis, S., 1975.** The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. *Mycologia*. **67**: 597-607.
- Arnold, R., Convey, P., Hughes, K., Wynn-Williams, D., 2003.** Seasonal periodicity of physical and edaphic factors, and microalgae in Antarctic fellfields. *Polar Biol.* **26**: 396-403.
- Arpigny, J. y Lamotte, J., 1997.** Molecular adaptation to cold of an Antarctic bacterial lipase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. **3**: 29-35.
- Atlas, R., y Parks, L., 1993.** Handbook of microbiological media. CRC Press, London.
- Baeza, M., Retamales P., Sepúlveda D., Lodato P., Jiménez A., y Cifuentes V., 2009.** Isolation, characterization and long term preservation of mutant strains of *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Journal of Basic Microbiology*. **49**: 135-141.
- Barnett, J., Payne, R., Yarrow, D., y Barnett, L., 2000.** Yeasts: Characteristics and Identification. Cambridge University Press.
- Barrett, J., Virginia, R. y Parsons, A., Wall, D., 2006.** Soil carbon turnover in the McMurdo dry valleys, Antarctica. *Soil Biology and Biochemistry*. **38**: 3065-3082.
- Beyer, H., Walter W., 1987.** Manual de química orgánica. 19ª Edición. Editorial Reverté, S. A. Barcelona.
- Bokhorst, S., Huiskes, A., Convey, P., y Aerts, R., 2007.** Climate change effects on organic matter decomposition rates in ecosystems from the Maritime Antarctic and Falkland Islands. *Global Change Biology*. **13**: 2642-2653.
- Brenchley, J., 1996.** Psychrophilic microorganisms and their cold-active enzymes. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. **17**: 432-437.
- Bridge, P., Spooner, B., y Roberts, P., 2008.** Non-lichenized fungi from the Antarctic region. *Mycotaxon*. **106**: 485-490.
- Brizzio, S., Benedetta, T., de García, V., Libkind, D., Buzzini, P., 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.
- Burkins, M., Virginia, R., Chamberlain, C., y Wall, D., 2000.** Origin and distribution of soil organic matter in Taylor Valley, Antarctica. *Ecology*. **81**: 2377-2391.
- 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.**, 2011. Aislamiento e identificación molecular de levaduras del territorio Antártico chileno. Memoria de Título. Facultad de Ciencias. Universidad de Chile.
- Cavicchioli, R., Siddiqui, K., Andrews, D., y Sowers, K.**, 2002. Low-temperature extremophiles and their applications. *Current Opinion in Biotechnology*. **13**: 253-261.
- Connell, L., Redman, R., Craig, S., Scorzetti, G., Iszard, M., y Rodriguez, R.**, 2008. Diversity of Soil Yeasts Isolated from South Victoria Land, Antarctica. *Microbial Ecology*. **56**: 448-459.
- Connell, L., Redman, R., Rodriguez, R., Barrett, A., Iszard, M., y Fonseca A.**, 2010. *Dioszegia antarctica* sp. nov. and *Dioszegia cryoxerica* sp. nov., psychrophilic basidiomycetous yeasts from polar desert soils in Antarctica. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. **60**: 1466-1472.
- D'Amico, S., Marx, J., Gerday, C., y Feller, G.**, 2003. Activity-Stability Relationships in Extremophilic Enzymes. *Journal of Biological Chemistry*. **278**: 7891-7896.
- D'Amico, S., Collins, T., Marx, J., Feller, G., y Gerday, C.**, 2006. Psychrophilic microorganisms: challenges for life. *EMBO reports*. **7**: 385-389.
- Davet, P., y Rouxel, F.**, 1997. Detecting and isolating soil fungi. *Détection et isolement des champignons du sol*. Editions Quae.
- Davey, M., Pickup, J., y Block, W.**, 1992. Temperature variation and its biological significance in fellfield habitats on a maritime Antarctic island. *Antarctic Science*. **4**: 383-388.
- De García, V., Brizzio, S., Libkind, D., Buzzini, P., y van Broock, M.**, 2007. Biodiversity of cold-adapted yeasts from glacial meltwater rivers in Patagonia, Argentina. *FEMS Microbiology Ecology*. **59**: 331-341.
- De Mot, R., y Verachtert, H.**, 1987. Purification and characterization of extracellular alpha-amylase and glucoamylase from the yeast *Candida antarctica* CBS 6678. *European journal of biochemistry / FEBS*. **164**: 643-654.
- Deegenaars, M., y Watson, K.**, 1998. Heat shock response in psychrophilic and psychrotrophic yeast from Antarctica. *Extremophiles*. **2**: 41-50.
- Deegenaars, M., y Watson, K.**, 1997. Stress proteins and stress tolerance in an Antarctic, psychrophilic yeast, *Candida psychrophila*. *FEMS Microbiology Letters*. **151**: 191-196.
- Di Menna, M.**, 1960. Yeasts from Antarctica. *J. gen. Microbiol.* **23**: 295-300.

- Eggert, A., y Wiencke, C., 2000.** Adaptation and acclimation of growth and photosynthesis of five Antarctic red algae to low temperatures. *Polar Biology*. **23**: 609-618.
- Feller, G., y Gerday, C., 2003.** Psychrophilic enzymes: hot topics in cold adaptation. *Nature Reviews Microbiology*. **1**: 200-208.
- Georgette, D., Blaise, V., Collins, T., D'Amico, S., Gratia, E., Hoyoux, A., Marx, JC., Sonan, G., Feller, G., y Gerday, C., 2004.** Some like it cold: biocatalysis at low temperatures. *FEMS microbiology reviews*. **28**: 25-42.
- Gibb, G., y Strohl, W., 1988.** Physiological regulation of protease activity in *Streptomyces peucetius*. *Canadian Journal of Microbiology*. **34**: 187-190.
- Goodchild, A., Saunders, N., Ertan1, H., Raftery, M., Guilhaus, M., Curmi, P., y Cavicchioli1, R., 2004.** A proteomic determination of cold adaptation in the Antarctic archaeon, *Methanococcoides burtonii*. *Molecular microbiology*. **53**: 309-321.
- Johns, G., y Somero, G., 2004.** Evolutionary convergence in adaptation of proteins to temperature: A4-lactate dehydrogenases of Pacific damselfishes (*Chromis* spp.). *Molecular biology and evolution*. **21**: 314-320.
- Krishnan, A., Alias, S., Wong, C., Pang, K. y Convey, P., 2011.** Extracellular hydrolase enzyme production by soil fungi from King George Island, Antarctica. *Polar Biology*.
- Libkind, D., Pérez, P., Sommaruga, R., Diéguez, M., Ferraro, M., Brizzio, S., Zagarese, H., y van Broock, M., 2004.** Constitutive and UV-inducible synthesis of photoprotective compounds (carotenoids and mycosporines) by freshwater yeasts. *Photochemical & photobiological sciences: Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology*. **3**: 281-286.
- Marangon, A., Bertoni, T., Kioshima, E., Falleiros De Pádua, R., Venturini, S., y Svidzinski, T., 2003.** Dehydrated gelatin drops: a good method for fungi maintenance and preservation. *The new microbiologica*. **26**: 305-309.
- Margesin, R., Neuner, G., Storey, K., 2007.** Cold-loving microbes, plants, and animals- fundamental and applied aspects. *Natur- wissenschaften*. **94**: 77-99
- Morita, R., 1975.** Psychrophilic bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. **39**: 144-167.
- Morita, Y., Nakamura, T., Hasan, Q., Murakami, Y., Yokoyama, K., y Tamiya, E., 1997.** Cold-active enzymes from cold-adapted bacteria. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. **74**: 441-444.

- Nakagawa, T., Nagaoka, T., Taniguchi, S., Miyaji, T., y Tomizuka, N.,**2004. Isolation and characterization of psychrophilic yeasts producing cold-adapted pectinolytic enzymes. *Letters in Applied Microbiology*. **38**: 83-387.
- Oh, Y., Shih, I., Tzeng, Y., y Wang, S.,** 2000. Protease produced by *Pseudomonas aeruginosa* K-187 and its application in the deproteinization of shrimp and crab shell wastes. *Enzyme and Microbial Technology*.**27**: 3-10.
- Pavlova, K., Grigorovaa, D., Hristozovaa, T., y Angelovb, A.,** 2001. Yeast strains from Livingston Island, Antarctica. *Folia microbiologica*. **46**: 397-401.
- Rashidah, A., Sabrina, S., Ainihayati, A., Shanmugapriya, P., Nazalan, N., y Razip, S.,** 2007. Psychrophilic Enzymes From The Antartic Isolates. Project Report. USM.
- Ramani, R., Gromadzki, S., Pincus, D., Salkin, I., y Chaturvedi, V.,**1998. Efficacy of API 20C and ID 32C systems for identification of common and rare clinical yeast isolates. *Journal of Clinical Microbiology*. **36**: 3396-3398.
- Ramesh, C., y Gulati, A.,** 2011. Cellulases from psychrophilic microorganisms: a review. *Journal of Basic Microbiology*. **51**: 1-8.
- Ratkowsky, D., Olley, J., y Ross, T.,** 2005. Unifying temperature effects on the growth rate of bacteria and the stability of globular proteins. *Journal of Theoretical Biology*. **233**: 351-362.
- Ray, M., Uma Devi, K., Seshu Kumar, G., y Shivaji, S.,**1992. Extracellular protease from the antarctic yeast *Candida humicola*. *Applied and Environmental Microbiology*. **58**: 1918-1923.
- Russell, N.,** 2006. Antarctic micro-organisms: coming in from the cold. *Culture Imperial College London*. **27**: 1-8.
- Russell, N.,** 2000. Toward a molecular understanding of cold activity of enzymes from psychrophiles. *Extremophiles*. **4**: 83-90.
- Shivaji, S., y Prasad, G.,** 2009. Yeast Biotechnology: Diversity and Applications. Satyanarayana, T., y Kunze, G., (eds.). Springer, Netherlands.
- Shivaji, S., ShyamalaRao, N., Saisree, L., Sheth, V., Reddy, G., y Bhargava, P.,**1989. Isolation and identification of *Pseudomonas* spp. from Schirmacher Oasis, Antarctica. *Applied and Environmental Microbiology*. **55**: 767-770.
- Shivaji, S., Bhadra, B., Sreenivas Rao, R., y Pradhan, S.,**2008. *Rhodotorula himalayensis* sp. nov., a novel psychrophilic yeast isolated from Roopkund Lake of the Himalayan mountain ranges, India. *Extremophiles*. **12**: 375-81.

- Slifkin, M.**, 2000. Tween 80 opacity test responses of various *Candida* species. *Journal of Clinical Microbiology*. **38**: 4626-4628.
- Strauss, M., Jolly, N., Lambrechts, M., y Van Rensburg, P.**, 2001. Screening for the production of extracellular hydrolytic enzymes by non-*Saccharomyces* wine yeasts. *Journal of Applied Microbiology*. **91**: 182-190.
- Teather, R., y Wood, P.**, 1982. Use of Congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. *Applied and Environmental Microbiology*. **43**: 777-780.
- Tin, T., Fleming, Z., Hughes, K., Ainley, D., Convey, P., Moreno, C., Pfeiffer, S., Scott, J., y Snape, I.**, 2009. Impacts of local human activities on the Antarctic environment: a review. *Antarctic Sci*. **21**: 3-33.
- Turchetti, B., Buzzini, P., Goretti, M., Branda, E., Diolaiuti, G., D'Agata, C., Smiraglia, C., y Vaughan-Martini, A.**, 2007. Psychrophilic yeasts in glacial environments of Alpine glaciers. *FEMS Microbiology Ecology*. **63**: 73-83.
- Turkiewicz, M., Pazgier, M., Kalinowska, H., y Bielecki, S.**, 2003. A cold-adapted extracellular serine proteinase of the yeast *Leucosporidium antarcticum*. *Extremophiles*. **7**: 435-442.
- Varma, A., y Oelmüller, R.**, (Eds). 2007. Advanced techniques in soil microbiology. Springer.
- Vishniac, H.**, 1996. Biodiversity of yeasts and filamentous microfungi in terrestrial Antarctic ecosystems. *Biodiversity and Conservation*. **5**: 1365-1378.
- Vishniac, H.**, 1986. Yeasts in the Antarctic deserts. *Perspectives in Microbial Ecology*.
- Vishniac, H.**, 1985. *Cryptococcus friedmannii*, a new species of yeast from the Antarctic. *Mycologia*. **77**: 149-153.
- Walton D.**, 1984. The terrestrial environment. In: Laws RM (Ed). Antarctic ecology. Academic Press, London.
- Xin, M., y Zhou, P.**, 2007. *Mrakia psychrophila* sp. nov., a new species isolated from Antarctic soil. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B*. **8**: 260-265.
- Yarrow, D.**, 1998. Methods for isolation, maintenance and identification of yeasts. In: The Yeasts, a Taxonomic Study. 4rd ed., EnC.P. Kurtzman y J.W. Fell (Eds). Elsevier Science, Amsterdam.

10. ANEXOS

Tabla 7: Asimilación de distintas fuentes de carbono.

		Aislados									
		T33_1_22C		T1_3_22C		T1_6_10C		T27_7_4C		T11_2_10C	
Temperatura óptima de crecimiento		22°C		22°C		22°C		22°C		22°C	
Período de incubación (días)		2	3	2	3	2	3	2	3	2	3
Tests	GAL	-	-	-	-	-	-	-	+/-	++	++
	ACT	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	SAC	++	++	++	++	++	++	+	++	++	++
	NAG	-	+	-	-	-	-	-	++	++	++
	LAT	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
	ARA	-	-	-	-	-	-	+/-	++	++	++
	CEL	-	-	-	-	-	-	-	-	++	++
	RAF	++	++	++	++	++	++	-	-	++	++
	MAL	+	++	-	-	-	-	-	-	++	++
	TRE	-	+	+	++	+	++	+	++	++	++
	2KG	+	++	-	-	-	-	+	++	++	++
	MDG	-	+/-	-	-	-	-	-	-	-	-
	MAN	++	++	++	++	++	++	+	++	++	++
	LAC	-	-	-	-	-	-	-	-	++	++
	INO	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	SOR	++	++	+	++	+	++	+/-	+	++	++
	XYL	-	+	-	+/-	-	+/-	+/-	++	++	++
	RIB	-	+/-	-	-	-	-	-	-	+	+
	GLY	-	+	+/-	+/-	+/-	+/-	+	++	++	++
	RHA	-	-	-	-	-	-	-	-	++	++
	PLE	+/-	++	-	-	-	-	-	-	++	++
	ERY	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	MEL	-	-	-	-	-	-	-	-	++	++
	GRT	-	+	-	-	-	-	+	++	++	++
	MLZ	++	++	-	-	-	-	+	++	++	++
	GNT	-	+/-	+/-	+	+/-	+	+	++	+	+
	LVT	-	-	-	-	-	-	-	-	+/-	+/-
	GLU	++	++	++	++	++	++	+	++	++	++
	SBE	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
GLN	-	+/-	-	-	-	-	-	-	++	++	
ESC	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	

Tests

	Aislados									
	T27_6_4C		T18_1_22C		T13_2_22C		T17_2_22C		T31_5_4C	
	22°C		22°C		22°C		22°C		22°C	
	Período de incubación (días)		Período de incubación (días)		Período de incubación (días)		Período de incubación (días)		Período de incubación (días)	
	2	3	2	3	2	3	2	3	2	3
GAL	++	++	++	++	-	-	++	++	+/-	+/-
ACT	-	-	++	++	-	-	-	-	-	-
SAC	-	-	++	++	++	++	++	++	++	++
NAG	++	++	++	++	++	++	++	++	-	-
LAT	+/-	+/-	+/-	+/-	+	+	+/-	+/-	-	-
ARA	++	++	++	++	++	++	+	++	-	-
CEL	++	++	++	++	-	-	+	++	-	-
RAF	-	-	++	++	-	-	-	-	++	++
MAL	++	++	++	++	-	-	++	++	-	-
TRE	++	++	++	++	+	+	-	-	++	++
2KG	++	++	++	++	++	++	+	++	-	-
MDG	-	+/-	+	+	-	-	-	-	-	-
MAN	-	+/-	++	++	++	++	-	-	++	++
LAC	-	-	++	++	-	-	-	-	-	-
INO	-	-	++	++	-	-	-	-	-	-
0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SOR	++	++	++	++	+	+	-	+	++	++
XYL	++	++	++	++	++	++	++	++	+/-	+/-
RIB	++	++	++	++	-	-	++	++	-	-
GLY	-	-	+/-	+/-	++	++	-	-	+/-	+/-
RHA	+	++	++	++	-	-	+/-	++	-	-
PLE	++	++	++	++	-	-	+/-	++	-	-
ERY	-	-	++	++	-	-	-	-	-	-
MEL	+	++	++	++	-	-	+	++	-	-
GRT	+/-	+/-	++	++	++	++	+/-	++	-	-
MLZ	++	++	++	++	++	++	+	++	-	-
GNT	-	-	++	++	++	++	-	-	+	+
LVT	-	+/-	-	-	+	+	-	-	-	-
GLU	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
SBE	++	++	-	-	-	-	++	++	-	-
GLN	+/-	+/-	+	+	-	-	-	+	-	-
ESC	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-

Tests

Aislados										
	H1_1_10C		H1_10C		H5_1_10C		H14_1_4C		T34_2_10C	
Temperatura óptima de crecimiento	22°C		22°C		22°C		22°C		22°C	
Período de incubación (días)	2	3	2	3	2	3	2	3	2	3
GAL	-	-	-	-	-	-	++	++	-	-
ACT	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SAC	+	+	+	+	+	+	+	+	++	++
NAG	-	-	-	-	-	-	++	++	-	-
LAT	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
ARA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CEL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RAF	++	++	++	++	++	++	+/-	+/-	++	++
MAL	++	++	++	++	++	++	+	+	-	-
TRE	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	++	++	++	++
2KG	-	-	-	-	-	-	++	++	-	-
MDG	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	-	-
MAN	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
LAC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
INO	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SOR	+	+	+	+	+	+	+++	+++	++	++
XYL	+	+	+	+	+	+	++	++	+/-	+/-
RIB	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GLY	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+/-	+/-	+/-	+/-
RHA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PLE	++	++	++	++	++	++	+	+	-	-
ERY	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-
MEL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GRT	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MLZ	++	++	++	++	++	++	+	+	-	-
GNT	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+	+
LVT	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	-	-
GLU	+	+	+	+	++	++	++	++	++	++
SBE	-	-	-	-	-	-	++	++	-	-
GLN	-	-	-	-	-	-	++	++	-	-
ESC	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-

		Aislados									
		T8_1_22C		T15_22C		T17_1_10C		T11_1_15C		T11_1_10C	
Temperatura óptima de crecimiento		22°C		22°C		22°C		15°C		22°C	
Período de incubación (días)		2	3	2	3	2	3	3	4	2	3
Tests	GAL	-	-	p	p	p	p	++	++	++	++
	ACT	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	SAC	++	++	p	p	p	p	++	++	++	++
	NAG	+	+	p	p	-	-	++	++	++	++
	LAT	-	+/-	-	-	-	-	-	-	-	-
	ARA	++	++	-	-	p	p	++	++	++	++
	CEL	-	-	p	p	p	p	++	++	++	++
	RAF	-	-	p	p	p	p	++	++	++	++
	MAL	-	-	p	p	p	p	++	++	++	++
	TRE	++	++	-	-	-	-	+	+	++	++
	2KG	++	++	p	p	p	p	++	++	++	++
	MDG	-	-	p	p	-	-	-	-	++	++
	MAN	+	+	-	-	-	-	+	+	++	++
	LAC	-	-	-	-	-	-	-	-	++	++
	INO	-	-	p	p	p	p	-	-	++	++
	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	SOR	+	+	p	p	-	-	++	++	++	++
	XYL	+	+	p	p	p	p	++	++	++	++
	RIB	-	-	p	p	-	-	+	+	+	+
	GLY	++	++	-	-	-	-	+/-	+/-	+	+
	RHA	-	-	-	-	-	-	+/-	+/-	++	++
	PLE	-	-	p	p	-	-	++	++	++	++
	ERY	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	MEL	-	-	p	p	-	-	+/-	+/-	-	-
	GRT	++	++	p	p	p	p	++	++	+	+
	MLZ	++	++	p	p	p	p	++	++	++	++
GNT	++	++	p	p	-	-	++	++	+/-	+/-	
LVT	-	+/-	-	-	-	-	-	-	-	-	
GLU	++	++	p	p	p	p	+++	+++	++	++	
SBE	-	-	-	-	-	-	-	-	+/-	+/-	
GLN	-	-	-	-	-	-	-	-	++	++	
ESC	-	+/-	+	+	+	+	+	+	+	+	

Tests

Aislados											
		T13_7_10C		T5_3_4C		T9_3_4C		T18_1_10C		T26_2_4C	
Temperatura óptima de crecimiento		15°C		4°C		4°C		4°C		4°C	
Período de incubación (días)		3	4	7	10	7	10	7	10	7	10
GAL	-	-	++	++	-	-	+	++	++	++	
ACT	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SAC	++	++	++	++	-	-	+	++	++	++	
NAG	-	-	++	++	-	-	-	+	+	++	
LAT	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ARA	-	-	++	++	-	-	+	++	-	-	
CEL	-	-	++	++	-	-	+/-	++	++	++	
RAF	++	++	++	++	-	-	+	++	+	++	
MAL	++	++	++	++	-	-	+	++	++	++	
TRE	-	-	+	++	-	-	-	-	+	++	
2KG	++	++	++	++	-	-	+	++	++	++	
MDG	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
MAN	++	++	++	++	-	-	-	+	++	++	
LAC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
INO	-	-	+	++	-	-	-	+	+	++	
0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
SOR	+++	+++	++	++	-	-	+	++	++	++	
XYL	+	+	+/-	+	-	-	+	++	-	+/-	
RIB	+/-	+/-	-	+/-	-	-	-	+	-	-	
GLY	+	+	+/-	+	-	-	-	+	-	+/-	
RHA	-	-	+	+	-	-	-	+/-	-	-	
PLE	++	++	-	-	-	-	-	-	-	-	
ERY	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
MEL	-	-	++	++	-	-	+	++	-	+	
GRT	+/-	+/-	++	++	-	-	+	++	+/-	++	
MLZ	++	++	++	++	-	-	+	++	+	++	
GNT	+	+	++	++	-	-	+	++	+	++	
LVT	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
GLU	++	++	++	++	-	+	+	++	++	++	
SBE	+	+	++	++	-	-	+	++	+	++	
GLN	+	+	+	++	-	-	-	-	+	++	
ESC	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	

		Aislados					
		T29_4_4C		T19_1_4C		T30_2_4C	
Temperatura óptima de crecimiento		4°C		4°C		4°C	
Período de incubación (días)		7	10	7	10	7	10
Tests	GAL	+	++	++	++	+/-	-
	ACT	-	-	-	-	-	-
	SAC	++	++	++	++	-	-
	NAG	++	++	+	++	-	-
	LAT	-	-	-	-	-	-
	ARA	+	++	+	++	-	-
	CEL	++	++	++	++	-	-
	RAF	-	-	+	++	-	-
	MAL	++	++	+	++	+/-	+
	TRE	+	++	+/-	+	-	-
	2KG	+	++	++	++	+	+
	MDG	-	-	-	-	-	-
	MAN	-	+	+	++	-	-
	LAC	-	-	-	-	-	-
	INO	-	-	+	++	-	-
	0	-	-	-	-	-	-
	SOR	+/-	+	++	++	+/-	-
	XYL	++	++	+/-	+	-	-
	RIB	-	+	-	+/-	-	-
	GLY	-	-	+/-	+	+/-	+/-
	RHA	+/-	++	-	+/-	-	-
	PLE	++	++	-	-	-	-
	ERY	-	-	-	-	-	-
	MEL	-	-	+	++	-	-
	GRT	++	++	+	++	-	-
	MLZ	++	++	+	++	-	-
	GNT	++	++	++	++	-	-
LVT	-	-	-	-	-	-	
GLU	++	++	++	++	++	+++	
SBE	-	-	+	++	-	-	
GLN	-	-	+/-	+	-	-	
ESC	+	+	-	+/-	-	-	

La lectura se realizó de manera visual, observándose la presencia o ausencia de turbidez en las cúpulas. (-) representa la ausencia de crecimiento; (+/-) a (+++) menor a mayor crecimiento; (p) presencia de aglomeraciones