

Identificación y caracterización de levaduras marinas antárticas como productoras de enzimas y ácidos grasos poliinsaturados de interés biotecnológico



Licenciatura en Bioquímica

Danilo Morales

Tutora: Dra. Lyliam Loperena
Co-Tutora: Dra. Sandra Lupo

Agradecimientos

Me gustaría, en primer lugar, agradecer profundamente a mis tutoras Dra. Lyliam Loperena y Dra. Sandra Lupo. Han sido dos mentoras excepcionales y me han enseñado muchísimo. Agradezco infinitamente todo el tiempo que dedicaron para guiarme y apoyarme en este camino. Sin su ayuda, paciencia y comprensión no habría sido posible este logro personal. Mil gracias.

En segundo lugar, a mi familia. A mi abuela, Nelsa, quien fue pilar fundamental y sin su ayuda nada de esto habría sido posible. A mis padres, Silvana y Oscar; y a mis hermanos, Fede y Agus quienes han sido parte también de todos mis logros. Gracias por estar y apoyarme.

En tercer lugar a mis amigos de la vida, a mis amigos de la facultad quienes se van transformando rápidamente en amigos de la vida y a todas aquellas personas que han sido parte de mi vida durante todo este camino. Gracias por el apoyo permanente y el ánimo en las malas.

Un agradecimiento muy especial a todos los integrantes del departamento de Bioingeniería por el tiempo compartido y la ayuda brindada.

Mis mejores deseos para todos ustedes.

Índice

Introducción

1.0	Microorganismo extremófilos	Pagina 4
1.1	Características de sus proteínas	Pagina 4
1.2	Características de sus lípidos	Pagina 6
2.0	Levaduras Marinas	Pagina 8
2.1	Localización y generalidades de los géneros de levaduras a los que pertenecen las cepas aisladas en el presente trabajo	Pagina 8
3.0	Productos biotecnológicos de origen microbiano	Pagina 11
3.1	Enzimas de interés industrial	Pagina 11
3.2	Ácidos grasos poliinsaturados	Pagina 14

Objetivos	Pagina 16
------------------	-----------

Materiales y métodos	Pagina 17
-----------------------------	-----------

Resultados y discusión	Pagina 19
-------------------------------	-----------

Conclusiones	Pagina 33
---------------------	-----------

Bibliografía	Pagina 34
---------------------	-----------

Anexo I	-	Pagina 39
---------	---	-----------

Anexo II		Pagina 46
----------	--	-----------

Anexo III		Pagina 51
-----------	--	-----------

Anexo IV		Pagina 61
----------	--	-----------

Anexo V		Pagina 81
---------	--	-----------

Introducción

1. Microorganismos extremófilos

El continente antártico es un ambiente extremo que ocupa unos 14 millones de km², y si bien es uno de los lugares más hostiles para la vida ya que presenta muy bajas temperaturas, altos niveles de salinidad y altos niveles de radiación, ha sido colonizado por diferentes formas de vida las cuales se han ido adaptando a lo largo del tiempo a las condiciones adversas. Se han encontrado bacterias, levaduras, hongos, algas, líquenes, pequeños invertebrados, varias especies de aves y mamíferos.

Los microorganismos que se desarrollan en ambientes extremos se denominan extremófilos. Un ambiente extremo es aquel que presenta un reto para la supervivencia de la mayoría de las formas de vida. Estos abarcan regiones con altas o bajas: temperaturas, presión, salinidad, acidez/alcalinidad, radiación, oxígeno, etc. En particular, los microorganismos adaptados a bajas temperaturas se llaman psicrófilos y psicrotolerantes. Los psicrófilos son microorganismos cuya temperatura óptima de crecimiento es de 15°C o inferior, y no pueden o se desarrollan poco a temperaturas mayores a 20°C. Los psicrotolerantes tienen temperaturas óptimas de crecimiento entre los 20-40°C, pero pueden crecer a temperaturas cercanas a los 0°C al igual que los psicrófilos. Este tipo de microorganismos presentan a nivel molecular ciertas diferencias respecto del resto de los microorganismos no-extremófilos. Por ejemplo, las enzimas funcionan de forma óptima a bajas temperaturas, e incluso, pueden llegar a inactivarse a temperaturas moderadas. Se cree que esto se debe a que estas presentan una mayor cantidad de α -hélices en sus estructuras y más aminoácidos polares, los cuales vuelven más eficientes y flexibles a las proteínas a bajas temperaturas. También presentan un mayor contenido de ácidos grasos insaturados, lo que genera una membrana más fluida y dinámica que permiten el correcto funcionamiento de los mecanismos de transporte (Madigan *et al*, 2004).

1.1 Características de sus proteínas

Las proteínas son moléculas poliméricas formadas por cadenas lineales de aminoácidos. Los aminoácidos son ácidos carboxílicos con al menos 1 grupo amino unido al carbono central α y están unidos entre sí mediante un enlace covalente especial conocido como enlace peptídico. Los diferentes aminoácidos difieren en la composición de sus cadenas laterales "R" que varían en estructura, tamaño y carga eléctrica (figura 1 y 2). Hay 20 tipos de aminoácidos diferentes, y

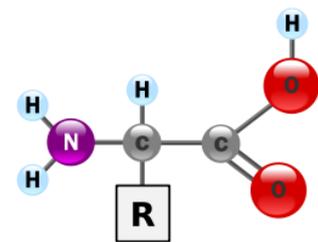


Figura 1. Representación molecular de un aminoácido

la combinación en diferentes proporciones en una cadena lineal, genera la gran variedad de macromoléculas existentes. Son las macromoléculas más abundantes y las encontramos desde pocos aminoácidos, como el glutatión, hasta grandes complejos

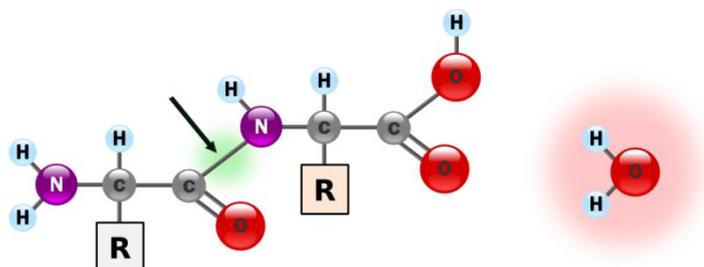


Figura 2. Reacción de hidrólisis de la formación del enlace peptídico

macromoleculares como la conectina que tiene casi 35000 aminoácidos.

Los aminoácidos pueden clasificarse según su cadena lateral en: básicos (Histidina, Arginina y Lisina), apolares (Fenilalanina, Alanina, Leucina, Metionina, Isoleucina, Triptófano y Valina), polares sin carga (Cisteína, Glicina, Glutamina, Asparagina, Serina, Tirosina y Treonina) y ácidos (Aspartato y el Glutamato) (Figura 3). La cisteína es un aminoácido particular ya que puede reaccionar covalentemente consigo mismo formando lo que se conoce como puente disulfuro. Esta estructura proporciona rigidez (Nelson & Cox, 2001).

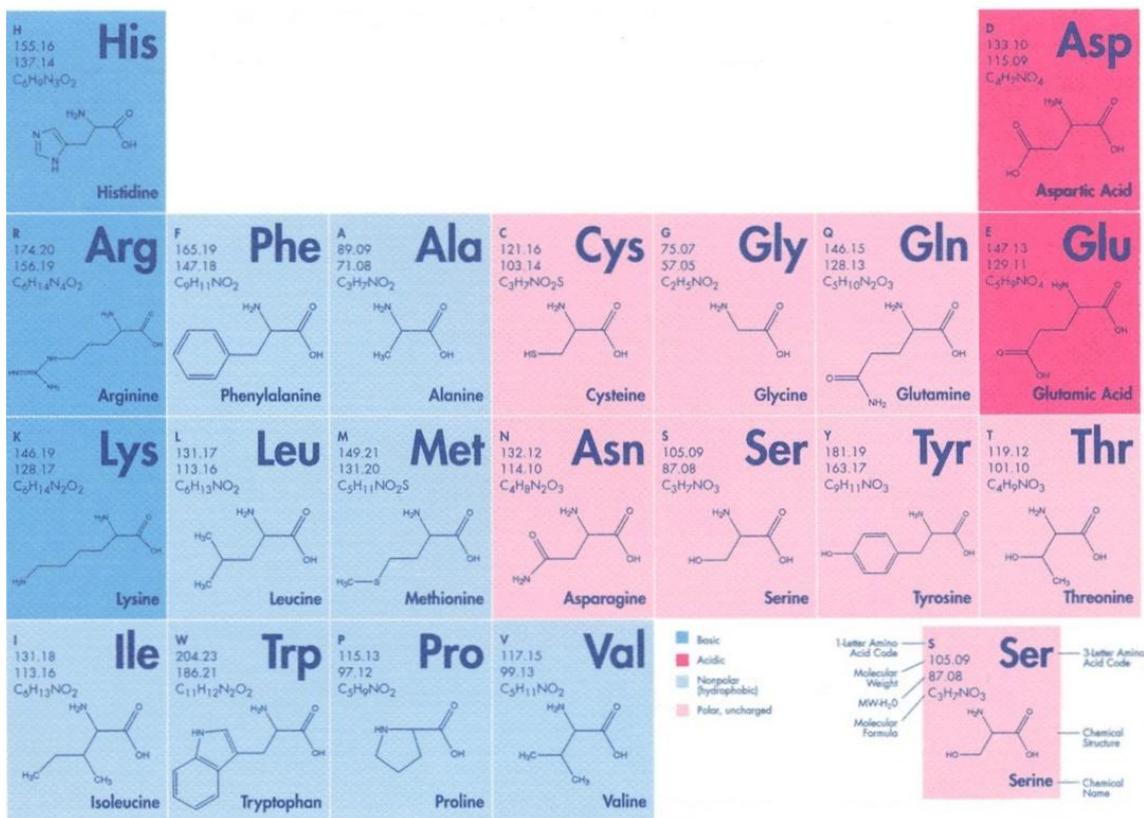


Figura 3. Estructura de los 20 aminoácidos comunes. En azul, se muestran los aminoácidos básicos, en celeste los no-polares, en rosado los polares sin carga y en rojo los ácidos.

En un polipéptido, las diferentes cadenas laterales interactúan espacial y eléctricamente entre sí, generándose interacciones locales (intramoleculares) e interacciones con el medio, que pueden ser atractivas o repulsivas. En función de estas interacciones se pueden formar estructuras particulares. Por esta razón se definen 4 tipos de estructuras para describir a las proteínas. La estructura primaria es la secuencia o disposición lineal de los aminoácidos que componen a la proteína. Esta incluye, si los hubiera, la información sobre la posición de los enlaces disulfuros. Conociendo los aminoácidos que componen una proteína es posible saber cómo será su comportamiento fisicoquímico en diferentes situaciones. La estructura secundaria es la disposición particular que adoptan los aminoácidos cuando interactúan con otros y pueden dar lugar a patrones estructurales repetitivos. Por ejemplo, es común encontrar en proteínas estructuras en forma de hélice (α -hélice) o con forma de hoja (Hoja- β). La estructura terciaria es la descripción del plegamiento tridimensional global de la cadena polipeptídica. Y por último, la estructura cuaternaria es la descripción tridimensional de la proteína cuando esta está compuesta por 2 o más subunidades. Es decir, no todas las

proteínas son funcionales con una única cadena polipeptídica. Algunas requieren la interacción de 2 o más, e incluso éstas pueden ser iguales o diferentes. La estructura cuaternaria es la que describe la interacción entre las diferentes sub-unidades de una proteína para formar la estructura tridimensional funcional.

El tipo de comportamiento que tendrá la proteína estará en función de los aminoácidos que la componen y de los plegamientos locales y globales. Por ejemplo, las proteínas de los termófilos tienen que tener la capacidad de mantener su estructura y funcionalidad a elevadas temperaturas. Se sabe que las proteínas de estos contienen clústeres de zonas hidrofóbicas y varios puentes disulfuros para mantener la estructura funcional a elevadas temperaturas, ya que de otra manera se desnaturalizarían rápidamente. En cambio en los psicrófilos, las interacciones deben ser más débiles para permitir flexibilidad y movilidad, lo que en definitiva facilita la actividad a bajas temperaturas (Nelson & Cox, 2001).

1.2 Características de sus lípidos

Los lípidos biológicos son un grupo de moléculas heterogéneas cuya principal característica es la insolubilidad en agua. Dentro de los lípidos se incluyen a las grasas, aceites, ceras, esteroides, vitaminas lipofílicas, mono/di/tri glicéridos y fosfolípidos entre otros. Tienen como función fundamental actuar como reserva de energía, ser componentes estructurales de las membranas, y ser mediadores en la señalización.

Las grasas y los aceites son derivados de ácidos grasos, los cuales son ácidos carboxílicos de cadenas hidrocarbonadas largas (C₄ a C₃₆). En algunos casos

esta cadena hidrocarbonada puede estar completamente saturada (sin dobles enlaces) y en otros pueden tener 1 o varios dobles enlaces (Figura 4). Los ácidos grasos saturados o insaturados juegan un papel fundamental en la estructura de la membrana celular. Cuanta más cantidad de ácidos grasos saturados, más interacciones hidrofóbicas se establecen, y por lo tanto, más rígida será la membrana. Por el contrario a mayor cantidad de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) más flexible y dinámica se vuelve la membrana. Las propiedades físicas de los ácidos grasos dependen del largo de la cadena hidrocarbonada, del grado de insaturación y de la temperatura ambiente (Nelson & Cox, 2001). Los microorganismos adaptan la composición de sus

membranas según sus necesidades metabólicas y ambientales. Es así que por ejemplo, las membranas de los microorganismos que viven en temperaturas elevadas tienden a tener muchos ácidos grasos saturados. De esta manera se generan interacciones más fuertes entre las cadenas hidrocarbonadas y es más difícil de desestabilizar como consecuencias de las altas temperaturas. Los microorganismos adaptados al frío tienden a tener en sus membranas mayor cantidad de ácidos grasos poliinsaturados. Esto permite que la membrana se mantenga dinámica y funcional, ya que de lo contrario, debido a las bajas temperaturas, la misma podría solidificarse (Madigan *et al*, 2004).

Los ácidos grasos insaturados se representan mediante un sistema de nomenclatura particular para, de esta manera, dar información sobre las posiciones del/los doble/s enlace/s: X:YΔⁿ, en donde X es la cantidad de carbonos que posee el ácido graso, Y es la cantidad de

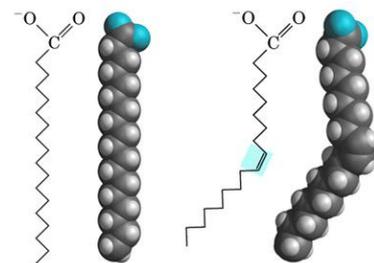


Figura 4. Estructuras de los ácidos grasos saturados e insaturados. En este caso, el ácido graso insaturado presenta una única insaturación en conformación *cis*.

insaturaciones presentes y n es la posición específica de cada insaturación en el ácido graso¹. Por ejemplo, el ácido α -linolénico (también conocido como: ALA) contiene 18 carbonos y 3 insaturaciones en las posiciones 9, 12, 15 a partir del extremo carboxílico. Por lo tanto, ALA se designa como 18:3 $\Delta^{9,12,15}$. Existe otro tipo de nomenclatura para designar a los ácidos grasos insaturados el cual utiliza el sistema X:Y Omega-n, donde x es la cantidad de carbonos del ácido graso, Y es la cantidad de insaturación que contiene, y n es la posición de la primera insaturación a contar desde el extremo no-carboxílico. Por ejemplo, el ácido α -linolénico (ALA) es un ácido omega-3 (ω -3) ya que la primera insaturación se encuentra en la posición 3 desde el extremo no-carboxílico, su nomenclatura es: 18:3 ω -3 (Figura 5) (Nelson & Cox, 2001).

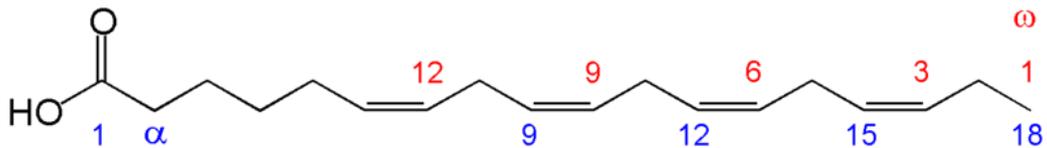


Figura 5. Comparación de los sistemas de nomenclatura de los PUFAs. En azul se muestra el sistema común basado en las reglas de IUPAC en donde el carbono n°1 es perteneciente al grupo carboxilo. En rojo el sistema "omega" en donde el carbono n°1 se encuentra sobre el extremo metilo.

Si bien en este sistema no se da información sobre el resto de las posiciones de las insaturaciones, se utiliza para designar a aquellos ácidos grasos poliinsaturados que son esenciales. Los ácidos grasos esenciales son aquellos ácidos grasos que los seres humanos (y los mamíferos en general) no pueden sintetizar por carecer de las desaturasas necesarias. Los primeros PUFAs que los mamíferos no pueden sintetizar son el ácido linoleico (18:2 ω -6, LA) de la serie omega-6 y el ácido α -linolénico (18:3 ω -3, ALA) de la serie omega-3. Estos ácidos grasos también son conocidos como los ácidos grasos esenciales "padres", ya que a partir de ellos se generaron otros ácidos grasos poliinsaturados de valor metabólico (Beltrán *et al*, 2010). En la figura 6 se muestran las vías metabólicas de síntesis de cada serie. Para la serie omega-6, la transformación de LA pasa por el ácido γ -linolénico (18:3 ω -6, GLA) a través de una desaturasa Δ 6, hasta llegar al ácido araquidónico (20:4 ω -6, AA) el cual es un precursor fundamental para la posterior síntesis de compuestos bioactivos llamados eicosanoides. Dentro de los eicosanoides más conocidos se encuentran las prostaglandinas, los tromboxanos y los leucotrienos. Si bien los mamíferos cuentan

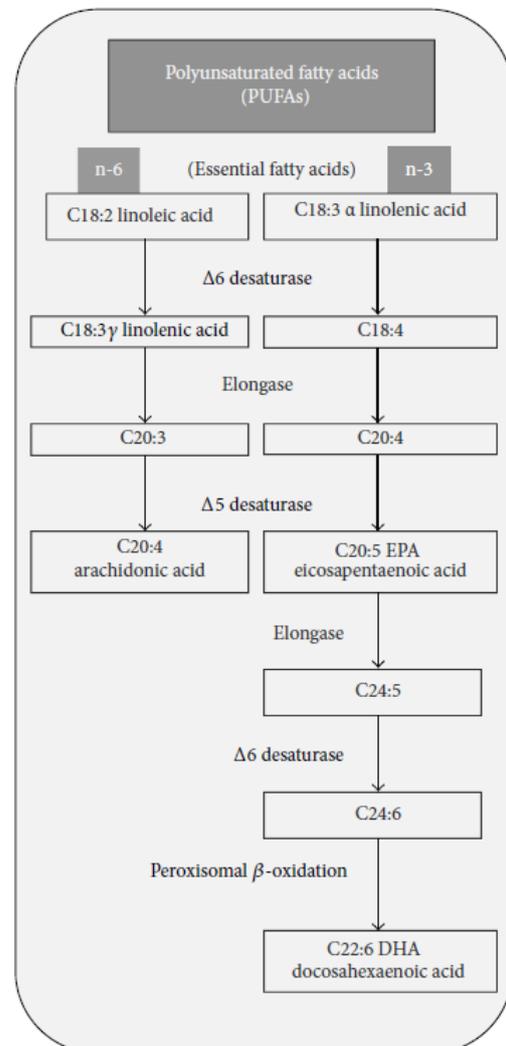


Figura 6. Vías de síntesis de AA, EPA y DHA. (Catalá, 2013)

¹ En el sistema de nomenclatura X:Yⁿ la posición de las insaturaciones se cuentan desde el extremo carboxilo terminal del ácido graso, siguiendo las reglas de IUPAC para la designación.

con las enzimas necesarias para generar GLA y AA a partir de LA, en general la actividad de estas enzimas es tan baja que la síntesis de estos es insuficiente para los requerimientos nutricionales del organismo. Por esta razón, a pesar de que en verdad es posible su síntesis, se los considera también ácidos grasos esenciales. Con respecto a la serie omega-3, el ácido α -linolénico es el primer ácido graso esencial o "padre" de la serie. A partir de él, se pueden sintetizar otros ácidos grasos poliinsaturados de importancia metabólica como ser el ácido eicosapentanoico (20:5 ω -3, EPA) y ácido docosahexanoico (22:6 ω -3, DHA). Al igual que en la serie omega-6, el organismo de los mamíferos cuenta con las enzimas para sintetizar ALA a EPA y DHA, pero la eficiencia es tan baja que es necesario suplementarla con una ingesta externa (Catalá, 2013).

2. Levaduras marinas

Las levaduras son microorganismos eucariotas clasificados como ascomicetes y basidiomicetes dentro del reino de los hongos, y que comprende más 1500 especies caracterizadas y estudiadas (Kurtzman *et al*, 2011). Se han identificado varios géneros de levaduras en varios habitats marinos del planeta, incluidos los de la Antártida: *Bullera*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Cystofilobasidium*, *Debaryomyces*, *Kondoa*, *Leucosporidium*, *Metschnikowia*, *Mrakia*, *Pseudozyma*, *Rhodotorula*, *Sakaguchia*, *Sporopachydermia*, *Sympodiomyces* y *Trichosporon* (Satyanarayana, 2009). Todas estas especies se han aislado de muestras de agua, sedimento, algas, animales u otra materia orgánica presente en los habitats marinos antárticos.

2.1 Localización y generalidades de los géneros de levaduras a los que pertenecen las cepas aisladas en el presente trabajo.

Clase: Ascomicetes

Género: *Metschnikowia*: Este es un género que ha sido recuperado desde muestras de aguas del océano Atlántico y Pacífico, lagos y estanques, algas y corales, de invertebrados (artemias y copépodos) y de peces (Philip & Kutty, 2008). La especie *Metschnikowia bicuspidata* se ha detectado en ambientes salinos con 10% NaCl (Gunde-Cimerman *et al*, 2005). *M. australis* es endémica de Antártida y es el ascomicete con mayor prevalencia en todos los ambientes marinos antárticos. Es la única levadura recuperada del fluido intravesicular de la macroalga *Adenocystis utricularis* por lo que se considera que representa un hábitat para esta levadura ya que está ampliamente distribuida en el ecosistema antártico (Loque *et al*, 2010). Se a visto también que esta especie, junto con *M. bicuspidata*, son patógenos de copépodos y camarones. (Seki & Fulton, 1968) (Fize *et al*, 1971) (Lachance *et al*, 1976). La especie *M. zobelli* se ha encontrado en el tracto digestivo de peces (Fell & Van Uden, 1963) y *M. australis* en el tracto digestivo del kril, lo que seguramente en ambos casos, refleje simplemente sus hábitos de alimentación y potenciales funciones digestivas (Donachie & Zdanowski, 1998). También, *M. australis* es un habitante de la comunidad microbiana de las esponjas marinas antárticas (Vaca *et al*, 2013).

Estudios enzimáticos sobre diferentes especies de este género han detectado actividad lipolítica, proteolítica y amilolítica a diferentes temperaturas y pH (Vaz *et al*, 2011) (Fize *et al*, 1971). Se las ha detectado en las uvas sanas durante su proceso de maduración, teniendo

efectos en la posterior elaboración del vino y su sabor característico . Además se cree que cumplen cierta función de control antifúngico y antimicrobiano en las uvas (Fleet, 2003). También se cree que presenta mutualismo con la polilla del manzano, en cuanto que la levadura promueve la sobrevivencia de la larva reduciendo la incidencia de infecciones fúngicas, mientras que la larva facilita la proliferación de la levadura a medida que se va alimentando de la fruta (Witzgall *et al*, 2012).

Género: *Debaryomyces*: Este es un género polifilético que se ha recuperado de varios lugares y hábitas del planeta: agua marina y oceánica, sedimentos y estuarios de varias partes del mundo, incluida la Antártida. También se aisló a partir de algas, invertebrados y peces. En la mayoría de estos casos la especie *D. hansenii* (Teleomorfo de *Candida famata*) fue la predominante (Philip & Kutty, 2008) y es sobre la que existe más información actualmente. Es una especie halotolerante capaz de crecer a concentraciones de 4M de NaCl y acumular grandes concentraciones de Na⁺ o K⁺. Su temperatura óptima de crecimiento es de 25-28°C y algunas pueden crecer a 5-10°C. Es un débil fermentador y puede asimilar nitrito. Se lo considera una levadura no patogénica, aunque se han recuperado aislados de casos clínicos (Desnos-Ollivier *et al.*, 2008).

También se la coloca dentro del grupo de "levaduras flavinogénicas", ya que es capaz de sobre-sintetizar hasta 600µg/ml de riboflavina (vitamina B₂) en ausencia de hierro, y algunas cepas de esta especie pertenecen al grupo de microorganismo de mayor producción conocidos hasta el momento. De hecho, fue un microorganismo usado en la producción de riboflavina a nivel industrial en USA durante mucho tiempo. Debido a esto, se ha estudiado completamente la vía de síntesis y regulación de la riboflavina, y se ha intentado recrear un sistema de transformantes y de expresión para generar un mayor rendimiento en la producción de este compuesto. Debido a que está presente en el tracto digestivo de los invertebrados marinos, se cree que sirven de fuente de vitaminas para animales marinos que se alimentan de ellas (Satyanarayana, 2009). Esta especie es utilizada en la industria agro-alimenticia. Es común encontrarla en todos los tipos de quesos y en salchichas. También, se ha encontrado que algunas cepas de *D.hansenii* producen xilitol (edulcorante utilizado como materia prima para la producción de alimentos sin azúcar) a partir de Xilosa.

También está involucrado en la producción de vino liberando proteasas, β-glucosidas, y esterasas que hidrolizan tributirina a etilbutirato, las cuales tienen importantes efectos en el sabor. Además, presenta actividad superóxido dismutasa (SOD). Esta actividad tiene importantes aplicaciones en medicina como: anti-inflamatorio, modulador de la respuesta inmune, regresión de tumores malignos, protección contra radiación y quimioterapia, reducción del síndrome premenstrual, artritis y contra el estrés oxidativo en general (Satyanarayana, 2009).

También se ha evaluado la bioabsorción de uranio por esta especie desde soluciones ácidas de desechos (Misaelides *et al*, 2009).

Clase: Basidiomicetes

Género: *Cryptococcus*: Este género se ha recuperado de ambientes marinos, oceánicos, sedimentos y de estuarios de diversas partes del mundo, y es el predominante en hábitas antárticos. No hay reportes de recuperación desde algas, invertebrados o peces marinos (Philip

& Kutty, 2008). Las especies de este género son psicotolerantes y algunas presentan comportamiento acidófilo y/o producen pigmentos. Hay especies como *Cryptococcus albidus* y *Cryptococcus laurentii* que predominan en musgos antárticos. Algunas especies como *C. gattii* o *C. albidus* son patógenos de mamíferos marinos (McLeland *et al*, 2012) (Lee *et al*, 2010). Respecto a la importancia industrial de este género, se ha detectado que la especie antártica *C. adeliensis* produce xilanasas (Scorzetti *et al*, 2000), las cuales presentan aplicaciones en la industria del vino y los jugos (Cavicchioli & Torsten, 2000), y también se recuperó una cepa de la misma especie a 4500-6500m de profundidad que posee alta tolerancia al cobre 2+ (Abe *et al.*, 2001). Se detectó en otra especie marina, *C. aureus*, la capacidad de producir inulinasa, la cual es una hidrolasa que produce inulina, un polisacárido natural presente en vegetales que tiene aplicaciones industriales, medicinales y en la industria alimentaria (Chi *et al*, 2007). Existen muchas especies de este género no marinas. Quizás la más conocida es *Cryptococcus neoformans*, la cual vive en plantas y animales, pero es patógena de humanos generando la meningitis o meningo-encefalitis. Se recuperaron cepas de este género en montañas desérticas en donde la temperatura y la humedad varían enormemente durante el día y noche. La cápsula de polisacáridos que rodea a la célula permite su adaptación a estas condiciones confiriéndole características de psicrófilo y termófilo en el correr de un día. Esta adaptación está ausente en cepas de este género encontradas en Antártida (Aksyonov, 2002).

Género: *Rhodotorula*: Es un género polifilético que se encuentra presente en varios hábitats marinos del mundo. Se han recuperado de muestras de agua de mar, sedimentos, estuarios, algas, invertebrados y peces (Philip & Kutty, 2008). Se lo considera como uno de los más importantes géneros de las llamadas "verdaderas levaduras marinas". En general se lo considera un género psicotolerante aunque también las hay mesófilas, algunas especies son osmófilas y otras acidófilas. Son conocidas por producir pigmentos y carotenoides naranjas, rojos y rosados que no difunden en agar. Se han encontrado algunas especies de este género con características extremas en acuíferos de rocas ígneas, en donde predominan las altas presiones, hipersalinidad y anaerobiosis; y en sedimentos a profundidades de 2000m. (Raspor & Zupan, 2006).

Algunas especies como *Rhodotorula glutinis* o *Rhodotorula minuta* parecen ser patógenas de anfípodos y camarones (Philip & Kutty, 2008). *Rhodotorula glacialis*, *Rhodotorula musilaginosa* y *Rhodotorula laryngis* parecen ser cosmopolitas, ya que han sido recuperadas de muestras antárticas (Vaz *et al*, 2011), pero también de sedimentos glaciares alpinos (Turchetti *et al*, 2008). En ambos trabajos se mostró que las especies presentaron actividad proteolítica, amilolítica y lipolítica. Se recuperó una cepa de *Rhodotorula pinicola* de esponjas marinas antárticas, la cual presentó únicamente actividad lipolítica con tributirina como sustrato a 23°C (Vaca *et al*, 2013).

Este género no presenta especies patógenas, pero si oportunistas. Se sabe que *Rhodotorula musilaginosa* y *Rhodotorula rubra* están asociadas a procesos patológicos como meningitis, endocarditis, dermatosis y peritonitis en pacientes inmunocomprometidos (Meireles *et al*, 2013).

Géneros: *Hannaella* y *Bullera*: *Bullera* es un género descrito por primera vez por Derx en 1930. En ese momento únicamente las características morfológicas se utilizaban para describir estos géneros. Sin embargo, estudios quimiotaxonómicos y moleculares permitieron ir

separando especies hacia otros géneros debido a las diferencias encontradas. *Hannaella* es un género relativamente nuevo propuesto por Wang & Bai (2008) para acomodar especies que no se encuentran bien caracterizadas dentro del orden de los Tremellales. E incluso, algunas especies de *Cryptococcus* estarían relacionadas filogenéticamente en el mismo linaje con algunas especies de *Bullera* (Takashima & Nakase, 1999). Al día de hoy se sigue trabajando filogenética, morfológica y quimiotaxonómicamente para diferenciar y separar estos géneros y especies de forma de ubicarlos en donde corresponden. Por lo cual, sería arriesgado asignar aplicaciones industriales y/o biotecnológicas a especies que, quizás, no sean las correctas.

Género: *Filobasidium*: Es un género que pertenece a los filobasidiales, los cuales a su vez están muy relacionados con el orden Tremellales, el cual incluye algunos géneros y especies de *Cryptococcus*. Por esta razón, se sigue trabajando en el reordenamiento y/o re-caracterización a nivel molecular de estas especies para establecer relaciones filogenéticas. Por ejemplo, el estado haploide de la especie *Filobasidium floriforme* es fenotípicamente muy similar a la de *Cryptococcus albidus*, e incluso, varios miembros del género *Filobasidium* estarían dentro del mismo grupo con *Cryptococcus ater* (Fell *et al*, 2000).

Algunas especies conocidas son *Filobasidium elegans* o *Filobasidium floriforme* las cuales se recuperaron de hojas de yucca (*Yucca rupicola*) y de girasoles gigantes (*Erianthus giganteus*) (Kurtzman *et al*, 2011) (Satyanarayana, 2009). Se encontró que *Filobasidium capsuligenum* produce pectinas con potenciales usos en la industria del vino (Merín *et al*, 2013).

3. Productos biotecnológicos de origen microbiano

Los productos biotecnológicos desarrollados a partir de microorganismos extremos son bien conocidos y su número se ha ido incrementando constantemente con el tiempo. Ejemplos de ellos son las enzimas, cuya comercialización alcanzará los 4.400 millones de dólares para el 2015 (Sharma & Kumar, 2013) y los nutracéuticos.

3.1. Enzimas de interés industrial

Las proteínas que más se utilizan a nivel industrial son básicamente hidrolasas. Estas son enzimas que utilizan H₂O para catalizar la ruptura de un enlace químico. Dentro de las hidrolasas encontramos:

- **Proteasas:** Son enzimas que hidrolizan las cadenas polipeptídicas de las proteínas sobre el enlace peptídico liberando aminoácidos o pequeños polipéptidos. A nivel celular, los microorganismos las utilizan para degradar proteínas mal plegadas en el reciclado de metabolitos y/o también las pueden excretar al medio para degradación y posterior asimilación de productos. Se las puede clasificar como endo o exohidrolasas, según el sitio de actividad de la proteína, o también se las puede clasificar según la especificidad catalítica: serinproteasas, cisteinproteasas, asparticoproteasas y metaloproteasas (Nelson & Cox, 2001). Para el año 1998, el mercado mundial de enzimas industriales generaba ganancias de aproximadamente 1 billón de dólares. Las proteasas representaban el 60% de ese mercado mundial. Desde el inicio de la aplicación de proteínas en la industria, las proteínas vegetales o animales fueron las que primero se utilizaron. La Papaína (de la papaya) y Bromelaína (de la piña) son las proteasas vegetales más conocidas y son mundialmente comercializadas para ablandar la carne (Deshpande *et al*, 1998). Por otro lado tenemos a la tripsina (del intestino), quimiotripsina (del páncreas), pepsina (del estómago) que son las proteasas animales más

conocidas. Al día de hoy se está reconociendo a los microorganismos como una fuente incomparable de proteasas en comparación con las proteasas animales o vegetales. La relativa facilidad de generación, la velocidad de producción, la reducción de los costos de fabricación y la posibilidad de perfeccionar genéticamente el producto con relativa facilidad son algunos de los beneficios que las distinguen. Dentro de las aplicaciones de proteasas microbianas, el uso más conocido es en detergentes. Se usan tanto como aditivos para los detergentes de uso doméstico para el lavado de ropa, como para otro tipo de detergentes destinados a la limpieza de lentes de contacto o piezas odontológicas. La mayoría de las marcas comerciales utilizan proteasas derivadas de *Bacillus spp.* y es un mercado que representa el 25% de las ventas mundiales de enzimas. También se utilizan proteasas en la industria del cuero.

Particularmente, para la eliminación del pelo y otros constituyentes no-colagenosos presentes en la piel del animal. En estos se utilizan generalmente proteasas de los géneros *Bacillus* y *Aspergillus*. En la industria de la producción de alimentos, la mayor aplicación de proteasas se encuentra en la fabricación de quesos. Aquí la función primaria es una hidrólisis específica para generar *para*- κ -Caseína y macropéptidos. Actualmente, se están utilizando proteasas de *Mucor michei*, *Bacillus subtilis*, y *Endothia parasitica* para la producción de quesos. También se utilizan proteasas de *Aspergillus oryzae* para la proteólisis del gluten en la harina de trigo en la industria panadera y como medicamento para corregir deficiencias enzimáticas en ciertos síndromes (Deshpande *et al*, 1998).

- Glicosilasas (EC 3.2.1.x): Son enzimas que hidrolizan la ruptura de enlaces glicosídicos. Estos pueden ser O-glicosil o N-glicosil. Dentro de las glicosilasas encontramos a las amilasas, celulasas y xilanasas entre otras.
 - La amilasa es una enzima que cataliza la hidrólisis del almidón. El almidón es un homopolímero formado por monómeros de glucosa unidos por enlace α 1-4. Se puede clasificar a las amilasas según el sitio de acción de la enzima. Es así que tenemos a las α -amilasas (endoamilasas), las cuales hidrolizan el enlace aleatoriamente y las β -amilasas (exoamilasas) que comienzan la hidrólisis desde el extremo no reductor de almidón. Adicionalmente algunas α -amilasas también pueden romper el enlace α 1-6 que genera las ramificaciones en el almidón (Nelson & Cox, 2001). Si bien están presentes en prácticamente todos los organismos, estas enzimas de fuentes microbianas y fúngicas son las que cumplen con las condiciones para ser producidas a gran escala. Son de las enzimas más importantes a nivel industrial ya que pueden ser utilizadas en una gran cantidad de industrias (Pandey *et al*, 2000). Al día de hoy su uso más importante es en la producción de azúcar a partir de almidón en donde se utilizan para realizar una hidrólisis parcial que permite la solubilidad del almidón (Kuddus & Roohi, 2010). Sin embargo, las amilasas adaptadas al frío pueden presentar beneficios adicionales. Una de las posibles aplicaciones es en la industria de los detergentes. El lavado de ropa a baja temperatura protege los colores y reduce los requerimientos energéticos. En la industria papelería es útil porque reduce la viscosidad del almidón necesario para el revestimiento del papel. También es posible utilizarlas en la biorremediación de suelos contaminados en lugares de climas fríos, en donde la capacidad natural de la microflora no alcanza para la limpieza. En la industria panadera se utilizan comúnmente glicosilasas, pero estas pueden quedar con actividad

residual luego de la cocción, lo que se evitaría utilizando amilasas psicrófilas ya que la temperatura de desnaturalización de las mismas es menor que las de sus pares mesófilas. Otro uso relevante de las glicosilasas psicrófilas puede ser en la remoción de la lactosa de la leche durante su almacenamiento en frío, ya que se sabe que 2/3 de la población mundial posee intolerancia a la lactosa (Kuddus & Roohi, 2010).

- La celulasa es una enzima que cataliza la ruptura del enlace O-glucosídico β 1-4 del polisacárido celulosa compuesto por monómeros lineales de glucosa. La celulosa es el componente estructural principal de plantas y es el polisacárido más abundante de la tierra. Las celulasas son producidas exclusivamente por bacterias y hongos, y se pueden clasificar según el sitio de acción: las endo-(1,4)- β -D-glucanasas (EC 3.2.1.4) atacan aleatoriamente los enlaces sobre la celulosa, las exo-(1,4)- β -D-glucanasas (EC 3.2.1.91) las cuales atacan desde el extremo no reductor de la celulosa liberando celobiosa (disacárido β 1-4 de glucosa), y las β -glucosidasas (EC 3.2.1.21) que actúa exclusivamente sobre el disacárido celobiosa para liberar los monómeros de glucosas. Las celulasas se viene comercializando de hace más de 30 años y se utilizan en una enorme variedad de industrias. Por ejemplo, en la industria papelera se usa como coaditivo en el blanqueamiento, además de reducir los requerimientos energéticos y de compuestos organoclorados en una hidrólisis química. En la industria textil se utilizan para mejorar la calidad de las fibras, para el "biodesgaste" y el "biopulido", entre otras. En la industria de los alimentos se usan para el tratamiento y extracción de productos desde frutas y verduras. En las bebidas alcohólicas se utilizan para mejorar la viscosidad, filtrabilidad y clarificación de los líquidos fermentables, así como también mejorar el aroma y el color. En los detergentes se utilizan para mejorar la limpieza de las prendas sin dañar las fibras, mejorando el color y la remoción de la suciedad. Además de estas, existen otras aplicaciones en las cuales las celulasas son utilizadas. Varias empresas comercializan celulasas mundialmente y son de las enzimas más importantes en la actualidad (Kuhad *et al*, 2011).
- La xilanasas es una enzima que cataliza la ruptura aleatoria del enlace O-glucosídico β 1-4 del xilano liberando D-xilosa. El xilano es un heteropolisacárido compuesto por monómeros de D-xilosa y que se encuentra presente en la pared celular de vegetales. Es parte constituyente de una estructura superior llamada hemicelulosa y es el segundo polisacárido más abundante. Los monómeros del xilano pueden contener cadenas laterales de otros mono o disacáridos como ser el ácido glucurónico o la arabinosa. Las xilanasas son producidas por una amplia variedad de microorganismos como bacterias, hongos y levaduras. Las xilanasas tienen un enorme potencial industrial y son actualmente aplicadas a diversos procesos biotecnológicos. Por ejemplo, el proceso de producción de bioetanol a partir de biomasa lignocelulítica incluye la de-lignificación y la hidrólisis de la celulosa y hemicelulosa a monosacáridos. Este proceso puede realizarse por tratamiento ácido a altas temperaturas o por acción enzimática. También se detectó que el

agregado de xilanasas en los alimentos animales en base a granos estimula las tasas de crecimiento y mejora la digestibilidad.

En la industria papelera también es posible utilizar xilanasas. El desafío está en retener la celulosa al tiempo que se remueve la lignina de la pulpa de papel.

Tradicionalmente esto se realiza con cloro. Pero es posible utilizar xilanasas para romper las "cadenas" que mantienen unida a la lignina y la celulosa. Esto trae beneficios en costos y en la reducción de desechos organoclorados.

Incluso, muchos de los subproductos de la hidrólisis enzimática (xilosa, arabinosa y ácido metil glucurónico) pueden ser recuperados, purificados y utilizados en otras industrias como la farmacéutica, alimenticia y en la salud.

También es posible utilizar a las xilanasas en la industria de la panificación, en donde la hidrólisis enzimática de polisacáridos no amiláceos mejora las propiedades reológicas del pan, y en la industria cervecera, en donde éstas enzimas mejoran la extracción de azúcares fermentables y reducen la viscosidad mejorando la filtrabilidad (Sharma & Kumar, 2013).

Si bien al día de hoy no hay un desarrollo extensivo de la producción y/o uso de xilanasas psicófilas, se están evaluando aplicaciones en diversas industrias. Por ejemplo, en la panificación la preparación de la masa requiere generalmente temperaturas menores a 35°C. Y de hecho se ha demostrado que las xilanasas adaptadas al frío son más eficientes que las actualmente comercializadas (Collins *et al*, 2005).

- Lipasas

Las lipasas (triacylglycerol acylhydrolases EC 3.1.1.3) son un grupo de esterasas que catalizan la hidrólisis de lípidos, específicamente, de triacilgliceroles liberando glicerol y ácidos grasos.

Están presentes en prácticamente todos los seres vivos ya que los lípidos son ampliamente utilizados como material de reserva y son excelentes sustratos para los microorganismos (Madigan *et al*, 2004). Existe una amplia variedad de lipasas con otras propiedades catalíticas como: fosfolipasa, colesterol esterasa, amidasa y otras actividades tipo esterasas.

Si bien al día de hoy varias industrias utilizan lipasas en procesos productivos, todavía los costos de producción a escala industrial son elevados lo cual representa uno de los desafíos asociados a la aplicación industrial a gran escala. Por esta razón se está continuamente buscando nuevos microorganismos capaces de producir estas enzimas con mejores características fisicoquímicas y mejores rendimientos. En la industria alimentaria se utilizan para modificar las grasas y aceites, de manera conseguir aceites de mayor valor agregado, y también en la maduración y sabor de los quesos. También se utilizan lipasas en la industria de detergentes para eliminar grasas y aceites. Incluso, la tendencia es a utilizar detergentes con actividad a bajas temperaturas, ya que de esta manera se reduce el consumo de energía y también se mantiene la textura y la calidad de las prendas. En estas condiciones la actividad lipolítica sería mayor con el uso de lipasas psicófilas. Desde hace bastante tiempo se vienen utilizando lipasas en la industria de la pulpa y el papel para remover los componentes hidrofóbicos de la madera. Dentro de los usos más modernos de las lipasas podemos encontrarlas en la biorremediación, en donde se utilizan para tratar los desechos lipídicos de fabricas y restaurantes; y en la industria medica utilizándose como biosensores o herramientas de diagnostico para detectar enfermedades o desequilibrios lipídicos (Verma *et al*, 2012).

3.2 Ácidos Grasos Poliinsaturados (PUFAs)

Desde hace muchos años se sabe y se siguen estudiando los efectos y beneficios sobre la salud humana de la ingesta de los PUFAs. El reconocimiento más importante quizás ha sido sobre el sistema cardiovascular en donde se vio que los PUFAs de la serie ω -3 tienen efectos preventivos en enfermedades cardiovasculares, estabilizando la placa aterosclerótica, reduciendo la infiltración de células inflamatorias e inmunes. Esto podría explicar la reducción de ataques al corazón registrados en función de una ingesta de aceite de pescado en la dieta de una población. También ayudan a la reducción de la hipertensión y de los niveles de triglicéridos sanguíneos (Bergé & Barnathan, 2005). Se ha detectado que existe una relación inversa entre los niveles de EPA y DHA, y el riesgo de padecer cáncer de próstata y adenocarcinomas, así como alargar la tasa de supervivencia en las etapas finales del cáncer. Tienen efectos sobre enfermedades pulmonares en donde reducen los síntomas de asma y contra el tratamiento de enfisema y fibrosis quística. También se sabe que reduce la artritis reumatoidea afectando los niveles de interleukina-1-beta (IL1- β) la cual es responsable del dolor en las articulaciones. Tienen efectos sobre la salud mental en general previniendo la demencia, depresión, esquizofrenia, Alzheimer y en los desordenes de atención en los niños manteniendo la fluidez de las membranas de las neuronas. Y por último, se ha descubierto que son fundamentales en el desarrollo de los niños y durante el embarazo, ya que la única fuente de estos ácidos es a través del cordón umbilical o la leche materna. La ausencia de estos puede acarrear preclampsia en las madres y, problemas de peso y nacimiento prematuro en los niños.

Los PUFAs de la serie ω -6 tienen también un rol fundamental sobre el metabolismo ya que el ácido araquidónico es un precursor muy importante de varias moléculas involucradas en diversos sistemas como los leucotrienos, las prostaglandinas y los tromboxanos. Los leucotrienos tienen como función participar como mediadores de la inflamación. En los bronquios producen la broncoconstricción y en el intestino los movimientos peristálticos. También actúan sobre las células endoteliales provocando la vasodilatación y el aumento de la permeabilidad permitiendo una mayor llegada de sangre a la zona. Las prostaglandinas constituyen una familia muy grande de mediadores celulares que intervienen en diversos procesos celulares como vasodilatador, broncoconstrictor y dilatador, contracción uterina y del estómago, aumento de la temperatura, entre otros. Y por último están los tromboxanos cuya función principal es la de mantener la homeostasia regulando la coagulación y la agregación plaquetaria (Nelson & Cox, 2001).

También se ha establecido que se debe mantener un correcto balance en la ingesta de PUFAs ω -3 y ω -6. El ácido linoléico y el α -linolénico no son interconvertibles y compiten por la desaturasa Δ 6 en la síntesis de AA, EPA y DHA. Debido a esto se ha detectado que desbalances tienen efectos negativos sobre la salud. Antropológicamente se determinó que la relación sobre la cual evolucionamos fue de 1:1. Sin embargo, un aumento en esta relación se ha observado en un gran número de enfermedades. Por ejemplo, un desbalance en la proporción puede promover la demencia, ya que se sabe que los ω -6 "endurecen" las membranas de las neuronas impidiéndoles moverse fluidamente como lo harían en caso de contener altos niveles de ω -3. La Psoriasis es una enfermedad de la piel que se caracteriza por la presencia de

altas concentraciones de AA en las placas y un cambio en el metabolismo de los eicosanoides generando una sobreproducción de agentes pro-inflamatorios. También se ha visto que una relación de 4:1 o menos reduce en un 70% los riesgos de accidentes cardiovasculares. Un nivel de 2.5:1 reduce la proliferación de células cancerígenas en el cáncer colon-rectal, y una relación de 2-3:1 reduce la inflamación en pacientes con artritis reumatoidea (Bergé & Barnathan, 2005) (Beltrán *et al*, 2010).

Como se comentó previamente, los ácidos grasos poliinsaturados del tipo ω -3 y ω -6 son esenciales al ser humano y necesitan ser adquiridos mediante alimentos ricos en ellos. Debido a la importancia de los ácidos ω 3, actualmente muchos suplementos derivados de aceites de pescado son utilizados en productos alimenticios, nutracéuticos y terapéuticos (Russell & Nichols, 1999). Sin embargo, en función de que los peces, principal fuente de estos ácidos en la actualidad, presentan una reducción poblacional mundialmente reconocida, y a que pueden contener elevados niveles de metales pesados como cobre y mercurio y contaminantes orgánicos como PCBs y dioxinas, se ha empezado a buscar fuentes alternativas para su producción (Beltrán *et al*, 2010). Una de las alternativas consideradas es la acuicultura, pero los peces no pueden sintetizarlos "de novo", solo los acumulan. En esta situación, persiste la demanda de ácidos grasos ω -3 para ser utilizados como suplementos alimenticios de los peces (Singh & Petrie, 2011). Otras alternativas son la producción mediante fitoplancton, microalgas, algas marinas, bacterias, levaduras y microorganismos transgénicos. Las microalgas (que incluyen al fitoplancton), son la fuente primaria de la cadena alimenticia marina. Estos producen principalmente los ácidos linoléico y α -linolénico. Como beneficios en comparación con los peces, se encuentra que son más fácilmente cultivables y no dependen de la estación del año, el producto no tiene olor ni sabor característicos del aceite de pescado y tampoco contienen colesterol. Como desventaja se deben utilizar enormes volúmenes de agua para su cultivo, por lo que el costo de la cosecha puede representar el 33% del precio del producto. (Shene *et al*, 2006) (Singh & Petrie, 2011). También se están evaluando bacterias y hongos como fuentes de PUFAS ya que su producción a nivel industrial puede resultar más sencilla y económica. Además, estos microorganismo producen un único o unos pocos tipos de PUFAs a diferencia de los peces o algas que acumulan un mezcla compleja que luego dificulta y encarece los costos de purificación. Algunos de los microorganismos evaluados pertenecen al género: *Shewanella*, *Colwellia*, *Moritella*, *Psychromonas*, *Psychroflexus*, *Photobacterium*, *Mortierella*, *Mucor* y *Pythium* (Hinzpeter *et al*, 2006)

Objetivos

Objetivo general:

Identificar y caracterizar levaduras marinas procedentes de la Antártica como posibles productoras de enzimas y/o ácidos grasos esenciales.

Objetivos específicos:

- Identificar 14 cepas de levaduras mediante secuenciación del ADNr 18S y la región ITS.
- Analizar la capacidad de las cepas de producir enzimas y ácidos grasos esenciales.
- Evaluar el comportamiento de las levaduras en función de la temperatura de cultivo.

Materiales y métodos

1. Origen de las muestras

Se cultivaron cepas de levaduras marinas aisladas de la isla Rey Jorge (Antártida) identificadas como T1, T2...T14, que fueron recuperadas de cultivos stock de la colección de cepas del Departamento de Bioingeniería y Micología de Facultad de Ingeniería. Estas cepas provienen de la recolección de muestras realizada en la campaña antártica de febrero de 2010. Se colectaron, utilizando condiciones asépticas, a partir de muestras de agua de mar y algas marinas en la orilla del mar, en la Bahía Collins, en la Bahía Maxwell y en el Mar de Drake. Para el aislamiento se utilizó el medio marino 2216 adicionado con antibióticos, (penicilina/estreptomicina, 250 mg/l). Los microorganismos se purificaron por sucesivos repiques utilizando el medio B (extracto de levadura 2g/l, peptona 2 g/l, agar 10 g/l, en agua de mar al 70 % y con la adición de Estreptomicina y Penicilina G (300 mg/l de cada uno)) recomendado por Hinzpeter (2008) e incubándolos a 4°C.

2. Evaluación de la concentración salina sobre el crecimiento

Se estudió el efecto de la concentración de sales marinas sobre el crecimiento de las cepas T4, T5, T7, T9 y T14. Los ensayos se realizan en placa por duplicado en medio YM Agar compuesto por glucosa 10g/l, extracto de levadura 3g/l, peptona 5g/l, extracto de malta 3g/l, pH 6.2, con la adición de 30, 20, 10 y 0g/l de sales marinas y se cultivaron a 25°C durante 5 días.

3. Identificación Genética

Se cultivaron las 14 cepas en placa a temperatura ambiente en medio B. Suplantando el agua de mar con la adición de 30 g/l de sales marinas (Sigma-Aldrich; MO, USA). Se dejaron crecer entre 5-7 días. Con la biomasa correspondiente a 1 o 2 placas, se procedió a la extracción del ADN genómico utilizando el kit AxyPrep Multisource Genomic DNA miniprep (Axygen Biociencias; NY, USA) según las instrucciones del fabricante, excepto por la interrupción mecánica, que se realizó por fricción con mortero y mano durante 1 minuto en lugar de nitrógeno líquido. Los cebadores utilizados para la amplificación de la región rADN 18S e ITS fueron los citados en la tabla 1, y la posición en la secuencia del rARN se puede observar en la figura 7.

Tabla 1. Secuencias de cebadores para la región 18S e ITS del rADN. Cada par está compuesto por el "forward" y "reverse" respectivamente según (White *et al*, 1990).

Nombre	Secuencia (5' a 3')	
NS1	GTA GTC ATA TGC TTG TCT C	F
NS	CTT CCG TCA ATT CCT TTA AG	R
NS3	GCA AGT CTG GTG CCA GCA GCC	F
NS8	TCC GCA GGT TCA CCT ACG GA	R
ITS1	TCC GTA GGT GAA CCT GCG G	F
ITS4	TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC	R

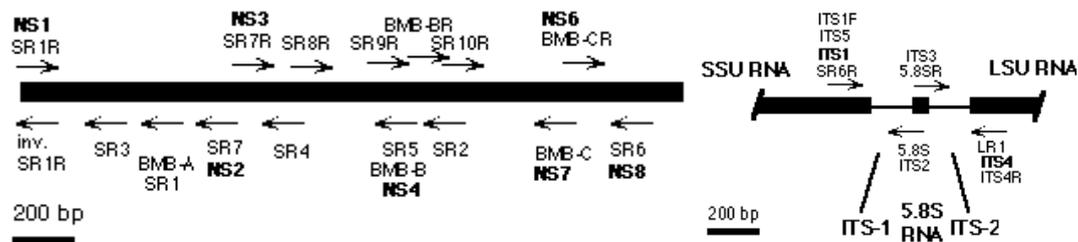


Figura 7. Región 18S e ITS del rARN. La región 18S se amplificó utilizando los primers NS1 y NS8. La región ITS se amplificó con los primers ITS1 e ITS4. (NS similar a BMB-B) (White *et al*, 1990)

La mezcla de PCR para las ampliaciones consistió en: taq Buffer 10x (Fermentas) 5µl, dNTP's 5µl (Fermentas), MgCl₂ (50mM) 1.5µl (Invitrogen), primers 1µl c/u (Alpha DNA, Canada), Taq 5u/µl (Sbs Genetech Co. Ltd., China) 0.5µl, gADN 4.0µl y agua hasta un volumen final de 50µl. La amplificación se realizó en un equipo Palm-Cycler™ (Corbett Research, UK Ltd). Inicialmente se realizó un gradiente para determinar la temperatura óptima de amplificación. Se realizaron 5 ampliaciones para cada cepa las cuales consistieron, en una etapa de desnaturalización inicial a 94°C durante 3 min, una etapa de 35 ciclos de: desnaturalización durante 30s, hibridación de entre 40/50°C (en intervalos de 2°C) durante 45 seg, extensión a 72°C durante 1min, y una extensión final de 5min a 72°C. La temperatura óptima de hibridación y la verificación de la amplificación se determinó cualitativamente mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% en TBE 1x con bromuro de etidio (0.05ul/ml). Se secuenció una única hebra del producto de amplificación de cada juego de cebadores en un secuenciador automático ABI 3730 XL (Applied Biosystems, USA) (Macrogen, Korea). Las secuencias obtenidas fueron comparadas con secuencias nucleotídicas similares almacenadas en GeneBank (Benson *et al*, 2005) mediante el algoritmo BLAST (Altschul *et al.*, 1997). Y fueron comparadas y alineadas mediante ClustalW (Thompson *et al*, 1994). Una relación filogenética fue generada a partir de estos datos utilizando el modelo de Neighbor-Joining (Saitou & Nei, 1987) con una evaluación de la significancia estadística mediante el método de bootstrap aplicando 10.000 iteraciones (Felsenstein, 1985). Todos los cálculos y análisis se realizaron usando el software *Molecular Evolutionary Genetics Analysis* (MEGA 5.05) (Tamura *et al*, 2011).

4. Ensayos enzimáticos

A 5 cepas identificadas como pertenecientes a diferentes géneros (T4, T5, T7, T9 y T14) se les analizó la capacidad de producir exoenzimas. Se determinaron las siguientes actividades enzimáticas: amilolítica, celulolítica, xilanolítica, ligninolítica, proteolítica (con caseína y gelatina como sustrato) y lipolítica (con Tween 80 y tributirina como sustrato). Los ensayos se realizaron en placa por triplicado, en medio de cultivo adicionado con el sustrato de cada enzima (Anexo II), a 4, 10, 15, 20 y 25°C. La actividad enzimática se manifiesta por la aparición de un halo y se evaluó por medición del diámetro del mismo.

5. Determinación del perfil de ácidos grasos

El perfil de ácidos grasos se determinó para las cepas T4, T5, T7, T9 y T14. Para la extracción, se partió de 1g de biomasa húmeda crecida en medio líquido a 25°C conteniendo glucosa 30g/l, extracto de levadura 10g/l, sales marinas 10g/l, adaptado de Gupta *et al* (2012), y obtenida

por centrifugación a 3000rpm por 10 min; mezclándose con 15ml de metanol:cloroformo (2:1) y 2 cm³ de perlitas de vidrio para facilitar la ruptura celular. Esta mezcla se homogenizó durante 1min. en vortex y 30min. en shaker. Posteriormente se agregaron 4ml de K₂HPO₄ 0.05M. Se separa la capa orgánica centrifugando la mezcla durante 10 min a 3000rpm. Por último, se llevó a sequedad en baño húmedo a 50-55° con N₂ para evitar la oxidación de los ac. grasos.

Para la transesterificación, se agregan 2ml de solución metanólica NaOH 0.5N y N₂, se cerró herméticamente y se calentó en baño seco durante 10min a 100°C. Posteriormente se agregaron 2ml de solución metanólica de BF₃ y se calentó a 100°C durante 5min. Por último, se agregó 2ml de hexano, 2ml de solución de NaCl saturada y se centrifugó durante 10min a 3000rpm. Se separó la fase orgánica (superior) la cual contiene los esteres metílicos. Las muestras se inyectaron en un cromatógrafo de gases GC-MS-QP 2010 Ultra con inyector automático AOC-20i (Shimadzu Corporation), utilizando una columna DB-WAX (30m x 0.25mm x 0.25µm. Agilent J&W GC Columns) y el programa de temperaturas de 3min a 160°C inicial, con incrementos de 7°C/min hasta 220°C en 7min y hasta 240°C con 3.6°C/min en 10min. La temperatura del inyector, fuente de ionización e interface fue de 250°C. El voltaje de la fuente de ionización fue de 70KeV para detectar en un rango de 35-500m/z. Determinaciones cromatográficas realizadas por el Lic. Manuel Minteguiaga Carbajal (Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable).

6. Evaluación de la formación de vesículas acumuladoras de lípidos

Para evaluar la formación de vesículas lipídicas presentes en las cepas T4, T5, T7, T9 y T14 se realizó la tinción de negro sudan.

7. Determinación de la temperatura óptima de crecimiento

Se determinó la temperatura óptima de crecimiento de 4 cepas, T4, T5, T9 y T14. Se cultivaron a 10, 15, 20 y 25°C cada una, en caldo YM por triplicado con el agregado de 10g/l de sales marinas. A partir de un inóculo desarrollado en 100ml del mismo medio de cultivo en erlenmeyer de 1000ml, crecido durante 24-48h, se transfirió el volumen necesario para inocular entre 0.2 y 0.5g/l de biomasa de la respectiva cepa a cada erlenmeyer de 250ml que contenía 70ml de medio de cultivo. Se midió la densidad óptica (D.O.) a 600nm cada 3-4 horas y el perfil de ac. grasos al final de cada ensayo. Se calculó la tasa específica máxima de crecimiento (μ_{max}) para cada triplicado a cada temperatura. Se evaluaron los datos realizándose un análisis de varianza (ANOVA) con comparación de medias (test de Tukey) a un nivel de significancia del 0.05. Estos análisis se realizaron utilizando el software InfoStat (Di Rienzo *et al*, 2014).

Resultados y discusión

Se evaluó el efecto de la concentración de sales marinas sobre el crecimiento de las cepas T4, T5, T7, T9 y T14 dado que son aislados del mar y podrían presentar exigencias particulares sobre las mismas. Si bien el agua marina contiene una concentración de sales de aproximadamente 30g/l, a las diferentes concentraciones de sales ensayadas (0, 10, 20 y 30g/l) no se detectaron efectos sobre el crecimiento (figura 8). Por lo tanto se podría afirmar que

estos microorganismos son halotolerantes. Y por su procedencia se determina la adición de 10g/l de sales marinas en los diferentes medios ensayados para su cultivo *in vitro*.



Figura 8. Crecimiento de las cepas T4, T5, T7, T9 y T14 a 0 y 1% (arriba), 2 y 3% (abajo) de NaCl a 25°C

Características morfológicas de los aislados antárticos marinos

Se adjunta en la tabla 2 la determinación de las características morfológicas por microscopía óptica de las 14 cepas, cultivadas en medio B (Hinzpeter, 2008) a 25° C. Mediante técnica de lamina-laminilla y con un aumento de 400x.

Tabla 2. Características morfológicas de las 14 cepas (ver anexo V)

Muestra	Características microscópicas			Características macroscópicas	
	Ancho (um)	Largo (um)	Forma	Coloración de colonia	Forma de colonia
T1	0.5-2	0.5-2	Esférica	Blanco	Convexas y circulares
T2	0.5-2	0.5-2	Esférica	Amarillo claro	Convexas y circulares
T3	1-2	1-2	Esférica y ovalada	Blanco	Convexas y circulares
T4	0.5-1.5	0.5-1.5	Esférica y ovalada	Amarillo claro	Convexas y circulares
T5	0.5-2	0.5-2	Esférica	Blanco	Convexas y circulares
T6	0.5-1	0.5-1	Esférica	Blanco	Convexas y circulares
T7	0.5-1	0.5-1	Esférica	Blanco	Convexas y circulares
T8	1-3	1-3	Esférica y ovalada	Blanco	Convexas y circulares
T9	1-2	1-2	Esférica y ovalada	Rosada	Convexas y circulares
T10	0.5-2	0.5-2	Esférica	Blanco	Convexas y circulares
T11	0.5-2	0.5-2	Esférica	Blanco	Convexas y circulares
T12	0.5-2	0.5-2	Esférica	Blanco	Convexas y circulares
T13	0.5-2	0.5-2	Esférica	Blanco	Convexas y circulares
T14	0.5-2	0.5-2	Esférica	Amarillo claro	Convexas y circulares

Análisis de secuencias e identificación filogenética

Mediante electroforesis en gel se verificó la amplificación de los segmentos del rADN 18S e ITS, y que la temperatura óptima de hibridación en el gradiente fue de 45°C para todas las cepas (figura 9).

De la comparación de secuencias de la región 18S del rADN, los 14 aislados antárticos pertenecerían a 5 géneros diferentes (Tabla 3) y se seleccionó 1 de cada género para verificar su identidad mediante la secuenciación de la región ITS (Tabla 4).

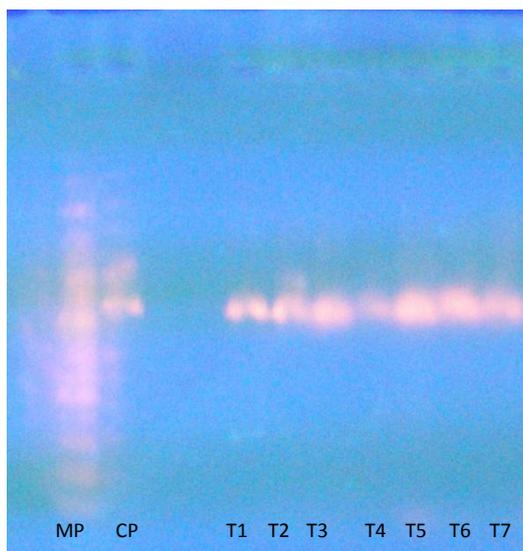


Figura 9. Verificación en gel 1% agarosa en TBE de la amplificación a 45°C. De izq-der: Marcador molecular, control positivo y muestras T1 a T7

Tabla 3. Resultado de la comparación de secuencias mediante BLAST para cada cepa y par de primers para la región 18S rADN. En todos los casos el valor esperado "E" estuvo por debajo de 1e-50.

Cepa	Primers	Microorganismo registrado en el NCBI	Score	Identidad	Gap's	Primers	Microorganismo registrado en el NCBI	Score	Identidad	Gap's
T1	NS1	<i>Metschnikowia bicuspidata</i>	1221 (635)	935/1020 (92%)	32/1020 (3%)	NS8	<i>Metschnikowia australis</i>	1863 (969)	1005/1013 (99%)	4/1013 (0%)
		<i>Metschnikowia bicuspidata</i>	1221 (635)	935/1020 (92%)	32/1020 (3%)		<i>Metschnikowia bicuspidata</i>	1829 (951)	997/1010 (99%)	4/1010 (0%)
		<i>Metschnikowia australis</i>	1202 (625)	935/1020 (92%)	36/1020 (3%)		<i>Metschnikowia zobellii</i>	1781 (926)	988/1009 (98%)	4/1009 (0%)
T2	NS1	<i>Hannaella luteola</i>	1590 (827)	888/901 (99%)	9/901 (0%)	NS8	<i>Bullera kunmingensis</i>	1615 (840)	923/942 (98%)	12/942 (1%)
		<i>Cryptococcus zeae</i>	1584 (824)	887/901 (98%)	9/901 (0%)		<i>Hannaella luteola</i>	1615 (840)	923/942 (98%)	12/942 (1%)
		<i>Bullera sinensis var. lactis</i>	1573 (818)	885/901 (98%)	9/901 (0%)		<i>Cryptococcus zeae</i>	1609 (837)	922/942 (98%)	12/942 (1%)
T3	NS1	<i>Metschnikowia australis</i>	1508 (784)	833/845 (99%)	5/845 (0%)	NS8	<i>Metschnikowia australis</i>	1669 (868)	980/1011 (97%)	10/1011 (0%)
		<i>Metschnikowia bicuspidata</i>	1471 (765)	831/849 (98%)	9/849 (1%)		<i>Metschnikowia bicuspidata</i>	1642 (854)	976/1012 (96%)	10/1012 (0%)
		<i>Metschnikowia zobellii</i>	1446 (752)	824/845 (98%)	6/845 (0%)		<i>Metschnikowia zobellii</i>	1592 (828)	937/974 (96%)	7/974 (0%)
T4	NS1	<i>Bullera sp.</i>	1523 (792)	894/915 (98%)	12/915 (1%)	NS8	<i>Cryptococcus sp</i>	1648 (857)	916/928 (99%)	8/928 (0%)
		<i>Cryptococcus sp</i>	1517 (789)	893/915 (98%)	12/915 (1%)		<i>Cryptococcus laurentii</i>	1642 (854)	915/928 (99%)	8/928 (0%)
		<i>Papiliotrema bandonii strain</i>	1500 (780)	890/915 (97%)	12/915 (1%)		<i>Cryptococcus cellulolyticus</i>	1642 (854)	915/928 (99%)	8/928 (0%)

		CBS9107								
T5	NS1	<i>Metschnikowia australis</i>	1567 (815)	861/869 (99%)	6/869 (0%)	NS8	-	-	-	-
		<i>Metschnikowia bicuspidata</i>	1531 (796)	859/873 (98%)	10/873 (1%)		-	-	-	-
		<i>Metschnikowia zobellii</i>	1506 (783)	852/869 (98%)	7/869 (0%)		-	-	-	-
T6	NS1	<i>Debaryomyces hansenii</i>	1704 (886)	974/998 (98%)	8/998 (0%)	NS8	-	-	-	-
		<i>Debaryomyces hansenii</i>	1704 (886)	974/998 (98%)	8/998 (0%)		-	-	-	-
		<i>Debaryomyces hansenii</i> strain ATCC 60978	1704 (886)	974/998 (98%)	8/998 (0%)		-	-	-	-
T7	NS1	<i>Debaryomyces hansenii</i>	1998 (1039)	1062/1066 (99%)	3/1066 (0%)	NS8	<i>Debaryomyces hansenii</i>	1619 (842)	895/904 (99%)	7/904 (0%)
		<i>Debaryomyces</i> sp. NCAIM	1998 (1039)	1062/1066 (99%)	3/1066 (0%)		<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1619 (842)	895/904 (99%)	7/904 (0%)
		<i>Debaryomyces hansenii</i> strain ATCC 60978	1998 (1039)	1062/1066 (99%)	3/1066 (0%)		<i>Debaryomyces hansenii</i> strain ATCC 60978	1619 (842)	895/904 (99%)	7/904 (0%)
T8	NS1	-	-	-	-	NS8	-	-	-	-
		-	-	-	-		-	-	-	-
		-	-	-	-		-	-	-	-
T9	NS1	<i>Rhodotorula pinicola</i>	1315 (684)	776/797 (97%)	10/797 (1%)	NS8	-	-	-	-
		<i>Rhodotorula laryngis</i>	1310 (681)	775/797 (97%)	10/797 (1%)		-	-	-	-
		<i>Rhodotorula lysiniphila</i>	1298 (675)	773/797 (97%)	10/797 (1%)		-	-	-	-
T10	NS1	<i>Metschnikowia australis</i>	1659 (863)	957/979 (98%)	10/979 (1%)	NS8	<i>Metschnikowia australis</i>	1558 (810)	882/898 (98%)	9/898 (1%)
		<i>Metschnikowia bicuspidata</i>	1623 (844)	955/983 (97%)	14/983 (1%)		<i>Metschnikowia bicuspidata</i>	1529 (795)	877/898 (98%)	9/898 (1%)
		<i>Metschnikowia zobellii</i>	1592 (828)	947/979 (97%)	11/979 (1%)		<i>Metschnikowia zobellii</i>	1448 (774)	870/898 (97%)	9/898 (1%)
T11	NS1	<i>Metschnikowia australis</i>	1573 (818)	869/877 (99%)	8/877 (1%)	NS8	<i>Metschnikowia australis</i>	1161 (604)	837/901 (93%)	23/901 (2%)
		<i>Metschnikowia bicuspidata</i>	1536 (799)	867/881 (98%)	12/881 (1%)		<i>Metschnikowia bicuspidata</i>	1133 (589)	832/901 (92%)	23/901 (2%)
		<i>Metschnikowia zobellii</i>	1511 (786)	860/877 (98%)	9/877 (1%)		<i>Metschnikowia zobellii</i>	1113 (579)	815/883 (92%)	21/883 (2%)
T12	NS1	<i>Metschnikowia australis</i>	1442 (750)	905/930 (97%)	22/930 (2%)	NS8	<i>Metschnikowia australis</i>	1667 (867)	914/925 (99%)	5/925 (0%)
		<i>Metschnikowia bicuspidata</i>	1425 (741)	904/933 (97%)	24/933 (2%)		<i>Metschnikowia bicuspidata</i>	1638 (852)	909/925 (98%)	5/925 (0%)
		<i>Metschnikowia zobellii</i>	1386 (721)	897/930 (96%)	23/930 (2%)		<i>Metschnikowia zobellii</i>	1598 (831)	902/925 (98%)	5/925 (0%)
T13	NS1	<i>Uncultured basidiomycete</i>	154 (80)	317/423 (75%)	6/423 (1%)	NS8	-	-	-	-
		<i>Uncultured Filobasidium</i>	142 (74)	315/423 (74%)	7/423 (1%)		-	-	-	-
		<i>Cf. Cryptococcus sp.</i>	142 (74)	315/423 (74%)	7/423 (1%)		-	-	-	-
T14	NS1	<i>Filobasidium elegans</i>	1806 (939)	1030/1048 (98%)	12/1048 (1%)	NS8	<i>Filobasidium globisporum</i>	1694 (881)	954/978 (98%)	5/978 (0%)
		<i>Cryptococcus magnus</i>	1806 (939)	1030/1048 (98%)	12/1048 (1%)		<i>Filobasidium elegans</i>	1694 (881)	954/978 (98%)	5/978 (0%)
		<i>Filobasidium floriforme</i>	1806 (939)	1030/1048 (98%)	12/1048 (1%)		<i>Cryptococcus magnus</i>	1694 (881)	954/978 (98%)	5/978 (0%)

Tabla 4. Resultado de la identificación mediante BLAST para cada cepa para la región ITS del rADN. En todos los casos el valor esperado "E" estuvo por debajo de 1e-50.

Cepa	Primer	Microorganismo identificado mediante BLAST	Score	Identidad	Gap's
T2	ITS4	<i>Cryptococcus luteolus</i>	740 (385)	428/442 (97%)	3/442 (0%)
		<i>Cryptococcus luteolus</i> ATCC:32044	733 (381)	408/419 (97%)	1/419 (0%)
		<i>Cryptococcus luteolus</i>	731 (380)	407/418 (97%)	1/418 (0%)
T4	ITS4	<i>Cryptococcus cf. cellulolyticus</i>	958 (498)	502/504 (99%)	0/504 (0%)
		<i>Bullera aff. pseudoalba</i>	942 (490)	503/507 (99%)	1/507 (0%)
		<i>Cryptococcus anemochorus</i>	792 (412)	483/511 (95%)	4/511 (0%)
T5	ITS4	<i>Metschnikowia australis</i>	614 (319)	328/330 (99%)	1/330 (0%)
		<i>Metschnikowia bicuspidata</i>	410 (213)	311/345 (90%)	6/345 (1%)
		<i>Metschnikowia reukaufii</i> . Strain CBS 5834	327 (170)	211/229 (92%)	2/229 (2%)
T7	ITS4	<i>Debaryomyces hansennii</i>	1165 (606)	608/609 (99%)	0/609 (0%)
		<i>Debaryomyces hansenii</i> strain ATCC 60978	1158 (602)	602/602 (100%)	0/602 (0%)
		<i>Debaryomyces fabryi</i>	1152 (599)	601/602 (99%)	0/602 (0%)
T9	ITS4	<i>Rhodotorula sp.</i>	1050 (546)	559/563 (99%)	1/563 (0%)
		<i>Rhodotorula laryngis</i> strain CBS2221	1017 (529)	540/543 (99%)	1/543 (0%)
		<i>Rhodotorula laryngis</i> strain CBS5695	1002 (521)	539/543 (99%)	2/543 (0%)
T13	ITS4	<i>Cryptococcus magnus</i> culture-collection UOA/HCPF:12688B ⁱⁱ	1121 (583)	606/610 (99%)	3/610 (0%)
		<i>Cryptococcus sp.</i>	1115 (580)	605/610 (99%)	3/610 (0%)
		<i>Cryptococcus magnus</i> strain CBS4685	1085 (564)	585/588 (99%)	3/588 (0%)
T14	ITS4	<i>Cryptococcus magnus</i> culture-collection UOA/HCPF:12688B	1133 (589)	596/597 (99%)	1/597 (0%)
		<i>Cryptococcus sp.</i>	1127 (586)	595/597 (99%)	1/597 (0%)
		<i>Cryptococcus magnus</i> strain CBS4685	1115 (580)	587/588 (99%)	1/588 (0%)

Los resultados presentados del blast para la región 18S e ITS del rADN se generaron utilizando, para cada una de las secuencias problema, las 2 primeras secuencias de especies diferentes con mejor score y una tercer secuencia de un microorganismo identificado a nivel de especie depositado en una colección. Si este no se encontrase, se eligió otra especie relacionada con un menor valor de score.

Se utilizó la región 18S a modo de identificación primaria (screening) y la región ITS a modo de verificación.

La generación de un árbol filogenético con los resultados de las tablas 3 y 4 permitió verificar los alineamiento y la relación entre las especies aisladas. Se generó un árbol para cada segmento secuenciado (Figuras 8, 9 y 10). En cada uno de ellos se puede observar que el

ⁱⁱ UOA/HCPF: University of Athens/Hellenic Collection of Pathogenic Fungi

modelo resuelve claramente 2 grandes grupos que representan ascomicetes y basidiomicetes. Dentro de cada uno de ellos, se observan 2 clados representando los generos *Metschnikowia* y *Debaryomyces* dentro de los ascomicetes, y los generos *Cryptococcus* (en algunos casos en conjunto con *Bullera* y *Hanaella*) y *Rhodotorula* para los basidiomicetes. En todos los casos, los grupos se encuentran bien diferenciados de las ramas externas utilizadas.

De los resultados dentro de cada clado, se observa que las cepas T1, T3, T5, T10, T11 y T12 pertenecen al género *Metschnikowia*. El alineamiento local muestra altos valores de score y altos porcentajes de identidad (92-99%) en secuencias que superan los 900pb, y bajos valores de GAPs (0-4%) abarcando aproximadamente el 80% del largo total de la secuencia del 18S. En la verificación con ITS de T5 se observa que la diferencia entre los mejores resultados del alineamiento local difieren en un 9% de similitud. Esto podría indicar que, para este microorganismo en particular y al ser el segmento ITS muy informativo, la cepa T5 corresponda a *Metschnikowia australis*. Para la cepa T2 los resultados son variados. Para las secuencias de la región 18S se obtienen los generos *Hannaella*, *Bullera* y *Cryptococcus*. Esto tiene sentido, si se considera que todavía al día de hoy, se sigue intentando caracterizar y diferenciar molecularmente estos generos (Wang & Bai, 2008). Sin embargo, la verificación con las secuencia ITS reveló una alta similitud con la especie *Cryptococcus luteolus*, estando entre las comparadas una cepa de referencia (*Cryptococcus luteolus* ATCC:32044). A pesar de ello, por el porcentaje de similitud encontrado (97%) sería arriesgado proponer esta especie. Un estudio comparativo entre las características morfológicas, quimiotaxonómicas y de filogenia molecular será necesario para identificar plenamente este microorganismo. Situación similar sucede con la cepa T4, en la cual se obtienen los generos *Cryptococcus* y *Bullera* tanto para las regiones 18S e ITS. En este caso, si bien el género es el mismo que para T2, se obtienen especies distintas. Por lo tanto, también sería arriesgado aseverar la identificación a nivel de especie, pero es muy probable que tanto la cepa T2 como T4 pertenezcan al mismo género pero a diferentes especies. Para las cepas T6 y T7 se obtuvo la especie *Debaryomyces hansenii* (teleomorfo de *Candida famata*) (Sibirny & Voronovsky, 2009). En ambos casos con similitud de secuencias igual o mayor a 98% en 18S e ITS y estando entre las comparadas, la cepa de referencia *Debaryomyces hansenii* (strain ATCC 60978). Estos resultados permitirían determinar la pertenencia a esta especie de los microorganismos T6 y T7. Para la cepa T9 se obtuvo el genero *Rhodotorula* con 97% de identidad en la región 18S, y 99% para ITS. Sin embargo, varias especies surgen para este género con similares valores de score. Por lo que en principio, no sería posible resolver la cepa a nivel de especie. Por último, para la cepas T13 y T14 se obtuvieron los generos *Cryptococcus* y *Filobasidium*. En general se sabe que estos generos presentan similitudes en las regiones del rADN, por lo cual es lógico obtener estos resultados. Incluso, la especie *Filobasidium elegans* en realidad pertenecería o está muy relacionada con el género *Cryptococcus* (Kurtzman *et al*, 2011). También se sabe que la secuenciación con la región ITS separa estas 2 especies (Fell *et al*, 2000). Y efectivamente, en nuestro caso se reconoce únicamente a la especie *Cryptococcus magnus*, teniendo 2 cepas de referencias con un 99% de identidad (*Cryptococcus magnus* culture-collection UOA/HCPF:12688B y *Cryptococcus magnus* strain CBS4685). Por lo que sería posible afirmar que estos aislados (T13 y T14) corresponden con la especie *Cryptococcus magnus*. Para la cepa T8, si bien se logró verificar la amplificación mediante la electroforesis en gel, los resultados de la secuenciación no permitieron recuperar una secuencia lo suficientemente útil como para realizar una comparación con las bases de datos.

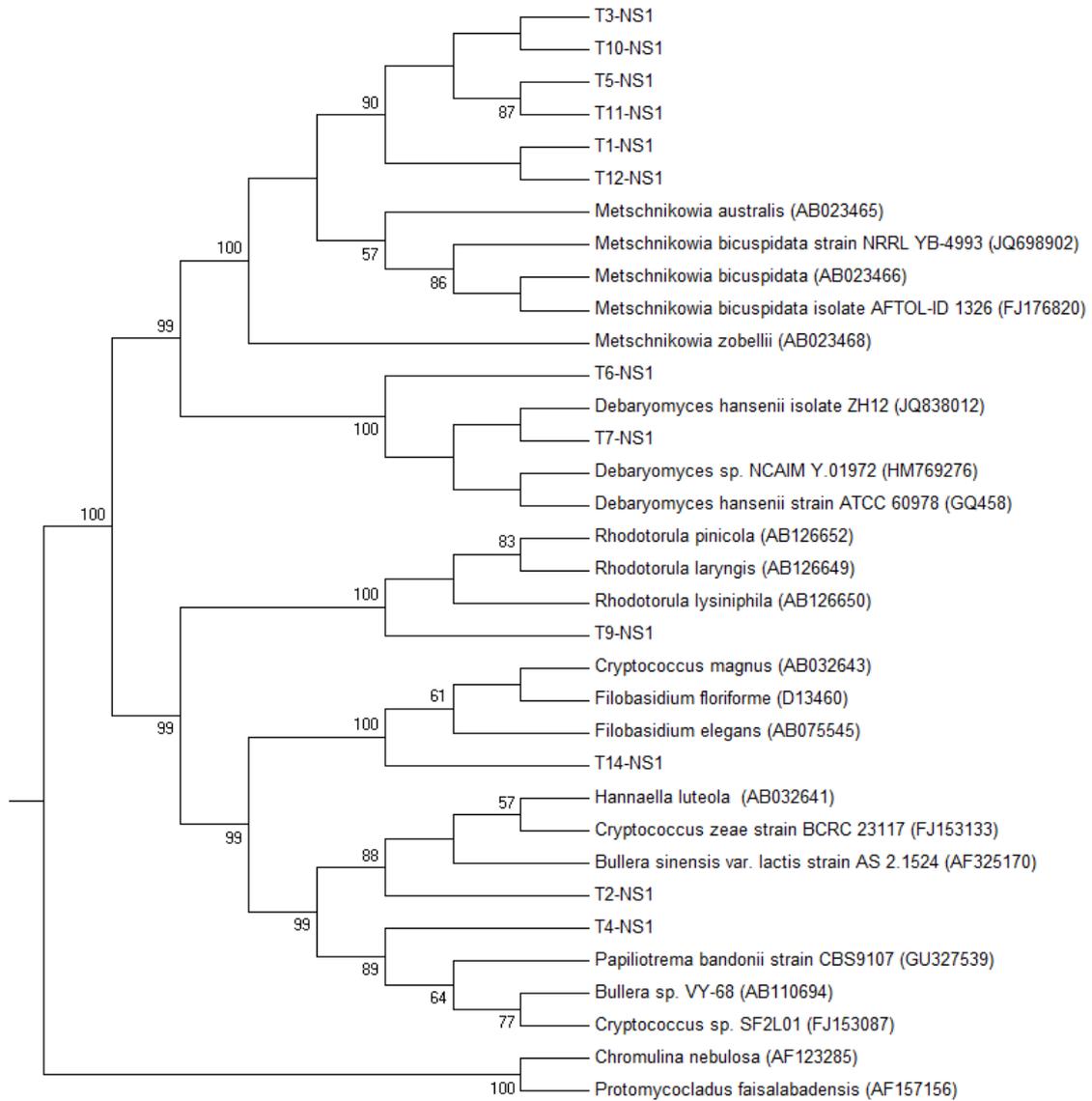


Figura 8. Árbol filogenético generado a partir de las secuencias NS1 de la región 18S rARN. El modelo se generó mediante Neibhor-joining. La significancia estadística se realizó mediante un análisis de bootstrap con 10.000 iteraciones. Los valores menores a 50% no se muestran. Entre paréntesis para cada microorganismo se encuentra el identificador en Genbank.

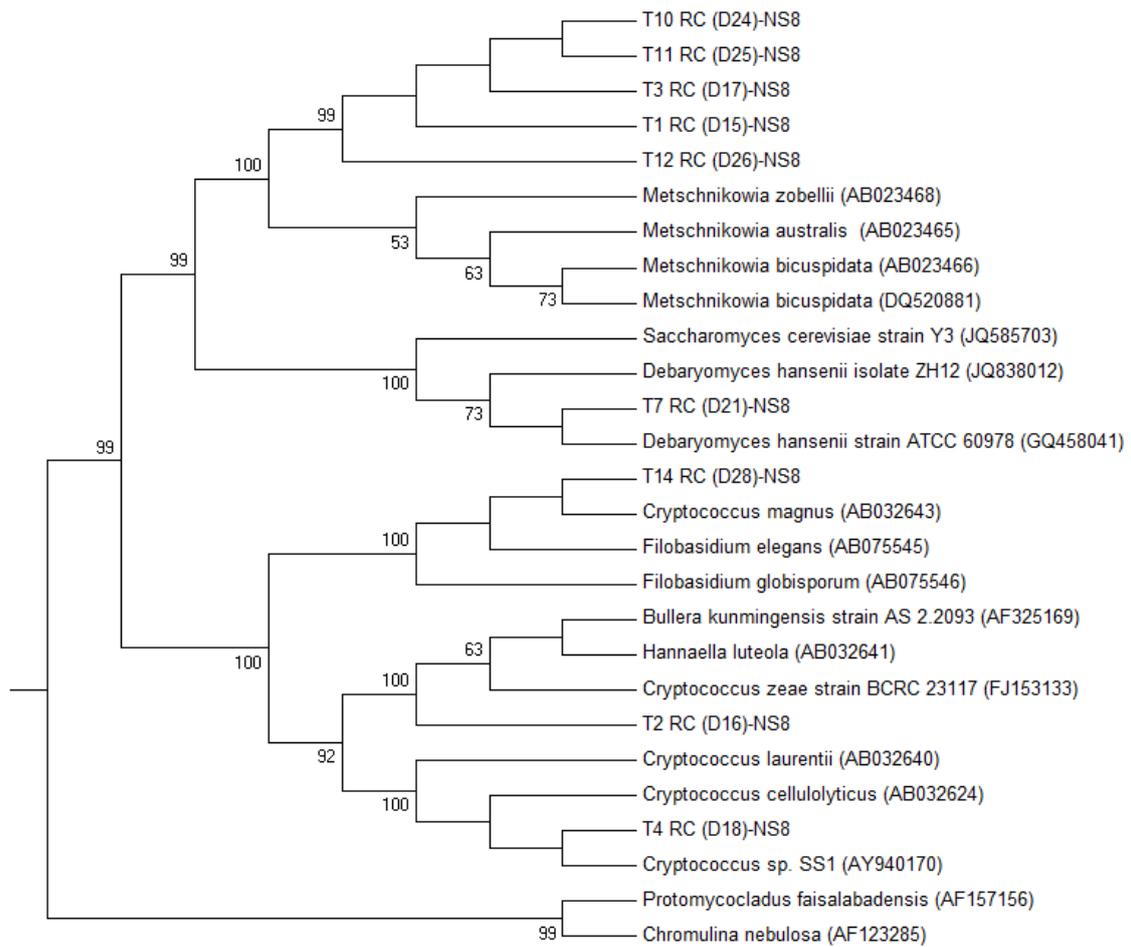


Figura 9. Árbol filogenético generado a partir de las secuencias NS8 de la región 18S rARN. El modelo se generó mediante Neighbour-joining. La significancia estadística se realizó mediante un análisis de bootstrap con 10.000 iteraciones. Los valores menores a 50% no se muestran. Entre paréntesis para cada microorganismo se encuentra el identificador en Genebank.

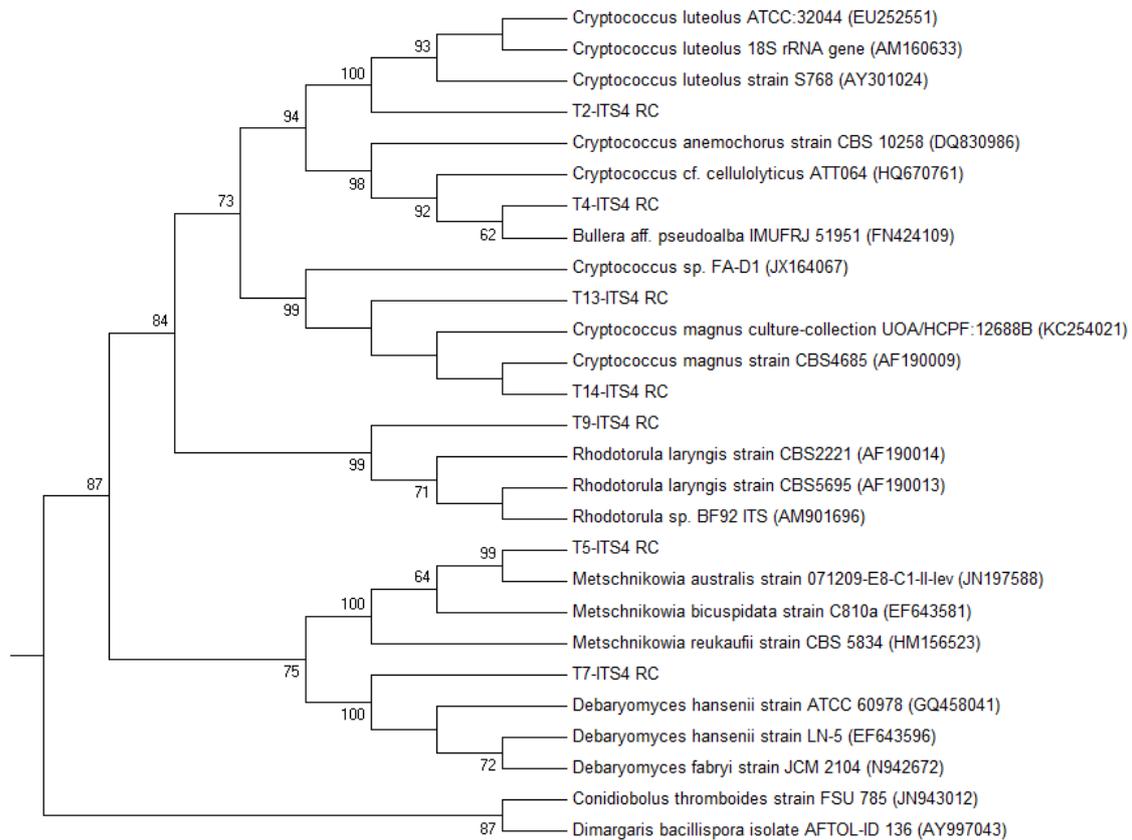


Figura 10. Árbol filogenético generado a partir de las secuencias ITS4 de la región ITS rARN. El modelo se generó mediante Neighbour-joining. La significancia estadística se realizó mediante un análisis de bootstrap con 10.000 iteraciones. Los valores menores a 50% no se muestran. Entre paréntesis para cada microorganismo se encuentra el identificador en Genbank.

En función de estos resultados se puede afirmar que los microorganismos aislados pertenecen a los géneros: *Metschnikowia*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces* y *Rhodotorula*, y que las cepas T4, T5, T7, T9 y T14 corresponden a especies diferentes: T4 *Cryptococcus* o *Bullera* sp., T5 *Metschnikowia australis*, T7 *Debaryomyces hansenii*, T9 *Rhodotorula* sp., T14 *Cryptococcus magnus*.

Ensayos enzimáticos

Se evaluó la capacidad de producción de enzimas extracelulares de los 5 aislados identificados como diferentes según los resultados de la identificación genética. Se encontraron cuatro actividades enzimáticas de las ocho ensayadas: amilolítica, xilanolítica, lipolítica (tween 80 y tributirina) (Tabla 5 y Figura 11).

La cepa T4 (*Cryptococcus* o *Bullera* sp.) presenta actividad lipolítica en el medio con Tween 80. La actividad se observa a todas las temperaturas evaluadas, incrementándose a medida que la temperatura aumenta. Sin embargo, en el medio con tributirina no hubo crecimiento (y por lo tanto no hubo actividad enzimática). Esta cepa también produce amilasas y xilanasas manifestándose su actividad a partir de los 15°C y 20°C respectivamente.

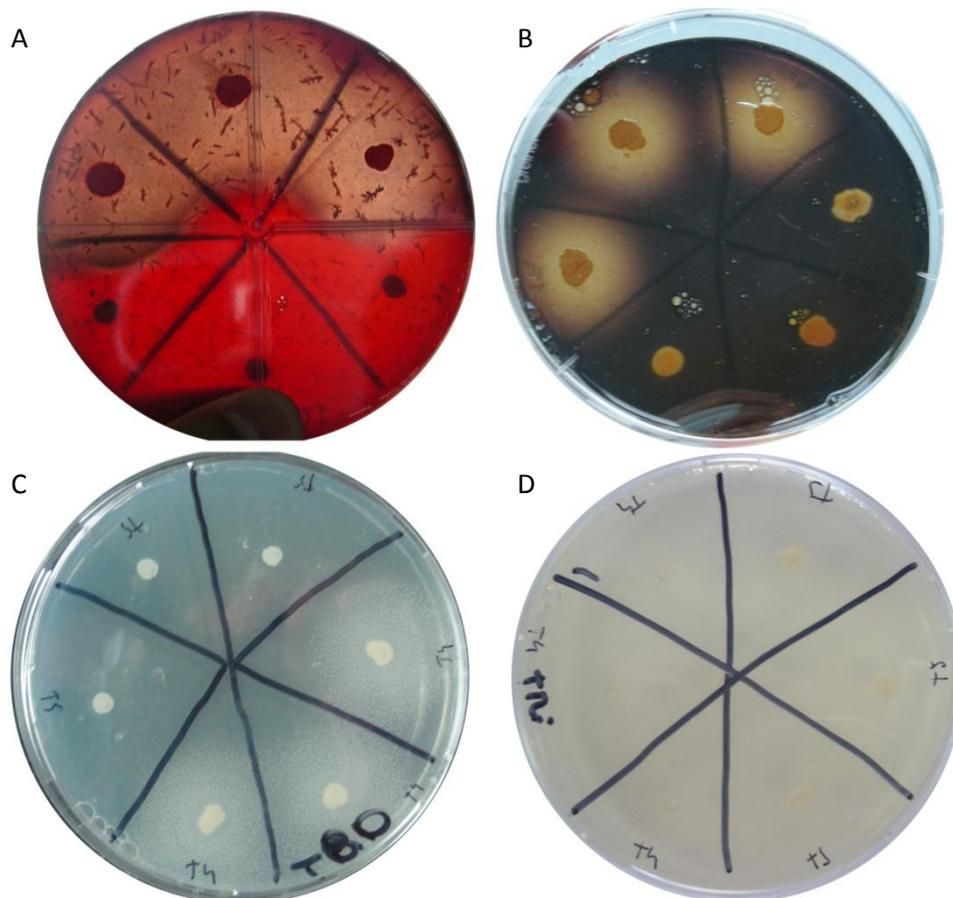


Figura 11. Halos generados por la degradación de sustratos. Actividad xilanolítica (A) y amilolítica (B), lipolítica: tween 80 (C) y tributirina (D).

Tabla 5. Actividad enzimática de las cepas a diferentes temperaturas. El valor reportado es el promedio de la diferencia entre la medida en mm del diámetro del halo generado por la degradación del sustrato y del diámetro de la colonia.

Tipo de ensayo	Temp. ensayo, °C.	Cepa T4	Cepa T5	Cepa T7	Cepa T9	Cepa T14
Lipolítica (Tween 80)	25	33.3	-	-	12.5	36.0
	20	30.0	-	-	22.6	38.6
	15	24.0	-	-	15.3	37.0
	10	26.0	-	-	16.6	33.3
	5	18.0	-	-	17.3	18.6
Lipolítica (Tributirina)	25	-	-	-	-	-
	20	-	-	-	-	-
	15	-	-	-	-	-
	10	-	-	-	-	-
	5	-	10.0	7.6	-	-
Amilolítica	25	7.0	-	-	12.0	26.6
	20	6.6	-	-	-	22.6
	15	5.3	-	-	-	25.3
	10	-	-	-	-	25.3
	5	-	-	-	-	12.0
Xilanolítica	25	42.6	-	-	-	43.3
	20	36.6	-	-	-	36.0
	15	-	-	-	-	-
	10	-	-	-	-	-
	5	-	-	-	-	-

Los ensayos se realizaron por triplicado. En anexo el valor de los triplicados. ("-") significa que no se detectó actividad enzimática)

Los ascomicetes T5 y T7, *Metschnikowia australis* y *Debaryomyces hansenii* respectivamente presentaron únicamente actividad lipolítica con tributirina como sustrato a 5°C a pesar de haber crecimiento a todas las temperaturas evaluadas. Otros estudios para las mismas especies y de origen antártico encontraron resultados diferentes, incluso entre sí. Por ejemplo, Vaca *et al* (2013) estudió 4 cepas de *M. australis* para evaluar la actividad en medio con 1% de tributirina a diferentes temperaturas. Una presentó actividad en un rango de temperaturas desde 4°C a 23°C, y otra presentó actividad únicamente a 23°C. Vaz *et al* (2011) encontró 2 cepas de *M. australis*, de las cuales una sola presentó actividad en tween 80 a 4°C, y 4 cepas de *D. hansenii* de las cuales dos presentaron actividad celulolítica a 4°C.

La cepa T9, *Rhodotorula sp.*, presentó actividad lipolítica con Tween 80 como sustrato en todo el rango de temperatura ensayado, siendo la mayor actividad a 20°C, también presentó actividad amilolítica a 25°C. Otros estudios en diferentes especies de este género también encontraron actividad lipolítica pero no amilolítica. Vaz *et al* (2011) aislaron 9 cepas de *Rhodotorula* de las cuales ninguna presentó actividad amilolítica y varias presentaron actividad lipolítica en tween 80. Estas cepas a diferencia de las estudiadas en este trabajo presentaron además actividad preotelítica, pectinolítica y celulolítica. Por otra parte, Vaca *et al* (2013) recuperaron una cepa de *R. pinicola* que presentó actividad lipolítica en tween 80 a 23°C, y no detectaron actividad proteolítica ni amilolítica a ninguna temperatura. Pathan *et al* (2010) recuperaron una cepa de *Rhodotorula muscorum*, que presentó actividad pectinolítica a 8 y 22°C, pero no presentó actividad lipolítica, amilolítica ni proteolítica a ninguna temperatura. La cepa T14, *Cryptococcus magnus*, presentó actividad lipolítica utilizando Tween 80 como sustrato en todo el rango de temperaturas evaluadas, siendo la mayor producción a 20°C. También tiene actividad amilolítica en todo el rango de temperaturas, si bien la mayor actividad se da a 25°C, la actividad en el rango de 10-25°C es similar. Esta cepa presenta también actividad xilanolítica a 20°C y 25°C grados. No se encontraron otros estudios sobre esta especie con respecto a la producción de enzimas extracelulares.

Las cepas de Ascomicetes (T5 y T7) y Basidiomicetes (T4, T9 y T14) presentan similitudes en la producción de enzimas entre los miembros de sus respectivos grupos filogenéticos. Tanto T5 como T7 presentan actividad lipolítica únicamente sobre tributirina a baja temperatura. Mientras que, T4, T9 y T14 presentan actividad amilolítica, xilanolítica y lipolítica (tween 80), aunque con cierta variación en los rangos de temperaturas observadas.

Evaluando a estas levaduras como potenciales productoras de enzimas, podemos decir que las especies de *Cryptococcus* presentaron elevada actividad lipolítica usando tween 80 como sustrato, siendo la actividad de T14 ligeramente superior a la de T4 y casi el doble respecto de T9 (*Rhodotorula sp.*). La producción de amilasas también es muy elevada en T14, siendo 3 veces superior a la correspondiente a T4 y manifestándose en un rango mayor de temperatura. La actividad xilanolítica se presenta en ambas cepas en las mismas temperaturas e iguales niveles de actividad.

No se observó actividad caseinolítica ni ligninolítica para ninguna de las cepas a pesar de haber crecimiento en todas las temperaturas evaluadas. No hubo crecimiento en los medios con carboximetil celulosa a ninguna temperatura para ninguna cepa. Tampoco hubo actividad gelatinasa, aunque si hubo crecimiento a 25, 20 y 15°C en todas las cepas.

Evaluación del perfil de ácidos grasos.

En la tabla 6 se presenta el perfil de ácidos grasos de las cepas. La identificación se realizó comparando los tiempos de retención de cada compuesto detectado con un estándar (FAME mix), con el cálculo del índice de retención lineal de Kovats (LRI) y con información de espectros similares en bibliotecas (NIST, Wiley)

Tabla 6. Perfil de ácidos grasos de las cepas, cultivadas a 15° C, obtenido por GC-MS.

tiempo de retención (min)	Compuesto	LRI	LRI FAME Mix	% Área T4	% Área T5	% Área T7	% Área T9	% Área T14
4,49	metil laurato (12:0)	1808	1807	NP	0,20	NP	NP	NP
6,78	metil miristato (14:0)	2008	2008	0,31	0,57	0,92	1,14	0,50
7,20	metil miristoleato (14:1)	2043	2049	NP	0,16	NP	NP	NP
8,06	metil pentadecanoato (15:0)	2112	2112	NP	0,26	0,32	0,85	0,33
9,36	metil palmitato (16:0)	2214	2215	21,74	21,17	20,85	12,04	13,83
9,72	metil palmitoleato (16:1)	2244	2244	0,90	7,71	3,18	2,20	1,10
10,64	metil margarato (17:0)	2317	2318	0,27	0,12	0,28	0,33	0,94
10,92	metil-10-Z-heptadecenoico (17:1)	2343	2343	0,17	1,83	0,58	2,42	2,27
11,90	metil estearato (18:0)	2417	2418	2,77	0,71	2,29	0,43	1,77
12,21	metil oleato (18:1)	2440	2441	53,17	29,5	55,57	59,25	67,51
12,29	metil elaidato (18:1)	2447	2441	0,20	0,16	0,42	0,14	NP
12,88	metil linoleato (18:2)	2491	2492	18,83	27,7	11,16	18,24	10,1
13,94	metil linolenato (18:3)	2556	2556	NP	5,97	3,22	1,64	0,33
15,57	metil-11-Z-eicosenoato (20:1)	2654	2654	NP	NP	NP	0,38	0,25

Para cada cepa se muestran el porcentaje presente de cada FAME. Se reportan los compuestos plenamente identificados. En anexo se encuentra la lista completa de los compuestos detectados para cada cepa.

LRI = Índice de retención lineal. NP = No presente

Básicamente son 3 los ácidos grasos mayoritarios que componen estas cepas. El ac. oleico es el que se encuentra en mayor proporción en todas las cepas. En T14 representa casi el 70% de todos los ácidos grasos extraídos. En el resto ocupa entre el 50%-60%, salvo en T5 donde representa el 30%. El ac. palmítico y el ac. linoléico (ω -6) son los otros dos ácidos grasos mayoritarios y sus porcentajes varían según la especie: en T5 y T9 se encuentra mayor cantidad de ac. linoléico (ω -6) con un 28% y 18% respectivamente. Mientras que en T4, T7 y T14 el ácido graso en mayor proporción luego del ac. oleico es el ac. palmítico con un 22%, 21% y 14% respectivamente. Estos 3 ácidos grasos constituyen entre el 78 y el 94%, según la cepa, del total de ácidos grasos determinados.

También se detectó ac. linolénico (ω -3 o ω -6) en T5, T7, T9 y T14, siendo en T5 en donde se encuentra en mayor proporción alcanzando un 6%.

Ninguna de las anteriores cepas presentó acúmulos o vesículas lipídicas al observarse al microscopio óptico con un aumento de 1000x utilizándose la tinción de negro sudan.

La cepa T5 *Metschnikowia australis* fue la que presentó los más altos valores de ácidos grasos esenciales: ac. linoléico (ω -6) 28% y ac. linolénico (ω -3 o ω -6) 6%. El contenido de ácidos grasos insaturados en los microorganismos puede variar en función de la temperatura en que se encuentren, por lo cual se seleccionó esta cepa para evaluar si su perfil lipídico variaba en

función de la temperatura y se la cultivó a 10,15,20 y 25°C. Los perfiles obtenidos se presentan en la tabla 7.

Tabla 7. Perfil de ácidos grasos de T5 en función de la temperatura.

Compuesto	Temperatura			
	25°C	20°C	15°C	10°C
C14:0	0,2	0,3	0,3	0,3
C15:0	0,2	0,2	0,1	0,0
C16:0	19,0	17,6	18,2	13,3
C16:1	1,9	2,4	2,6	1,4
No Id.	0,1	0,3	0,3	0,2
C17:0	0,7	0,4	0,3	0,0
C17:1	1,1	0,7	0,6	0,0
C18:0	4,4	4,0	3,9	2,7
C18:1	44,6	28,9	27,3	22,0
C18:2	22,6	38,2	38,5	35,0
No Id.	0,4	0,5	0,5	1,5
C18:3	4,9	6,4	7,3	23,7

Se muestran los porcentajes presentes de cada FAME según la temperatura evaluada.

Como se observa, existe un cambio en el perfil de ácidos grasos en función del cambio en la temperatura de cultivo. A 25°C los ácidos grasos saturados (Cx:0) ⁱⁱⁱ representan aproximadamente un 25% del total de ácidos grasos, mientras que mono o poliinsaturados (Cx:1, C18:2 y C18:3) representan el 75%. En cambio a 10°C esa proporción cambia a 16% y 82% respectivamente. El 2% restante corresponden al aumento de 2 ácidos grasos no identificados.

Asimismo, la proporción de los diferentes de ácidos grasos insaturados entre si también cambia. A 25°C los ácidos grasos monoinsaturados representan aproximadamente el 48%, el ac. linoléico el 23% y el ac. linolénico el 5%, mientras que a 10°C estas proporciones son de 23%, 35% y 24% respectivamente. Es decir, que al disminuir la temperatura disminuye la proporción de ácidos grasos monoinsaturados a la mitad y aumenta significativamente la proporción del ac. linoléico y el ac. linolénico.

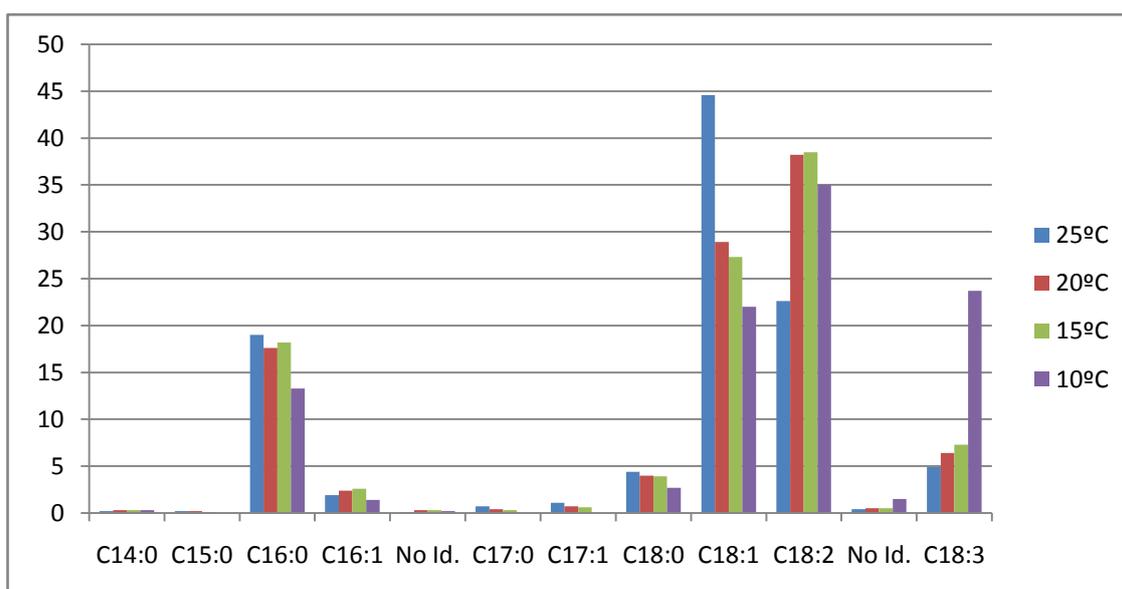


Figura 12. Comparación del perfil de ac. grasos obtenido para T5 a cada temperatura evaluada.

ⁱⁱⁱ Donde "x" representa el número de carbonos de la cadena.

También es interesante notar que el cambio de temperatura de 25°C a 20°C tiene un gran efecto sobre las proporciones de C18:1 y C18:2 presentes (Figura 12). En ambos casos el cambio de temperatura modifica las proporciones un 16%, aumentando el linoléico y disminuyendo el oleico. Si bien, hay modificaciones en el resto de los ácidos grasos son del entorno del 1%. Es decir, el microorganismo únicamente necesitaría modificar estos dos ácidos grasos para adaptarse a esta nueva temperatura. Algo similar sucede durante el cambio de temperatura de 15°C a 10°C. En este caso, la proporción de ac. linolénico (C18:3) aumenta bruscamente un 325%, disminuyendo el resto entre un 0-5%.

Desde el punto de vista del cultivo de la cepa T5 como fuente de ácidos grasos esenciales (C18:2 y C18:3) es de destacar que la baja de 25 a 20°C en la temperatura de cultivo determinaría un crecimiento del 200% en su contenido. Llegando a tener el 60% de sus ácidos grasos como esenciales cuando se la cultiva a 10°C.

Evaluación de la temperatura óptima de crecimiento.

En función del potencial biotecnológico de las levaduras en estudio, por las actividades enzimáticas y los perfiles de ácidos grasos obtenidos, se seleccionó a las cepas T4, T5, T9 y T14 para cultivarlas en medio líquido y determinar su temperatura óptima de crecimiento. La cepa T7 se descartó para este estudio, ya que no se obtuvieron resultados interesantes en la evaluación enzimática ni en su perfil de ácidos grasos. Las cepas T4, T9 y T14 fueron seleccionadas por ser potenciales productoras de enzimas (lipasas, amilasas y xilanasas). La cepa T5 presentó el perfil de ácidos grasos con la mayor cantidad de ac. linoléico (ω -6) y ac. linolénico (ω -3 o ω -6).

A partir de cultivos en matraces, realizados por triplicado, de las diferentes cepas a 10, 15, 20 y 25°C, se construyeron las respectivas curvas de crecimiento. La tabla 8 muestra la tasa máxima específica de crecimiento (μ_{max}) obtenida para las diferentes cepas a cada una de las temperaturas evaluadas:

Tabla 8. μ_{max} [h^{-1}] para cada cepa a las diferentes temperaturas evaluadas.^{iv}

Cepa	Temperatura [°C]	Replica 1	Replica 2	Replica 3	Promedio	Desviación estándar (2σ)
T4	25	0,086	0,084	0,103	0,091 ^b	0,021
	20	0,062	0,058	0,063	0,061 ^a	0,005
	15	0,130	0,121	0,129	0,127 ^c	0,010
	10	0,080	0,082	0,080	0,081 ^b	0,002
T5	25	0,135	0,137	0,131	0,134 ^c	0,006
	20	0,107	0,122	0,095	0,108 ^b	0,027
	15	0,095	0,096	0,086	0,092 ^b	0,011
	10	0,062	0,064	0,062	0,063 ^a	0,002
T9	25	0,079	0,048	0,105	0,077 ^a	0,057
	20	0,132	0,133	0,139	0,135 ^{ab}	0,008
	15	0,250	0,164	0,183	0,199 ^b	0,090
T14	10	0,070	0,065	0,069	0,068 ^a	0,005
	25	0,090	0,128	0,162	0,127 ^b	0,072
	20	0,081	0,077	0,074	0,077 ^{ab}	0,007
	15	0,049	0,084	0,146	0,093 ^{ab}	0,098
	10	0,045	0,046	0,046	0,046 ^a	0,001

Valores de μ_{max} (promedio) para una misma cepa con superíndice común no son significativamente diferentes ($p < 0.05$). Análisis de varianza (ANOVA), y test de tukey.

^{iv} Considerando una distribución normal de los datos, 2 veces la desviación estándar comprende un 95% de certeza de que los datos se encuentren dentro de este intervalo.

Para la cepa T4 se observa que la temperatura a la cual se obtuvo la mayor μ_{\max} fue a 15°C y su valor fue de $0.127 \pm 0.010 \text{ h}^{-1}$. Para la cepa T5, se obtuvo la mayor μ_{\max} a 25°C, con un valor de $0.134 \pm 0.006 \text{ h}^{-1}$. Para estas 2 cepas, el análisis de varianza (ANOVA) con comparación de medias (test de Tukey) encontró diferencias significativas con el resto de los respectivos datos. Por lo tanto, es posible afirmar estos resultados con un 95% de confianza. Para la cepa T9, si bien se obtuvo la mayor μ_{\max} a 15°C con un valor de 0.199, el error asociado es grande: ± 0.090 . Por otro lado, el valor de μ_{\max} obtenido a 20°C fue de 0.135 con un error de 0.008. El análisis estadístico no logró encontrar diferencias significativas entre estos datos. Por lo cual, únicamente se puede asegurar que la mayor μ_{\max} se encuentra entre los 15-20°C. Para la cepa T14 se da una situación similar, la tasa máxima de crecimiento se obtuvo a 25°C pero con un valor de error asociado alto: $0.127 \pm 0.072 \text{ h}^{-1}$. A 20°C la tasa de crecimiento fue de 0.077 ± 0.004 . Sin embargo a 15°C se obtuvo un valor mayor que a 20°C, pero también con un gran error asociado: $0.093 \pm 0.098 \text{ h}^{-1}$. El análisis estadístico no logró encontrar diferencias significativas entre estos 3 datos, por lo que solamente sería posible afirmar que la tasa máxima de crecimiento específica se encuentra entre los 15-25°C.

Conclusiones

Se identificó a nivel de género a 14 aislados marinos provenientes de antártica. De 4 cepas se podría indicar la especie: T5 *Metschnikowia australis*, T6 y T7 *Debaryomyces hansenii*, T14 *Cryptococcus magnus*, ya que se obtienen muy buenas correlaciones en los estudios de identificación molecular con cepas de referencia.

Se encontraron 5 cepas potenciales productoras de enzimas, T4, T9 y T14 presentaron actividad lipolítica (tween 80), amilolítica y xilanolítica. T5 y T7 presentaron únicamente actividad lipolítica (tributirina) a 5°C, cualidad de interés para su aplicación en procesos a bajas temperaturas. No se detectó actividad proteolítica, ligninolítica ni celulolítica.

Se determinó el perfil de ácidos grasos para 5 cepas, 3 son los ácidos grasos mayoritarios: ac. oleico, palmítico y linoléico. Todas las cepas contenían ácidos grasos esenciales, el ac. linoléico (ω -6) y ac. linolénico (ω -3), siendo T5 la cepa que los contenía en mayores proporciones.

En la cepa T5 se encontró que una disminución en la temperatura de cultivo determina un aumento en la proporción de ácidos grasos esenciales, llegando a contener 60% de sus ácidos grasos como esenciales cuando se la cultiva a 10°C.

Del análisis de las tasas específicas de crecimiento máximas y la temperatura de cultivo surge que las cepas T4 se comportan como microorganismo psicrófilo y T5 como psicrotolerante. No fue posible determinar la temperatura óptima de crecimiento para T9 ni T14, pudiéndose únicamente afirmar que la misma se encuentra entre los 15-20°C y los 15-25°C respectivamente.

Bibliografía

- Abe, F., Miura, T., Nagahama, T., Inoue, A., Usami, R. & Horikoshi, K. (2001). Isolation of a highly copper-tolerant yeast, *Cryptococcus* sp. from Japan Trench and the induction of superoxide dismutase activity by Cu²⁺. *Biotechnology letters* , 23:2027-2034.
- Aksyonov, S. (2002). Life at extreme low humidity. *Astrobiology expeditions/Workshops* , 142-143.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D. J., (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database programs. *Nucleic Acid Research* , 25:3389-3402.
- Atlas, R. M., (2010). *Handbook of microbiological media*. Washington DC: CRC Press.
- Beltrán, S., Rubio-Rodríguez, N., Jaime, I., de Diego, S. M., (2010). Production of omega-3 polyunsaturated fatty acid concentrates: A review. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* , 11:1-12.
- Benson, D.A., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D.J., Ostell, J., Wheeler, D.L., (2005). GenBank. *Nucleic Acid Research*, Vol. 33.
- Bergé, J.-P., & Barnathan, G. (2005). Fatty acids from lipids of marine organisms: molecular biodiversity, roles as biomarkers, biologically active compounds, and economical aspects. *Adv Biochem Engin/Biotechnol* , 96:49-125.
- Catalá, A. (2013). Five Decades with Polyunsaturated Fatty Acids: Chemical Synthesis, Enzymatic Formation, Lipid Peroxidation and Its Biological Effects. *Journal of Lipids* , 19.
- Cavicchioli, R. & Torsten, T. (2000). Extremophiles. In: *Lederberg J (ed) Encyclopedia of microbiology* , 2:317-337.
- Chi, Z., Sheng, J., Jing, L., Gao, L., Gong, F., (2007). Inulinase production by marine yeast *Cryptococcus aureus* G7a and inulin hydrolysis by crude inulinase. *Process Biochemistry* , 42(5):805-811.
- Collins, T., Gerday, C., Feller, G. (2005). Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. *FEMS Microbiology Reviews* , 29:3-23.
- Deshpande, V.V., Rao, M.B., Tanksale, A.M. (1998). Molecular and Biotechnological Aspects of microbial proteases. *Microbiology and Molecular biology reviews* , 62(3):597-635.
- Desnos-Ollivier, M., Ragon, M., Robert, V., Raoux, D., Gantier, J.C., Dromer, F. (2008). *Debaryomyces hansenii* (*Candida famata*), a Rare Human Fungal Pathogen Often Misidentified as *Pichia guilliermondii* (*Candida guilliermondii*). *Journal of clinical microbiology* , 46(10):3237-3242.

Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M., Robledo C.W. InfoStat versión 2014. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>

Donachie, S. P. & Zdanowski, M. K. (1998). Potential digestive function of bacteria in krill *Euphausia superba* stomach. *Aquatic microbial ecology* , 14:126-136.

Fell, J. W., Boekhout, T., Fonseca, A., Scorzetti, G., Statzell, A. (2000). Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeasts as determined by large-subunit rDNA D1/D2 domain sequence analysis. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* , 50:1351-1371.

Fell, J. W., & Van Uden, N. (1963). Yeast in marine environments. *Symposium on marine microbiology* (págs. 329-340). C. C. Thomas, Springfield: C.H. Oppenheimer.

Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* , 39:783-791

Fize, A., Manier, J.F., Maurand, J. (1971). Sur un cas d'infestation du copépode *Eurytemora velox* (Lillj) par une levure du genre *Metschnikowia* (Kamieski). *Annales de parasitologie humaine et comparée* , 357-363.

Fleet, G. (2003). Yeast interactions and wine flavour. *International Journal of Food Microbiology* , 86:11-22.

Gunde-Cimerman, N., Butinar, L., Santos, S., Spencer-Martins, I., Oren, A. (2005). Yeast diversity in hypersaline habitats. *FEMS Microbiology Letters* , 229-234.

Gupta, A., Vongsvivut, J., Barrow, C. J., Puri, M. (2012). Molecular identification of marine yeast and its spectroscopic analysis establishes unsaturated fatty acid accumulation. *Journal of Bioscience and Bioengineering* , 114(4):411-417.

Hinzpeter, I., Shene, C., Masson, I. (2006). Alternativas biotecnológicas para la producción de ácidos grasos poliinsaturados omega-3. *Grasas y aceites*, 57(3):336-342.

Hinzpeter, I. (2008). Identificación de microorganismos del orden thraustochytriales provenientes de la zona costera de Puerto Montt, Chile y determinación de la capacidad de producción de ácido docosahexaenoico. *Tesis para optar al grado académico de Doctor en Ciencias de Recursos Naturales* . Temuco, Chile: Universidad de la Frontera.

Kuddus, M. & Roohi (2010). Microbial cold-active α -amylases: From fundamentals to recent developments. *Technology and education topics in applied microbiology and microbial biotechnology* , 1265-1276.

Kuhad, R.C., Gupta, R., Singh, A. (2011). Microbial Cellulases and Their Industrial Applications. *Enzyme research* .

Kurtzman, C., Fell, J.W., Boekhout, T. (2011). *The Yeast: A Taxonomic Study* (Vol. 1). Elsevier.

- Lachance, M.A., Miranda, M., Millar, M.W. (1976). Dehiscence and active spore release in pathogenic strains of the yeast *Metschnikowia bicuspidate* var. *australis*: possible predatory implications. *Can J Microbiol* , 22:1756-1761.
- Lee, M.K., Man, S., Balbimie, A., Mithani, S., Wong, Q., Zabek, E., Raverty, S., Hoang, M.L., Morshed, M.G. (2010). Molecular Characteristics of Cryptococcus Isolates From Marine Mammals Stranded along the Pacific Northwest Coast. *Annual Meeting*. Vancouver: Infectious Diseases Society of America.
- Loque, C.P., Medeiros, A.O., Pellizzari, F.M., Oliveira, E.C., Rosa, C.A., Rosa, L.H. (2010). Fungal community associated with marine macroalgae from Antarctica. *Polar Biol* , 33: 641-648.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., Parker, J. (2004). *Brock Biología de los Microorganismos* (10 ed.). Madrid: Pearson Prentice.
- McLeland, S., Duncan, C., Spraker, T., Wheeler, E., Lockheart, S., Gulland, F. (2012). Cryptococcus albidus Infection in a California Sea Lion (*californianus*). *Journal of wildlife diseases* , 48(4):1030-1034.
- Meireles, S.V.M., Bouffleur, F.B., Gonzales, K.G., Dziabas, D.D., Bedin, V.B. (2013). Lesão peniana causada por *Rhodotorula rubra*: Relato de caso. *Reunion anual de dermatologos*. Punta del Este, Uruguay.
- Merín, MG., Mendoza, LM., Morata de Ambrosini, VI. (2013). Pectinolytic yeasts from viticultural and enological environments: novel finding of *Filobasidium capsuligenum* producing pectinases. *Journal of basic microbiology* .
- Misaelides, P., Sarri, S., Papanikolaou, M., Zamboulis, D. (2009). Uranium removal from acidic aqueous solutions by *Saccharomyces cerevisiae*, *Debaryomyces hansenii*, *Kluyveromyces marxianus* and *Candida colliculosa*. *Journal of radioanalytical and nuclear chemistry* , 279 (3): 709-711.
- Mtui, G., & Nakamura, Y. (2004). Lignin-degradating enzymes from mycelial cultures of basidiomycete fungi isolated in tanzania. *Journal Chemical Engineering of Japan* , 37(1):13-118.
- Nelson, D.L. & Cox, M.M. (2001). *Lehninger Principios de Bioquímica*. Omega.
- Pandey, A., Nigam, P., Soccol, C.R., Soccol V.T., Singh, D., Mohan, R. (2000). Advances in microbial amylases. *Biotechnol. Appl. Biochem.* , 31:135-152.
- Paterson, R., & Bridge, P. (1994). Biochemical techniques for filamentous fungi. *International Mycological Institute- Technical Handbooks* , 1:19-22.
- Philip, R. & Kutty, S. N. (2008). Marine yeasts — a review. *Yeast* (25), 465-483.
- Raspor, P. & Zupan, J. (2006). Yeasts in Extreme Environments. En G. & Peter, *Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts* (págs. 371-417). Springer.
- Russell, N. J., & Nichols, D. (1999). Polyunsaturated fatty acids in marine bacteria — a dogma rewritten. *Microbiology* , 145:767-779.

- Saitou, N. & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4:406-425.
- Satyanarayana, T., (2009). Antarctic Yeasts: Biodiversity and Potential. En T. Satyanarayana, G. Kunze, T. Satyanarayana, & G. Kunze (Edits.), *Yeast Biotechnology: Diversity and Applications* (pág. 744). Springer.
- Scorzetti, G., Petrescu, I., Yarrow, D., Fell, J.W. (2000). *Cryptococcus adeliensis* sp. nov., a xylanase producing basidiomycetous yeast from Antarctica. *Antonie van Leeuwenhoek*, 77(2):153-157.
- Seki, H. & Fulton, J. (1968). Infection of Marine copepods by *Metschnikowia* sp. . *Mycophatol Mycol appl*, 38:61-70.
- Sharma, M & Kumar, A. (2013). Xylanases: an overview. *British Biotechnology Journal*, 3(1):1-28.
- Sibirny, A.A. & Voronovsky, A.Y. (2009). *Candida famata* (*Debaryomyces hansenii*). En T. & Satyanarayana, *Yeast Biotechnology: Diversity and Applications* (págs. Chapter 5: 85-111). Springer.
- Singh, S., & Petrie, J. (2011). Expanding the docosaehaenoic acid food web for sustainable production: engineering lower plant pathways into higher plants. *AoB Plants*.
- Takashima, M., & Nakase, T. (1999). Molecular Phylogeny of the Genus *Cryptococcus* and related species based on the sequences of 18S rDNA and internal transcribed spacer regions. *Microbiol. cult. coll.*, 15(2):35-47
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., and Kumar, S. (2011). MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods.
- Teather, R., & 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(4):777-780.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22:4673-4680.
- Turchetti, B., Buzzini, P., Goretti, M., Branda, E., Diolaiuti, G., D'Agata, C., Smiraglia, C., Vaughan-Martini, A. (2008). Psychrophilic yeast in glacial environments of alpine glaciers. *FEMS Microbiology Ecology*, 63:73-83.
- Vaca, I., Faúndez, C., Maza, F., Pailavil, B., Hernández, V., Acosta, F., Levicán, G., Martínez, C., Chávez, R. (2013). Cultivable psychrotolerant yeasts associated with Antarctic marine sponges. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 29 (1), 183-189.
- Vaz, A.B., Rosa, L.H., Vieira, M.L., de Garcia, V., Brandão, .LR., Teixeira, L.C., Moliné, M., Libkind, D., van Broock, M., Rosa, C.A. (2011). The diversity, extracellular enzymatic activities

and photoprotective compounds of yeasts isolated in Antarctica. *Brazilian Journal of Microbiology* , 42:937-947.

Verma, N., Thakur, S., Bhatt, A.K. (2012). Microbial Lipases: Industrial Applications and Properties (A Review). *International Research Journal of Biological Sciences* , 1(8):88-92.

Wang, Q.M & Bai, F.Y., (2008). Molecular phylogeny of basidiomycetous yeasts in the *Cryptococcus luteolus* lineage (Tremellales) based on nuclear rRNA and mitochondrial cytochrome b gene sequence analyses: proposal of *Derxomyces* gen.nov. and *Hannaella* gen.nov., and description of... *FEMS yeast research* , 8(5):799-814.

White, T.J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR Protocols: A guide to methods and applications* , 315-322.

Witzgall, P., Proffit, M., Rozpedowska, E., Becher, P.G., Andreadis, S., Coracini, M., Lindblom, T.U., Ream, L.J., Hagman, A., Bengtsson, M., Kurtzman, C.P., Piskur, J., Knight, A. (2012). "This is not an apple"-yeast mutualism in codling moth. *Journal of chemical ecology* , 38 (8), 949-957.

Anexo I

Identificación genética: Secuencias obtenidas

- T1

>NS1

```
GTTTGCTAGTCTGAGCTAGTATAAACAATCTATACAGTGAAACTGCGAATGGCTCATTAAATCAGTTATCGTTTATTTGATAGTACCTTGCTAATT
GGCATACGCCTGGCAATTCTAGAGCTAATACATGCATTCAAGCCCAACCTCTGGAAGGGGCTGTATTTATTAGATAAAAAATCAACAACCTTAGAT
GATTCATAATAAATTTGCGAATCGCATGGCCTCGGGCCGGCGATGGTTCATTCAAATTTCTGCCCTATCAACTTTTCGATGGTAGGATAGAGGCCT
ACCATGGTTTCAACGGGTAACGGGGAATAAGGGTTCGGTTCGGAGAGGGGAGCCTGAGAAAACGGCTACCACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCG
CGCAAATTACCAATCTGACACAGGGAGGTAGTGACAATAAATAACGATACAGGGCCCTTTTGGGTCTTGAATTGGAATGAGTACAATGTAA
ATACCTTAACGAGGAACAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGTAATTCAGCTCCAAGAGCGTATATTAAGTTGTTGCAGTTAA
AAAGCTCGTAGTTGAATTTTTGGGGTGCCCCAGAAGGTCACATTTATTTTTGAGTACTTTTTGGGACCGGCCCTTCTCATGGCTTATCCCTTCGG
GGGTGGGGCCTATAATTTCTTGAAGTAAATGGAGAGATTGTTTCAAGAGCAGGCGAAGCGGCTGGATATCTTTTACCATGGAATAAATAAAA
TAAGACCGATGGATTCTATTTTGTGGTTTCTAGGACCATCGTTATTGATTATAAAGGGACGGGTGCGGGGGCATTATTTTTCAGTTGTAAAA
GGGGGATTCTCTAAATTTTCTGAAACCAACTCCCGGAAGCATTGGCAAGGGACGTTTTTCTTATTCAAACCAAAGTTAGGGATCGAGATGA
TCAGATACCGTCTATTCTAACCTAAACTATGCGACTAGGGGTGGGGCGACGCCACGTAATGACGCGCCCGCACCTTACCACATCTAAGTTTT
GGTCTGTGGGGTATGGTGCAGGGCGACCTAGAAGCAGCTAAACCTAAAAA
```

>NS8

```
TCGATGGTCGCGAAAAGCGGTACCTCTCATGACCAAGTTTGACCAGTTTCTCAGCATCAACCCGGGTTGCCAGCTTGAACCTTAATCCAGAGG
CCTCACTAAGCCATTAATCGGTAGTAGCGACGGGGGTGTGTACAAAGGGCAGGGACGTAATCAACGCAAGCTGATGACTTGCCTTACTAGG
AATTCCTCGTTGAAGAGCAAAAATTACAATGCTCTATCCCCAGCAGCAGGAGTTTCTCAAGATTTCCAAACCTCTCGGCTAAGGTAACCTCGCT
GGCTCCGTCAGTGTAGCGCGCTGCGGCCAGAACGTCTAAGGGCATCACAGACTGTATTGCCTCAAACCTCCATCGACTTGAATTCGATAGT
CCTTTTATGGCGCACACCAACAGAATTGTTAAGTGCGCAATAAAGGCTAAGGTCTCGTTCTGTTATCGCAATTAAGCAGACAAATCACTCCACC
AACTAAGAACGGCCATGCACCACCACCACAAAATCAAGAAAGAGCTCTCAATCTGTCAATCCTTATTGTGTCTGGACCTGGTGAATTTCCCGT
GTTGAGTCAAATTAAGCCGAGGCTCCACTCTGGTGGTCCCTCCGTCATTCCTTTAAGTTTTCAGCCTTGGCACCATACTCCCCCAGAACCC
AAAACTTTGATTTCTCGTAAGGTGCTGGGCGCGTCAATACATGAGGCGTCCCAATCCCTAGTCGGCATAGTTTATGGTTAAGACTACGACG
GTATCTGATCATCTTCGATCCCTAATTTCTGTTCTTGATTAATGAAAACGCTCTTGACAAATGCTTTCGAGTAGTTAGTCTCAGAAAATCTAAG
AATTCATCTCTTACAACCTGAATACTAATGCCGCCGACCGTCCCTATTAATCATTACGATGGTCTGAGAAACCACAAAATAGAAATCATCGTCTATT
TTTATTATCCATGCTAAAGATTCAAGCGCTTGCCTGCTTTGACACTCTATTTACTCAAAGTAATATGGTCCACCCGAGCGCATAGGCATGCAA
CGCGTCCGAACAGTACTCAAAATATGGACTTCTGGGCTACCCAATCCACTACGAGCTTTACTGCATAACTTGAATACGCTCTTGGACCTGATTAC
GAGCGTGGACTCGAACAACCTAGAAAACGCGGAAAACCTGTTACCACTCTTATCTCATAGATGACACATGTAACAGCTCTCTACGATTACACC
ACGGGTGTGTCTGCCCATCTGTTA
```

- T2

>NS1

```
GTTAAACTCAGGTGAGCTAGTATAACAATTCATACTGTGAAACTGCGAATGGCTCATTAAATCAGTTATAGTTTATTTGATGGTAACTTGCTACAT
GGATAACTGTGGTAATTTCTAGAGCTAATACATGCTGAAAAGCCCCGACTTCTGGAAGGGGTGTATTTATTAGATAAAAAACCAATGGGTGAAAG
CCCTTCATGGTGATTATAAATCTCGAATCGCATGGCCTTGCGCCGGCGATGCTTCATTCAAATATCTGCCCTATCAACTTTTCGATGGTAGA
GTAGTGGTCTACCATGGTATCAACGGGTAACGGGGAATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAAACGGCTACCACATCCAAGGAAGG
CAGCAGGCGCGCAAATACCAATCCCGACACGGGGAGGTAGTGACAATAAATAACAATACAGGGCTCTAATGGGTCTTGAATTGGAATGAGT
ACAATTTAAATCCCTTAACGAGGAACAACCTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGTAATCCAGCTCCAGTAGCGTATATTAAGTTGTT
GCAGTTAAAAAGCTCGTAGTGAACCTCGGGCCGACGGGATGGTCCGCCTACGGTGTGACTGTCTTGGTGGTCTTACCTCTTGGTGAAGCT
GCATGCCCTTACTGGGGTGTGGTAGTGAACCAAGAATTTACTTTTGAAGAAAATTAAGAGTTTTCAAAGCAGGCCTTTGCCGAATACATTA
GCATGGAATAATAGAATAGGACGTGCGGTTCTATTTTGTGGTTTCTAGGATCGCCGTAATGATTAATAGGGACGGTCGGGGGCATTAGTATTC
CGTTGCTAGAGGTGAAATCTTAGATTTACGGAAGACTAACTACTGCAAGCATTGGCCAGACGTTTTTTCATGATCAGACGAGTAGGGATCAAC
GATAGATACGTGATGCTACAGTAACCTATGCGACTAGGATCGTTCATCAGTATGAGAATCGCACTACAGATCAGTCTAGTCTGTGGGAGATGTCC
CAGCTGACTAGATCGAAAAAAGAA
```

>NS8

```
TCGTTACCAGTAGGAATTACCTTGACAGGACCAATTTGATCAACTTCTACAGCCAAAGGGTAGCACGATTAGCCGGCTCCCTAACGCAATCCG
GAGATCTCACTAAGCCATTAATCGGTAGTAGCGACGGGGGTGTGTACAAAGGGCAGGGACGTAATCAACGCGAGCTGATGACTCACGCTTA
CTAGGTATTCTCGTTGAAGAGCAATAAATGCAATGCTCTATCCCCAGCAGCAGTGTTCACAAGATTACCAAGCTTCTCAGCTAAGGTGATA
AACTCGTGGCTCAGTCAAGTGTAGCGCGCTGCGGCCAGAACATCTAAGGGCATCACAGACTGTATTGCCTCAAACCTCCAACAGCTAAACG
```

CTGTTAGTCCCTCTAAGAAGCCGACGACCAGCCAAAGCCGGCCTGGCTATTTAGCAGGTTAAGGTCTCGTTCGTTATCGGAATTAACCAGACAAA
TCACTCCACCAACTAAGAACGGCCATGCACCACCACCCATAGAATCAAGAAAGAGCTATCAATCTGCAATCCTCACTATGTCTGGACCTGGTGA
GTTTCCCCGTGTTGAGTCAAATTAAGCCGAGGCTCCACACCTGGTGGTGCCTTCCGTCATTCCTTTAAGTTTCAGCCTTGCGACCATACTCCCC
CCAGAACCCAAAGACTTTGATTTCTCGTAAGGTGCCGGATTCTTCATACCTTGAATGGAACCGATCCCTAGTCGGCATAGTTTACTGTTAAGACTA
CAACGGTATCTAATCGTTTTGATCCCCTAACCTTCTGTTCTGATCAATGAAAACGCTCTTGGCAAATGCTTTCGAGTAGTTAGTCTCCGTAATC
TAAGAATTTACCTCTAGCAACGGAACTAATGCCCCGACCGTCCCTATTATCATAACGGGATCCTAGAATCAACAAAATAGAACGGCAGCTCT
ATTCATTATCATGCTATGTATCGGCAAAGCTGCTGACCTCAATTTCTCAAGTAAATCCTGTTGACTGACACCAGTAAAGGCATGAGCTCACA
TAGTAGACCACAGAAGCTACACGTAAGCGACATGCGTCGGCAGAGTTGCTCAGCGTGACTGCAACTGAATAGCTAGACTGAAACGTTTCGACTG
ATACATGCTAATGAGTTCGACTGACTTAACAGATGCGTATGCTCTACGCAGTGTAGTGATCACACCAGCGCT

>ITS4

GACCCGATCCGGTGTCTACTGATTGAGGTGCGGACATAAAGGTTGTTAGAGTGGAGGGAGCGAAAACTTATTACGCCCTCCATTGAGTCATTT
AAGACGAGCCACGGATGGCAGCGTCCCCCTTTATACATAGAAAAGTGGTATGAGAGTTTTTATGACACTCAAACAGGCATGCCTTTCGGAATA
CCAAAAGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACTGAATTCGCAATTCACATTACTTATCGCATTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCGA
GAGCCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTGATTTGTTATAATATAATACATTCTTTACACTGATGTTGTATAATATCGCCGGAGCGACAAGATGCA
CAGGTGTTAAGGATATTAAGTTACCGAAGTAACGTTAATAATGATCCTCCGAGGTTACCTACGGAAACCTGTTACGATTTTTACTTAAAA
AATA

- **T3**

>NS1

GGTCGTCTGATCATAGTATGAACATCTATACAGTAAACTGCGAATGGCTCATTAAATCAGTTATCGTTTATTTGATAGTACCTTGCTAATTGGCA
TACGCTGGCAATTCTAGAGCTAATACATGCATTCAAGCCCAACTCTGGAAGGGCTGATTTATTAGATAAAAAATCAACAACCTTAGATGATTC
ATAATAACTTGTGCAATCGCATGGCTCGGGCCGGCAGTGGTTCAATCAAATTTCTGCCCTATCAACTTTCGATGGTAGGATAGAGGCTACCAT
GGTTTCAACGGGTAACGGGAATAAGGGTTCGGTTCGGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAA
ATTACCAATCCTGACACAGGGAGGTAGTGACAATAAATAACGATACAGGGCCCTTTGGGTCTGTAATTGGAATGAGTACAATGTAATACT
TAACGAGGAACAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGGTAATCCAGTCCAAGAGCGTATATTAAGTTGTTGAGTAAAAAGCT
CGTAGTTGAATTTGGGGTGGCCCCAGAAGGTCCACTTATTTGTGAGTACTTTTTGGGACCGCCCTCCATGGCTTATCCCTCGGGGTGGGCCA
TAATTACTTTGAGTAAATGAGAGTGTCAAAGCAGGCAAGCGCTGTATCTTTAGCATGGAATAATAAAATAGGACGATGATTCTATTTTTGTTG
GTTTCTAGACCATCGTAATGATTAATAGGGACGGTCCGGGGGCATAGTATTCAAGTGTAGAGGTGGAATTCCTAGATTTTCTGAAAACCTAACTA
CTGCGAAAAGCATGGCCAGGACGAGTTCATAATCCACAACACAGTTCGGGGGACCGAGGATGATCAGAACCGTCGATCTTAAACACAACGAT
GGCGACTAAGCGATGGGGCGGAGTCTCTGCAAAAAGACGCGCTGCTCCACCAGCAATCTACAGTTCTGTGTGTGGGTTTCGCGGGGGCG
GTCGTACTTACTACTATAGAACAACACACAAAAA

>NS8

TCCCATTGACTGAACTGTCGGCTCATGACCAAGTTTGACACAGTTTCTAAGCATCAACCCGGGTTGCCCCAGCTTGAACTTAATCCAGAGGCC
TCACTAAGCCATTCAATCGGTAGTAGCGACGGCGGTGTGTACAAAGGGCAGGGAGCTAATCAACGCAAGCTGATGACTTGCCTTACTAGGA
ATTCCTCGTTGAAGAGCAAAAATTACAATGCTCTATCCCCAGCAGCAGGAGTTTCTAAGATTTCCCAAACCTCTCGGCTAAGGTAACCTCGCTG
GCTCCGTCAAGTGTAGCGCGGTGCGGCCAGAACGCTAAGGGCATTACAGACCTGTTATTTGCCTCAAACCTCCATCGACTGAAATTCGATAGTC
CTTTATGGCGCACACCAACAGAAATGTTAAGCTGCGCAAATAAAAGCTAAGGTCTCGTTGTTATCGCAATTAAGCAGACAAAATCACTCCACCA
ACTAAGAACGGCCATGCACCACCCACAAAATCAAGAAAGAGCTCTCAATCTGTCAATCCTTATTGTGTCTGGACCTGGTGAAGTTTCCCCGTGT
TGAGTCAAATTAAGCCGACGGCTCCACTCCTGGTGGTGCCTTCCGTCAATTCCTTAAGTTTCAAGCTTGCAGCCTGCGACCATACTCCCCCAGAACCAA
AACTTTGATTTCTCGTAAAGTGTGGGCGCGTCAATACATGAGGCGTCCGCAATCCCTAGTCGGCATAGTTTATGGTTAAGACTACGACGGT
ATCTGATCATCTTCGATCCCCTAATTTCTGTTCTTGATTAATGAAAACGCTTTCGACAAAATGCTTTCGAGTAGTTAGTCTTCAGAAAATCTAGAATT
ATTCATGCTCAAAGATTCAGCCGCTGCCGGCTTTGACACTCTACTCAAGTACTTATGGTCCACCCACGCATAGCTCATGCAAGCGTCCG
AGAATATCAAAGTATGGACTTGTGGGCTGCGGAACTCACATACAGGCTTACGTATAAAGTATAACGTTTCTGACTGATTTACGGGATCTGA
CCCTACTCCGATACGTATGCATATATTATTGCTAAAAGTGTGTCAACTTTGCTTCTTAAGAGACAGTGTCTATCACCGGTGCCAGTAAT
TTATCGAGGGCTCTCGATCAATATG

- **T4**

>NS1

GTCCATCACTCTAGTATAAACAATTCATACTGTGAAACTGCGAATGGCTCATTAAATCAGTTATAGTTTATTTGATGGTATCTTGTACATGG
ATAACTGTGGTAATCTAGAGCTAATACATGCTGAAAAGCCCCGACTTCTGGGAGGGGTGATTTATTAGATAAAAAACCAATGGGTGAAAGCC
CTCTATGGTGATTCATAATAACTTCTGAATCGCATGGCCTTGCGCCGGCAGTCTTCAATCAATATCTGCCCTCACTTTTCGATGGTAGAGT
AGTGGTCTACCATGGTATCAACGGGTAACGGGGAATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAAACGGCTACCACATCAAGGAAGGCA
GCAGGCGCGCAAATACCAATCCCGACAGGGGAGGTAGTGACAATAAATAACAATATAGGGCCCTATTGGGTCTTATAATTGGAATGAGTAC
AATTTAAATCCCTAACGAGGAACAACCTGGAGGGCAAGTCTGGTCCAGCAGCCGGTAATCCAGCTCCAGTAGCGTATATTAAGTTGTTG

CAGTTAAAAGCTCGTAGTCGAACTTCGGGCCTGGCGGGACGGTCCGCTTACGGTGTGACTGTCCGGCCGGGTCTTACCTCTTGGTGAGGGC
CGTATGCCCTTACTGGGGTGTGCGGGGGGAACCAAGATTTTACCTTGAGAAAATAAGAGTGTTCAAAGCAGGCATTTGCCGAATACATTAG
CATGGAATAATAGAATAGGACGTGCGGTTCTATTTTTGTTGGTTCTAGGATCGCGTATGATAATAAGGGACGGTCGGGGGCATAGTATCCGTT
GCTAGAGGTGAATTCTAGATTTACGGAAGACTAACATCTGCGAAGGCATTGCCATGACGTTTTTCATTGATCAGACGAACGTAAGGGATCGAGAA
CGATAGATACCGTGAGTCTACATAACTATGCGATAGGATCGGCCAGTAATCTGACTGTCGTACGTGCAGATCAGCATAGTCTGTGGGTGCGCGA
GCTGATAGTAGAACGACAAACAACACATATAT

>NS8

CCCGGGTGGCATTGCATTCATCTATGACCAGGTTTGATCAGCTTCTCGGCCAAGGGGTGCCGTTGCCGGCTCCCCAACGCCAATCCGGAGATCTC
ACCAAGCCATTCAATCGGTAGTAGCGACGGGGTGTGTACAAAGGGCAGGGACGTAATCAACGCAAGTTGGTGACTTACGCTTACTAGGTATT
CCTCGTTGAGAGCAATAATTGCAATGCTCTATCCCCAGCAGGACTGAGTTTACAAGATTACCCAGGCCTCTCGGCCAAGGTGATAAACTCGCT
GGCTCAGTCAGTGTAGCGCGGTGCGGCCAGAACATCTAAGGGCATCACAGACCTGTTATTGCCTCAAACCTCCGTCGGCTAAACGCCGACAG
TCCTCTAAGAAGCCGACGACCAAGCCGAGCCAAAGCCGGCCTGGCTATTTAGCAGGTTAAGGTCTCGTTCTGTTATCGGAATTAACAGACAAATCACTCC
ACCAACTAAGAAGCCGATGCAACCAACCCATAGAATCAAGAAAGAGCTATCAATCTGTCAATCCTTACTATGTCTGGACCTGGTGAGTTTCCCC
GTGTTGAGTCAAATTAAGCCCGCAGGCTCCACACCTGGTGGTGCCCTTCCGTCAATTCCTTAAGTTTCAGCCTTGCAGCCATACTCCCCCGAA
CCCAAAGACTTTGATTTCTCGTAAGGTGCCGAGCCAGTCAGAAATTAACGTGGCCCGATCCCTAGTCGGCAGTATTTACTGTTAGACTACAACG
GTATCTAATCGTTTTGATCCCCTAACCTTCTGTTCTTGTCAATGAAAACGTCTTGGCAAATGCTTTCGAGAAAGTTAGTCTCCGTAATCTAAG
ATTTACTCTAGCAACGGAAATACTAATGCCCGACCGTCTATTAATCATTACGGCGATCCTAGAACCACAAAATAGACCCGACGTCATCTATTA
TCATGCTATGTAGTCCGGCAATGCTGCTTTGACACTCTATTTCTCAGTAAATGCTGGTCACGCACCAAGTAATGCATACGCTACAGAGTAGACGAC
GGACGTACAACGTAGCGACGTCGACGGCGAGTGCATCGAGCTTACGCCACTGAAAGGTAGACTGAGTACGCGGCCACTGAGAGCAGATGCC
AGTCGCGTCAGAACGGATGCGTCTAATCATAACAAGGTGGAGTCTGCCATCGGGCGTGTG

>ITS4

GGATCGGTATCTACTGATTTGAGGTGAGAGTCAAAAATGTGCGCGATGGCGGGTGTGAGCAGGCTCGGTGAGACAAGGGACGAGACGAAAT
TATTACGTCTGTCGCGGATGTCTAGGAGATCCCACTAAGTCATTTGAGGCGAGCCATTTGACTGGCAGACGCCAGGTCCAAGTCCAGCACCCG
GTAACAAAACCCGGTGGGATTGAGATTTGATGACACTCAAACAGGCATGCCTTTCGGAATACCAAAAAGGCGCAAGGTGCGTTCAAAGATTCGAT
GATTAATGAAATCTGCAATTCACATTACTTATCGCATTTCGCTGCGTCTTTCATCGATGCGAGAGCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTGTTTT
TGTTAAGATAACAAGACGTTGTTACACTGATGTTGTATGAAGAGACCCGGAGGTCAACGGTTCAAAGAGGTGTTGGATAGTTGATAAGAC
CTTTCGGTCAATCATTAAATGATCCTTCGCGAGGTTACCTACGGAAACCTTGTACGATTTTTAACTTCAAAAAAATTTTTATTATAA

- T5

>NS1

GTTCTTTTTGTAACCTATATATGAAGAATCTATACAGTAACTGCGAATGGCTCATTAAATCAGTTATCGTTTATTTGATAGTACCTTGCTAAT
GGCATAACGCTGGCAATCTAGAGCTAATACATGCATTCAAGCCCAACCTCTGGAAGGGCTGTATTTATTAGATAAAAAATCAACAACCTTAGAT
GATTCATAATAACTTGTGAATCGCATGGCCTCGGGCCGCGGATGGTTTCAATTTCTGCCCTATCAACTTTCGATGGTAGGATAGAGGCCT
ACCATGTTTTCAACGGGTAACGGGGAATAAGGGTTCGGTTCGGGAGAGGGACCTGAGAAACGGCTACCACATCCAAGGAAGGCAGAGGGC
CGCAAATACCAATCCTGACACAGGGAGGTAGTGACAATAAATAACGATACAGGGCCCTTTGGGTCTGTAATTTGAAATGAGTACAATGTAA
ATACCTAACGAGGAACAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGTAATCCAGCTCAAAGAGCGTATATTAAGTTGTTGAGTAA
AAAGCTCGTAGTTGAATTTGGGGTGGCCCCAGAAGGTCCACTTATTTGTGAGTACTTTTTGGGACCGCCCTTCCATGGCTTATCCCTCGGGGTG
GGCCATAATTACTTTGAGTAAATGAGAGTGTCAAAGCAGCAAGCGCTTGAATCTTTAGCATGGAATAATAAAATAGACGATGATTTCTGAACTAAC
TACTGCGAAAGCATTGTCAAGACGTTTTATATCAGAACGAAGTAGGGATCGAGATGATCAGATACGTCGTAGTCTACATAACTATGCGACTAG
GATGGGCGACGCTCATGTAATGACCGCCAGCACTACGAGCATCAAGTTTGTCTGTGGGGTATGTCGAGCTGACTACGATTACAGAGAACAAA
ACAAAAA

>NS8

TTGTCCCTGCGGCCCGCCGCGGGTAAAAGTTTGACAGCTTCTCCAGCATC

>ITS4

GGAGTACGGTATCTACGAGATGAGGAGTATTGGGTAGAAGTCTAAAACCTTATTCTAGATTCTGTTGATATTTGGACCAAGGGTCAAGACCAA
CCATAGTTTTGAGAGGAAATATCGCTCATCCACGCACGCCTTGGGGAATACCCCAAGGCGCAATGTGCGTTCAAAAATCAATGATTCACGCTCG
CAAGTCATATTACGTATCGCAATTCGCTGCGTCTTTCATCGATGCGAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTTTTTTTTTTTGGTGGTGTG
TTGTTAATGTTATTGGTTGTTTTCTAAAAGGGTGTATTATTCTTAAATGATCTTCCGCGAGGTTACCTACGGAAACCTGTTACGACTTTTT
ACAACAAAAACAACCCCA

- T6

>NS1

GCGGCTGATCTAACATGAGCATTATACAGTGAAACTGCGAATGGCTCATTAAATCAGTTATCGTTATTTGATAGTACCTTTACTACTTGGATAA
CCGTGGTAATTCTAGAGCTAATACATGCTAAAAATCCCGACTGTTTGAAGGGATGTATTTATTAGATAAAAAATCAATGCTTTTCGGAGCTCTTT
GATGATTCATAATAACTTTTCGAATCGCATGGCCTTGCTGGCGATGGTTCATTCAAATTTCTGCCCTATCAACTTTCGATGGTAGGATAGTGGC
CTACCATGGTTTCAACGGGTAACGGGGAATAAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCCAAGGAAGGCAGCAGG
CGCGCAAATTACCAATCCCGACACGGGGAGGTAGTGACAATAAATAACGATACAGGGCCCTTTCCGGTCTTGAATTGGAATGAGTACAATGT
AAATACCTTAACGAGGAACAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTAAGTTGTTGCAAGTT
AAAAAGCTCGTAGTTGAACCTTGGGCTTGTTGGCCGGTCCGCTTTTTGGCGAGTACTGGACCAACCGAGCCTTTCCTTGGCTAACCTTTCC
CCCTTGTGGGGTTGGCGAACCGAGCTTTTACTTTGAAAAAATTAGAGTGTCAAGCAGCCTTGTCTCGAATATATTAGCATGGAATAATAGAA
TAGGACGTTATGGTCTATTTTGTGGTTTCTAGGACCCATCGTAATGATAATAGGGACGGTCCGGGGCATCAGTATTCAGTTGTGAGAGGTGAA
ATTCTTGATTACCTTGAAGACTAACTACTGCGAAAGCATTGGCCAATGACGTTTTTCAATCAAGAACGAAAGTAAAGGAATGCGAAGAGAGTC
AGATACCGTCGTAGTCTACCAAAACTATGCGACTAGGAATCGGGTGTGGCTTTTTTGGACCATCGGCACCTACCACACTCAAAGTCATTGATT
CTGTGGGTAGATGGGCGGGTGGACTGATGATAGAACAATAGAAAAAATAGAA

>NS8

ACAATTAGGTTACGGTATTGCTATTGGATTGAAAACTTCGGCTGCTGG

- T7

>NS1

GTGCGGAGTATCTAGTATAGCATTATACAGTGAAACTGCGAATGGCTCATTAAATCAGTTATCGTTATTTGATAGTACCTTTACTACTTGGATA
ACCGTGGTAATTCTAGAGCTAATACATGCTAAAAATCCCGACTGTTTGAAGGGATGTATTTATTAGATAAAAAATCAATGCTTTTCGGAGCTCTT
TGATGATTCATAATAACTTTTCGAATCGCATGGCCTTGCTGGCGATGGTTCATTCAAATTTCTGCCCTATCAACTTTCGATGGTAGGATAGTGG
CCTACCATGGTTTCAACGGGTAACGGGGAATAAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCCAAGGAAGGCAGCAG
GCGCGCAAATTACCAATCCCGACACGGGGAGGTAGTGACAATAAATAACGATACAGGGCCCTTTCCGGTCTTGAATTGGAATGAGTACAATG
TAAATACCTTAACGAGGAACAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTAAGTTGTTGCGAGT
TAAAAAGCTCGTAGTTGAACCTTGGGCTTGTTGGCCGGTCCGCTTTTTGGCGAGTACTGGACCAACCGAGCCTTTCCTTGGCTAACCTTTC
GCCCTTGGTGTGGTGGCGAACCGAGCTTTTACTTTGAAAAAATTAGAGTGTCAAGCAGGCTTGTCTCGAATATATTAGCATGGAATAATA
GAATAGGACGTTATGGTCTATTTTGTGGTTTCTAGGACCCATCGTAATGATTAATAGGGACGGTCCGGGGCATCAGTATTCAGTTGTGAGAGGT
GAAATTTGGATTACCTGAAGACTAACTACTGCGAAAGCATTGCCAAGGACGTTTTCAATTAATCAAGAACGAAAGTTAGGGGATCGAAGATG
ATCAGATACCGTCGTAGTCTAACCAATAAATAATGCGACTAGGGATCGGGTGTGGTCTTTTTTGGACCACTCGGCACCTTACGAGAAATCAAGT
CTTTGGGTTCTGGGGGGAGTATGGTCGAAGGCTGGAACATGAAATATGTGCACAGACGAGATACCACACAGT

>NS8

CGGGACAGCATGGACTTGCTCGTCATGACCAAGTTTACCAGCTTTTCGGTCCAGATGGAGTTGCCCTTCTTTAAACCAATCCGGAGGCCT
CACTAAGCCATTCAATCGTAGTAGCGACGGGCGGTGTGTACAAAGGGCAGGGACGTAATCAACGCAAGCTGATGACTTGCCTTACTAGGAA
TTCTCGTTGAAGAGCAATAATTACAATGCTCTATCCCGACGACGAGGAGTTTCAAGATTTCCAGACCTCTCGGCCAAGGTTAATACTCGTT
GGCTCCGTGAGTGTAGCGCGCTGCGGCCAGAACGCTAAGGGCATCACAGACCTGTTATTGCCCTCAAACCTCCATCGACTTGAATCGATAGT
CCCTCTAAGAAGTACTATACCAGCAAAGCTAGCAGCACTATTTAGTAGGTTAAGGCTCTGTTGTTATCGCAATTAAGCAGACAAATCACTCC
ACCAACTAAGAACGGCCATGCACCACCACCAAAATCAAGAAAGAGCTCTCAATCTGTCAATCCTTATTGTGTCTGGACCTGGTGGATTTCCCC
GTGTTGAGTCAAATTAAGCCGAGGCTCCACTCCTGGTGGTCCCTTCCGTCAATCCTTTAAGTTTCAGCCTTGCACACTACTCCCCAGAAC
CCAAAGACTTTGATTTCTCGTAAAGTGCAGTGCCTCAAAAAAAGAACAACCCGATCCCTAGTCGGCAGATGTTTGGTTAAGACTACGACG
GTATCTGATCATCTTCGATCCCTAACTTTCTGTTGATTAAATGAAACGCTCCTTGGCAGATGCTTTCGACAGTAGTTAGTCTTCAGTAATCCAGAA
TTTCACTCTGACTGAATACTGATGCCCGACCGTCTATAATCATTACGATGGTCTAGAACACAATAGACATACGCTATCTATTATTATGCT
ATATATCGAGCAAGGCTGCTTTGACACTCTAGTTTTCAAGTAAAGTCTGTGCGACACACAGGCGAAGTAGCAGAGATGATCGTGGGTCAGT
ACTCGAAGCGACGGCAGGACGACCCAGTCACTCAGCTTGAAGTGCCTACTGATACCATGACTGATGCGTGCCTGAGATCAGCAGGATACG
CGATGCGTGCAGAAAGTCCGAACTTCTCTGACAGTAGGTTGTTCCGAGGAAGC

>ITS4

TGGATCGGTATCTACTGATTGAGGTCAAACCTGTTTGTATATTGTAAGGCCGAGCCTAGAATACCGAGAAATATACCATTAAACTATTCAACGA
GTTGGATAAACCTAATACATTGAAAGTCATATAGCACTATCCAGTACCCTCATGCCAATACATTTCAAGCAAACGCTAGTTCAACTAAGAGTAT
CACTCAATACCAAAACCTAAGTTTGGAGAGAGAAATGACGCTAACCAAGGCTTCCGCTTGGAAATACCAGAGGGCGAATGTGCGTTCAAAGAT
TCGATGATTCACGAAAATCGCAATTCATATTACTTATCGCATTTCGCTGCGTCTTTCATCGATGCGAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTT
GAAGATTTTTGAATTTAATCAACAAATTGACAATTAATAAATAACAATTCATATAAATATTGAAGTTTGTAGTTAAGTAACTCTGGCCAAACT
ATTTCTAGTCCAGACCAAGCAAAAGTTCTTGTAAATAAAAAAACTGTGTGTAAGGTTTTTTCGCCGCGCAATTAAGCGCTGGCAAAAAGAA
TACTGTAATGATCCTCCGAGGTTACCTACGGAAACCTGTTACATTTTTCTTCAAAAAAGGAAAGGGGAGGGAG

- **T8**

>NS1

CGACATAGGTACTACTTTATTCCAGTGATGACGAGAAAGAAGGAGCGCT

>NS8

ACTCGGGCCTATCAAAAAAAAAATAAACTTAGCTAGACTATAGGTCACATCAGGCGGTACATTCA

- **T9**

>NS1

GTACCATTAGTCGATCATAGCCAACCTCATACTGTGCAACTGCGAATAGGGTCAATAAATGATACTATAGTTTAGAATGAAGGGACCGATACTA
CATGGATAACTGTGGTAATTTCTAGAGCTAATACATGCTGAAAAGCCCCGACTTCTGGAAGGGGTGATTTATTAGATAAAAAACCAATGGCGGG
TAACCGTCTTGCCTGATTCAATAAAGTCTGCAATCGCATGGCCTTGCGCCGGCGATGCTTCAATCAAATACCTGCCCTATCACTTTTCGATGG
TAGGATAGAGGCCTACCATGGTATGACGGGTAACGGGGAATAAGGGTTCGATTCGGAGAGAGGGCCTGAGAAACGGCCCTCAGTCTAAG
GGACGCAGCAGGCCGCAAAATATCCAATCCCGACACGGGGAGATAGTGACAATAAATAACAATATAGGGCTCTTTTGGTCTATAATTGGAA
TGAGTACAATTTAAATCCCTAACGAGGATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTCCAGCAGCCGCGTAATCCAGCTCCAATAGCGTATATTAATG
TTGTTGCCGTTAAAAAGCTCGTAGTCAACTTCGGCCTCTGCCACCCGGTCCGCTATTTGGGTGTGACTGGAGTGGAGGCTTACCTCGTG
GTGAACAGCCCATGTCTTTACTGGGTGTGGTCCGGGAACCATGACTTTTACTGTGAAAAAATTTAGAGTGTAAAAGCAGGCTTACTCCGAAT
ACAATAGCATGGGATAATAAAATAGACGTGCGGTCTATTTTGTGTTTCTAGATCGCCGTAATGATTAATAGGATATTGGGGCCTCCTCTTCA
ATTGTCGAGGTGAATTTCTGTATTTATTAACACAACAACCTGCCCCCATGTCTTATGATGATATAATGATCACACCAAGATAGGGGATGTTTACAT
CAGAAAACCTGTATTCTACGTCTATCATGCCGACTAGGGATCGATAAGCTATTTATGACTTTATGCCGCTCCCATGTCAACATTCAAATAATGTC
TGAGCTGAGGCTCGACTGCTAGTCTATCACGCATCACCATAAACAACAACAAAAATATCT

>NS8

TTTCGTTACGCTCACCTGCGTTGCCTGCCGTGTTCTGTACACACTTCTGCAGCGA

>ITS4

TAAATCGGTAGTCTGACTGATTTGAGGTCTAAAATTTAAAGTCTGTAATAGCGCATTAGAAGCACCTCTGACTTTTGAAGAAAACGTCTCAGC
GAAATAATTATTACGCCGAGTCAAGCCGTTATTTCAAATGGGTTGCTCGTGTATTTCAACTGAGCCGGCAATTACGCCGACAACAGTCATAATCC
AAGCCACGCCATCTCATTACAAAATAGGGGGTTGAGAGTTTCATGACACTCAAACAGACATACTCTCGGAATACCAAAGAGTGAAGGTG
CGTTCAAAGATTGATGATTCCTGCAATTCGCAATTCACATTACTTATCGCAATTCGCTGCGTTCTTATCGATGCGAGAGCAAGAGATCCGTT
GCTGAAAGTTTTATTTTATTTATGCTCAATAAAGAGACTGTACATTCTTACTATAGTGTAAAATGTGTGAAAAGAAGTGTGTGCACAGTGT
TGAAATGAAAGGTCGACCTCTAAAAGAGAGTCTAAAATTCATTAATGATCCTTCCGAGGTTACCTACGAAACCTTGTACGATTTTT
ACCTTCAAACAAAAAACGAAACCA

- **T10**

>NS1

GTAGCTTAATGCTCTAGATATAAACTATACAGTGAAGTGGCTCATAAATCAGTTATCGTTTATTGATAGTACCTTGCTAATTG
GCATACGCTGGCAATTCTAGAGCTAATACATGCAATCAAGCCCAACCTCTGGAAGGGGTGATTTATTAGATAAAAAATCAACAACCTTAGATG
ATTCATAATAAAGTGTGCAATCGCATGGCCTCGGGCCGGCGATGGTTCATCAAATTTCTGCCCTATCAACTTTTCGATGGTAGGATAGAGGCCTAC
CATGGTTTCAACGGGTAACGGGGAATAAGGGTTCGGTTCGGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCG
CAAATTACCAATCCTGACACAGGGAGGTAGTGACAATAAATAACGATACAGGGCCCTTTTGGGTCTTGAATTGGAATGAGTACAATGTAATA
CCTTAACGAGGAACAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGTAATCCAGCTCCAAGAGCGTATATTAAGTTGTTGCAGTAAAAA
GCTCGTAGTTGAAATTTGGGTGCCCCAGAAGGTCCACTTATTTGTGAGTACTTTTGGGACCGCCCTTCCATGGCTTATCCCTCGGGGTGGGC
CATAATTAATCTTGAAGTAAATGAGAGTGTCAAAGCAGGCAAGCGCTTGTATCTTTTATGATGGAATAATAAAATAGACGATGATTCTATTTTGT
TGTTTTTAGGACCATCGAATGATTAATAAGGACGGTCCGGGGGCAATTAGTATTAGTTGTAAGAGGTGAAATTTCTTAGATTTTCTGAAAACT
AACTACTGCGAAAGCATTGTCAGGGACGTTTTCTTAATCAGAACGAACGTTACGGGATCGGAGGATGATCAGATACCGTCTGATCTTACCATA
ACTCATGCGACTAGGGATTGGGGACGCCTCATGTAATGACGGTCAAGTACGACCATCAAAGTTTTGGTCTGTTGGTATGGTGCCAGTGT
GTACTTATAGTGCAGCCAACTACACAACAAAAAT

>NS8

CCCGATGCGACGGATGCATTCATCTATGACCAAGTTTGACCAGTTTCTCAGCATCAACCCGGGTTGCCAGCTTGAACCTAATCCAGAGGCCTC
ACTAAGCCATTCAATCGGTAGTAGCGACGGCGGTGTGTACAAAGGCGAGGACGTAATCAACGCAAGCTGATGACTTGCCTTACTAGGAAT
TCCTCGTTGAAGAGCAAAAATACAATGCTCTATCCCGACGACGAGGAGTTTCTCAAGATTTCCCAAACCTCTCGGCTAAGGTAACCTCGTGGC

TCCGTCAAGTGTAGCGCGCTGCGGCCAGAACGCTCTAAGGGCATCACAGACCTGTTATTGCCTCAAACCTCCATCGACTTGAATTCGATAGTCCTT
TTATGGCGCACACCAACAGAATTGTTAAGCTGCGCAAATAAAGCTAAGGTCCTGTTATCGCAATTAAGCAGACAAATCACTCCACCAAC
TAAGAACGGCCATGCACCACCACCAAAAATCAAGAAAGAGCTCTAATCTGTCAATCCTTATTGTGTCTGGACCTGGTGAGTTTCCCGTGTG
AGTCAAATTAAGCGCAGGCTCCACTCCTGGTGGTCCCTTCCGTCATTCCTTTAAGTTTCAGCCTTTGCGACCACTCCCCCCAGAACCCAA
AACTTTGATTTCTCGTAAGGTGCTGGGGCGCGTCATTACATGGGGGCGGTGCGCCAATCCCTAGTCGGCATAGTTTATGGTTAGACTACGACG
GTATCTGATCATCTTCGATCCCCTAACCTTCTGTTCTGATAATGAAAACGTCCTTGACAAATGCTTTCGCAGTAGTTAGTCTTCAGAAATCTAAGA
ATATCACCTTTACAAGTGAATACTAATGCCCCGACCGTCTATAATCATTACGATGGGTCCGTAGAACACCAAGAGAATCATCGTCTGATTT
TATTAATCATGCTAAAGATTACGCGCTGCTGCTTTGGACATCTCACTACTCAAGTAGTATGTCACCCGAGCATAAGCATGAACGCGTCGCACAGT
ACTCCAATAATGGACGCTAGGGTCGCGCATTACTACAGCTTACTGCAAGCTGATACCTAGACTGATACGACGACACCATCAGACATCTGACTC
AAGGGAGAAGTAGTTGACATACTTCTAACGAATGTACTGACTCAGCTAACCGGTCTACTGAAG

- **T11**

>NS1

GTTGTTAGCCTCATCTAGATATAAAACAATCTATACAGTGAAACTGCGAATGGCTCATTAAATCAGTTATCGTTTATTGATAGTACCTTGCTAATTG
GCATACGCTGGCAATTCTAGAGCTAATACATGCATTCAAGCCCAACCTCTGGAAGGGCTGATTTATTAGATAAAAAATCAACAACCTTAGATG
ATTCATAATAACTTGTGCAATCGCATGGCCTCGGGCCGCGCATGGTTCATTCAAATTTCTGCCCTATCAACTTTGATGGTAGGATAGAGGCCATC
CATGGTTTCAACGGGTAACGGGGAATAAGGGTTCGGTTCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCAAGGAAGGCGAGCGCGC
CAAATACCAATCCTGACACAGGGAGGTAGTGACAATAAATAACGATACAGGGCCCTTTGGGTCTTGAATTGGAATGAGTACAATGTAATA
CCTAACGAGGAACAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGTAATCCAGCTCCAAGAGCGTATATTAAGTTGTTGCAGTTAAAA
GCTCGTAGTTGAATTTGGGGTGGCCCAAGGTCCTTATTTGTGAGTACTTTTTGGGACCGCCCTCCATGGCTTATCCCTCGGGGTGGGC
CATAACTTCTGAGTAAATGAGAGTGTCAAAGCAGGCAAGCGCTTGAATCTTTAGCATGGAATAAAAAATAGGACGATGATTCTATTTTT
GTTGGTTTCTAGGACCATCGTAATGATTAATAGGACGGTCCGGGCTTATGATTAGTTGAGAGGTGAAATTTCTAGATTTTCTGAGACTAAC
TACTGCGAAAGCATTGTACAGCGTTTTTATTAATCAGAACGAAGTAGGATCGAGATGATCAGATACGTCGTAGTCTACCATAACTATGCGACTAC
GATGGCGACGCTCATGTAATAGCGCTCAGACTACAGAATCAGTTTGGTCTGGGGGAATTGTCCAGCTACTAGATGAGAAACA

>NS8

ATCAGTTACTGGTGGTAGAAGCTGACACAAATTGAAACGTTTTCTACAGCATCAACCCGGGTCATGCCCCAGCTTGAAACTTAATCCAGAGGCC
TCACTAAGCCATTCAATCGGTAGTAGCGACGGGCGGTGTGTACAAGGGCAGGGACGTAATCAACGCAAGCTGATGACTTGCCTTACTAGGA
ATTCCTCGTTGAGAGCAAAAATTACAATGCTCTATCCCCAGCAGCAGGGATTTCTCAAGATTTCCCAAACCTCTCGGTAAGGTAACCTCGTG
GCTCCGTCAGTGTAGCGCGTGGGCCAGAACGCTAAGGGCATCACAGACCTGTTATTGCCTCAAACCTCCATCGACTGAAATTCGATAGTC
CTTTTATGGCGCACACCAACAGAAATTGTTAAGCTGCGCAAATAAAGCTAAGGTCTCGTTGTTATCGCAATTAAGCAGACAAATCACTCCACCA
ACTAAGAAGCGCCATGCACCACCAACCAAAAATCAAGAAAGAGCTCTCAATCTGTCAATCCTTATTGTGCTGGACCTGGTGAGTTTCCCGT
GTGAGTCACAATTAAGCCGACGCTCCACTCCTAGGTGGTGCCTATTCTGTTTAAATCCTCTTAAATTTAGCCTTGCAGCATAAATCCCCCG
AAACCCAAAACTTTGGATTTCTCGTAAAGGTGCTGGGCTCCTCATATAGCATGTAGGCGTCGCCCAACTCTACTCGCCATAATTTATGGGT
AAGAACTACGAACGGATCTGATCATCATTGCAATCCCTTAACTTTCTTCTTGAATAATGAAACTCACTTACACATGCTTTGCGTAGTTAGTCC
TCAAAAAATCTAAGAAATTTCCCTGACAACCTGAATACTAACGCCCGCAACGCTCCCTTTTATTCTTATGATGGGTCTTGAACGACATAAGGA
AAACGCCGCTATTTGCTACGCTCTGGCAAAGATCAACGATGCCATGCATTGAACTTCTACTTACTAGCTAATGGGCTAACCCACCCGCG
CATTATTTAGTACACGGCTCAGAAGTACCACAGCTAATGAACTATTGCCCTCGCAATCTACATACAGACGTTACACGGTATACACTG
AAAATACGTACTTAGACCGTGTAGTATATTGATGAAATTTGATCAGTATCGAATATTCCCTCGCAATACTACGCCAGCACTCGTGTACTACACATT
TTATCTCTGTATAGAGCAAGTTGGACAGTTTTCATAGCGAGCATCCCGGTTGCGCACAGCCATGAAAATATACACTAG

- **T12**

>NS1

GTGATGCATGAGATAGTATAAACAATCTATACAGTGAAACTGCGAATGGCTCATTAAATCAGTTATCGTTTATTGATAGTACCTTGCTAATTGGC
ATACGCTGGCAATTCTAGAGCTAATACATGCATTCAAGCCCAACCTCTGGAAGGGCTGATTTATTAGATAAAAAATCAACAACCTTAGATGATT
CATAATAACTTGTGCAATCGCATGGCCTCGGGCCGCGCATGGTTCATTCAAATTTCTGCCCTATCAACTTTGATGGTAGGATAGAGGCCATACAT
GGTTTCAACGGGTAACGGGGAATAAGGGTTCGGTTCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCAAGGAAGGCGAGCGCGCAA
ATTACCAATCCTGACACAGGGAGGTAGTGACAATAAATAACGATACAGGGCCCTTTGGGTCTTGAATTGGAATGAGTACAATGTAATACT
TAACGAGGAACAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGTAATCCAGCTCCAAGAGCGTATATTAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCT
CGTAGTTGAATTTGGGGTGGCCCAAGGTCCTTATTTGTGAGTACTTTTTGGGACCGCCCTCCATGGCTTATCCCTCGGGGTGGG
CCATAATTTACTTTGAGTAAATGGAGAGTGTCAAAGCAGGCAAGCGCTTGAATCTTTTAGCATGGAATAATAAATAGGACGATGATTCTAT
TTTTGTTGGTTTTCTAGGACCATCGTAATGATTAATAGGGGACGGTTCGGGGGCGAGTAGTATCAGTTGTAGAGGGGAAATTTCTTAGGATTTTC
TGAAGACTAACTACTGCGAAAGCATTGTCAAGGACGTTTTTATTAATCAGAACGAAAGTTAGGGATCGAGATGATCAGATACCGTCTGATCTAT
CATAAACTATGCGACTAGGATGGCGACGCTCAAGTAATGACGCGCCAGCACCTACCAGAATCAAGTTTGGTCTGGGGGAGTATGTCGCAAGC
TGACCTACGATGCGCAGACAACACACACACAACAACA

>NS8

TTCCAGCTCGTACGATCATATCGTCGTCATGACCAAGTTTAGACCAGTTTCTCAGCATCAACCCGGGTTGCCCCAGCTTGAACTTAATCCAGAGG
CCTCACTAAGCCATTAATCGGTAGTAGCGACGGCGGTGTGTACAAAGGGCAGGGACGTAATCAACGCAAGCTGATGACTTGCCTTACTAGG
AATTCCTCGTTGAAGAGCAAAAATTACAATGCTCTATCCCCAGCACGACGGAGTTTCTCAAGATTTCCAAACCTCTCGGCTAAGGTAACCTCGCT
GGCTCCGTGAGTGTAGCGCGCTGCGGCCAGAACGCTAAGGGCATCACAGACCTGTTATTGCCTCAAACCTCCATCGACTTGAATTCGATAGT
CCTTTTATGGCGCACCCCAACAGAATTGTTAAGCTGCGCAATAAAAGCTAAGGTCTCGTTTCGTTATCGCAATTAAGCAGACAAATCACTCCACC
AACTAAGAACGGCCATGCACCACCACCACAAAATCAAGAAAGAGCTCTCAATCTGTCAATCCTTATTGTGTCTGGACCTGGTGAGTTTCCCGT
GTTGAGTCAAATTAAGCCGAGGCTCCACTCCTGGTGCCCTCCGTCATCCTTAAAGTTTTCAGCCTTGCAGCATACTCCCCACGAAACC
AAAAACTTTGATTTCTCGTAAGGTGCTGGGCGCTCATTACATGAGGCGTCGCCCAATCCCTAGTCGGCATAGTTTATGGTTAAGACTACGACG
GTATCTGATCATCTTCGATCCCTAACTTTCGTTCTTGATTAATGAAGACGCTCTTGACAAATGCTTTCGAGTAGTAGTCTTCAGAAAATCTAAGA
ATTTACTTCTTACACTGATACTAATGCCGCCGACCGTCCCTATTAATCATTACGATGGTCGTAGAAAACAACAAAATAGAATCATCGTCTAGTTAT
ATTACATGCTGGAGATTACGCGCTGGCTGCTTTCGACATCACATTACTCAAAGTATATGTCATCCGACGCAAGCATGACGCGTGCAGTACACAA
TATGACTGTGGCTGCGGATCACTCAAGCTTACGTTACTGAACGCTTAACTGATACGATCAGCATCGAGCAGACGAAGAACGGGGAAAACGTGT
AATACTCTACTGACGTGACGCTGTACACCGTGTGACTGAACATACAGCATCTAGACATC

- **T13**

>NS1

GGGGGGGAGATAGAAACCAACGTAGATTAGACAAAATTATTCAGCGTCGGTGCCATTGGCCTTTCGGGGCACCCGCCCATCTGCAGAAAAG
GAGACATACCCAGGTCCAGCCGGCAATCTTTCCTGGGAACGGGGTATTGGATTTTTAATTTTGAATTTTTAGTGCTTAGCGGCTCATAC
GCCAATACTACCCATGAACAAATAAAAAAGGACGTGCTGCTATTTTTTCGGTTTCGGGGATCCCTATATGGTTTATAGGGAGGTTGGG
GGCATTGGTTTTAAGTTGTAAGGTGAAATTTTAAAAATTCAGGAAAACCTAAGGCAAAAACCTTTCGGCCAGGCGCTTTTTCTTTAAACAAA
AAAAAAGGTAAGGGGACCAAAAACGATAAAAAACCGTTTTTATTTTTAAAAATTAATAATCCCCACAAGGAATCGGCCCTTTAAACTTT
TGACGGGGCCGCCCTTAAAAAAGCCTTTGGTTTTGGGGGGATTTGGGCCAGGGCGGAAATTAAGGGATTTGACGGAAGG
GCCCCCGGGGGGAAACCCCGGGTATTTTTACTCAAAAAGGAAAACCTCCCGGGTCCAAACAACATAAGGTGAAAAAGAAAAACCC
TTTTTTTTCTAGGGGGGGGGGATGGACACATAATTTGGCGAATATTTATCGGGTATTCCAGACGAAACAAAACCTGACCTGCTCTATATC
ATCCCGCATAATGTGTCGTACATCATAAGGAGTGACACAGTTTATCTGGTGTATATTCTGTGAGAAAAAGAGTGTGCACTCACACTAGTG
TCACGCCCGTCCCTGATCACCAGCGAAAACAAAAGCAAAAAAGAGAGCGTCTACTACTCTCCGCGGAGGACGACGATCTCAACTC
GACGACGAGTACGAGAGATGGTGTCCATCATCAATACGTATGCGCACGGAGCAGGCGACAGTATAATCGTCAGCACTCGACATCCAGATAC
AACTAACGCACAGTAATCGTGACTGTACATGGACTCTCATGACAGACACCCG

>NS8

CAAAAGTACTATTGAATCCAAGATATAACTTGTCTTGTACTCTGCTACAGACCGAAAATTCAAATTTGTCCTGACCCATCTACTCTAAT
TTATCGTTGAAACTAAAAGCATACAACCTGTAACCCCAAAAACGTAAGCCTGGTATTTTAAATAAAAAACCAATGGGTGCAACCCCTTCTTG
GTGATTATGATAACTTCTAATCCCATGGCCTGTGCCGCAATGCTTATTCAATATCTGCCCTATCAACTTTCAGGCTAGGATAAAGGGCAA
ACATGGTGCAACGGATAAAAAGAAATAGGGCAAAATCCGGAGGAGAAGCCTGAAAAAAGGTACAATTAAGGGAGGCAACTGCCGGCA
TATTAATAATCCGAAAGGGGAGGTAAGGAAATAAAAAAATACGGGCCCGGAGTCTGGATTGGAGGAGTACCAACAAAACCTTAAGAA
AACCATGGAGGTAATTTGGGGAATAAACCCGGTAATTTGACCTCAAAAACCCCTATTAAGGTTGTTCAATTTAAACCCCTTTTTTACATCCT
AGGGGGGGGGGGGGGGGGGGCTCCCTAAAAGTTTAAAAACACAGGGGGGCGCCCTTTTCCCTTTTGGCCCCCCCCCCCCCTTTTCCGGGG
TTGGGGGGGAAACAGGAATTTTTTTTTTAAAAAAGAGGGGTCAAAATCAGGGGGTCCCCCCCCAAAATTAACAGGAAAATACCCAA
AAACCCCTGCCCCCTATTTTTTTTCAACCCAAAATTTTTAAAAGGAGACGTTTGGGGGGCGTTTTTTTGCATGCGCGGGCCG
GAATTTAAAAATTTTTTAAAAACAAAAAAGGGGGGGCCCCCCCCGTTGGGTTATCTACTAAAACACCCCCCCCCGGAGGAGGGGGGG
GGACTACGAAGAATATATAGTGATATACTCTCCACTGTCCCGGGGGTGCGGCGCAACAGAATTTTTTATTGTTGGGCCGCCCTC
TCATACAAAAATTTTTTTTTGTTGCTCCGAGCGAGCGTCTCTCGTAGTAGCAACACAAAAATAAAAAATGATGT

- **T14**

>NS1

GGGATCATCCATGTCTAGTATAACAAATTCATACTGTGAAACTGCGAATGGCTCATAAATCAGTTATAGTTTATTGATGGTAACCTGCTACATG
GATAACTGTGGTAATTTCTAGAGCTAATACATGCTGAAAAGCCCGACTTCTGGAAGGGGTGATTTATTAGATAAAAAACCAATGGGTGCAAGC
CCTTCTGGTGATTCATGATAACTTCTCGAATCGCATGGCCTGTGCCGGCATGCTTATTCAAATATCTGCCCTATCAACTTTCGATGGTAGGAT
AGAGGCTACCATGGTGGCAACGGGTAACGGGGAATTAGGGTTCGATTCGGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCAAGGAAGGC
AGCAGGCGCGCAATACCAATCCGACACGGGGAGGTAGTGACAATAATAACAATACAGGGCCCTTTGGGTCTGTAATTTGAAATGAGTAC
AATTAATCCCTAACGAGGAACAATTGGAGGGCAAGTCTGGTCCAGCAGCCGGTAATCCAGCTCCAATAGCGTATATTAAGTTGTTGC
AGTTAAAAAGCTCGTAGTTGAACCTCAGGCTTGGCGGGTGTCTGCCTAACGGTATGTACTATCCGGCTGAGCCTTACCTCTGGTGGCTGC
ATGTGCTTTATTCGGTGTGAGGGGAACAGGAATTTACTTTGAAAAAATTAGAGTGTCAAAGCAGGCATATGCCGAATACATTAGCATGGA
ATAATAGAATAGGACGTGCGTTCTATTTTGTGGTTTCTAGGATCGCCGAATGATTAATAGGGACGGTTGGGGCATTAGTATTAGTTGCTA
GAGGTGAAATTTAGATTACTGAAGACTAACTACTGCGGAAGCATTTGCCAAGGACGTTTTTATAATCAAGACCGAAAGGTAGGGGATCAAA
ACGATTAGATACCGTTGATCTACAGTAATGACCGACTAGGATCGGGCCACGTCATCTTTGACTGCTCGGCACGTACGAGAAATCAAGTCAT
TGGGTCTGGGGGAGGATCGGCCGAGGCTAGACTTAAGAAATGACTGAGAGATAA

>NS8

TATCGAGGCGCCTGACTTGAGAGCGTAATGACCAAGTTTGATCAGCTTTTCAGCAATAGGTAGCCGTTGCCAGCTTCCCAAAGCCAATCCGGAGA
TCTACTAAGCCATTCAATCGGTAGTAGCGACGGGCGGTGTACAAAGGGCAGGGACGTAATCAACGTGAGCTGACTCACGCTTACTAGG
CATTCTCGTTGAAGAGCAATAATTGCAATGCTCTATCCCCAGCACGACTGAGTTTCACAAGATTACCCAGACCTTTCCGGCCAAGGTTATAAACTC
GCTGGCTCAGTCAGTGTAGCGCGCTGCGGGCCAGAACATCTAAGGGCATCACAGACCTGTTATTGCCTCAAACCTTCCAACAGTAAACGCTGTT
AGTCCCTAAGAAGTCAGCGACCAGCAAAGCCGGCCGGACTATTTAGCAGGTTAAGGTCTCGTTATCGGAATTAACCAGACAAATCACT
CCACCAACTAAGAACGGCCATGCACCACCACCCATAGAATCAAGAAAGAGCTATCAATCTGTCAATCCTTACTATGTCTGGACCTGGTGAGTTTC
CCGTGTTGAGTCAAATTAAGCCGAGGCTCCACGCTGGTGGTGCCCTTCCGTCAATTCCTTTAAGTTTCAGCCTTGCACCATACTCCCCCAGA
ACCCAAAGACTTTGATTTCTCGTAAAGTGCCGAGCCAGTCAAAGATGAACGTGGCCCGATCCCTAGTCGGCATAGTTTACTGTTAAGACTACAA
CGGTATCTAATCGTTTTGATCCCCTAACCTTCGTTCTTGATTGATGAAAACGCTTGGCAGATGCTTTCGCAGTAGTTAGTCTTCAGTAAATCTA
AAATTTCTCTAGCAACTGATACTAATGCCCCCACCCTCCCTATCAATCATTACGCGATGCGTAGATATCAACAAAATAGACGGGCACGTCGT
ATTCTATTATTACATGCTATGTAGTCGGGCATATGCTGCTTTGACACTTCTACTCTTCAAGTAAGATCAAGATCGCGTACCACGGATAACGAATG
CAGGCTCACAGAGTAGCTAGCGGATGTACTACGTAAGCGACAGCCGAGCTGATTCACTCGGCTTTTACGCTAACTAATACCAATGACTGATCG
TGGGATGCATCGACTATAAGGCTATACCGTTGTACATTCTAATAGCACCTGTAGCTTCCAAATAGTCGTTGACTCA

>ITS4

GGATCCGGTATCTACTTGATTGAGGCCAGATGTCAAAGTTACACAATGAGTAACATCCAAAGATGCACTTAAAGTGATGGTTTAGTTAGCAGACA
GTAGTCTAGGTCCTGGCCATCCGAAGATGTCTCAGCAAATACTTATTATGCCAAGTCAAACCAAGTCATATAGACAGATCCAAGCTAATACTTTT
AAGATGAGTCGGTTCATCACCGGCAAACATCCAAATCCAAACTCAAGCATGGATCGAAATCCAAAACCTGGGTTTGAGGGTTTCATGACACTCAA
ACAGGCATGCTCCTCGGAATACCAAGGAGCGCAAGGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCATTT
GCTGCGTCTTCATCGATGCGAGAGCCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTATTATGTTATAATAAGACTACATTTGTTACAATAATGTTTAGTTTA
AAAGTGGATGCAAGCATCCAACAGTGCACAGGTGTTATGGATATGAAAGAAGAACCCTGGCTTTCGCCTATGGTTCAATCTAAATTCATTAATG
ATCCTCCGCAGGTTACCTACGGAACCTTGTCATTTTTTTTTTCCAAAAAATAAATCCCTTTAAA

Anexo II: Ensayos enzimáticos

Cepa	Temp	Actividad Lipolítica Sustrato: Tween 80		Actividad Proteolítica Sustrato: Caseína		Actividad Celulolítica Sustrato: Carboximetil celulosa		Actividad Proteolítica Sustrato: Gelatina		Actividad Amilolítica Sustrato: Almidón		Actividad Xilanasas Sustrato: Xilano		Actividad Ligninolítica Sustrato: Lignina		Actividad Lipolítica Sustrato: Tributirina	
		Diámetro colonia	Diámetro halo+colonia	Diámetro colonia	Diámetro halo+colonia	Diámetro colonia	Diámetro halo+colonia	Diámetro colonia	Diámetro halo+colonia	Diámetro colonia	Diámetro halo+colonia	Diámetro colonia	Diámetro halo+colonia	Diámetro colonia	Diámetro halo+colonia	Diámetro colonia	Diámetro halo+colonia
T4	25	5,0	39.0	5,0	X	SC	X	3,0	X	5,0	13.0	6,0	48.0	5,0	X	SC	X
		4,0	36.0	6,5	X	SC	X	3,5	X	6,0	12.0	7,0	51.0	5,0	X	SC	X
		5,0	39.0	5,5	X	SC	X	3,0	X	5,0	12.0	6,0	48.0	5,5	X	SC	X
	20	5,0	37.0	6,0	X	SC	X	4,5	X	6,0	13.0	6,0	42.0	4,5	X	SC	X
		4,0	34.0	6,0	X	SC	X	5,0	X	6,0	12.0	6,0	44.0	4,0	X	SC	X
		4,0	32.0	5,5	X	SC	X	5,0	X	7,0	14.0	5,0	41.0	4,5	X	SC	X
	15	3,5	25.5	6,0	X	SC	X	4,5	X	6,0	14.0	5,0	X	4,0	X	SC	X
		4,5	30.5	5,0	X	SC	X	4,0	X	5,0	9.0	6,0	X	4,0	X	SC	X
		4,5	28.5	5,0	X	SC	X	4,0	X	5,0	9.0	5,5	X	3,5	X	SC	X
	10	3,5	29.5	6,0	X	7,0	X	SC	X	4,5	X	7,0	X	4,0	X	SC	X
		3,5	27.5	6,5	X	6,0	X	SC	X	5,0	X	6,5	X	4,0	X	SC	X
		3,0	31.0	6,5	X	6,0	X	SC	X	4,5	X	7,0	X	5,0	X	SC	X
5	3,5	19.5	4,0	X	6,0	X	SC	X	3,0	X	4,0	X	SC	X	SC	X	
	3,0	23.0	4,0	X	6,0	X	SC	X	3,0	X	3,5	X	SC	X	SC	X	
	3,0	21.0	4,5	X	7,0	X	SC	X	3,0	X	3,0	X	SC	X	SC	X	
T5	25	4,0	X	6,0	X	5,0	X	4,0	X	3,5	X	4,0	X	4,5	X	SC	X
		3,5	X	6,0	X	5,0	X	4,5	X	4,0	X	3,5	X	4,5	X	SC	X
		4,0	X	5,5	X	6,0	X	3,5	X	4,0	X	3,5	X	5,0	X	SC	X
	20	6,0	X	8,0	X	5,0	X	5,0	X	6,0	X	5,0	X	5,0	X	6,0	X
		6,0	X	6,5	X	5,0	X	4,5	X	7,0	X	5,5	X	5,5	X	5,5	X
		5,5	X	7,5	X	6,0	X	5,0	X	6,0	X	5,0	X	5,0	X	6,0	X
	15	4,5	X	6,0	X	4,0	X	4,5	X	5,5	X	5,0	X	5,5	X	7,0	X
		5,0	X	7,0	X	5,0	X	4,5	X	6,0	X	5,0	X	5,5	X	7,0	X
		5,0	X	7,0	X	5,0	X	4,5	X	5,0	X	6,0	X	5,0	X	7,0	X
	10	5,0	X	7,5	X	6,0	X	SC	X	8,0	X	6,0	X	6,0	X	7,5	X
		5,0	X	7,5	X	5,0	X	SC	X	7,0	X	5,0	X	6,0	X	8,0	X
		5,0	X	7,0	X	6,0	X	SC	X	7,0	X	6,0	X	5,0	X	7,5	X
5	4,0	X	7,0	X	5,5	X	SC	X	5,0	X	3,5	X	3,5	X	5,0	15.0	
	4,0	X	7,0	X	5,0	X	SC	X	4,5	X	4,0	X	4,0	X	5,0	15.0	
	3,5	X	6,0	X	6,0	X	SC	X	4,5	X	3,5	X	4,0	X	4,0	14.0	
T7	25	4,0	X	8,0	X	3,5	X	4,0	X	5,5	X	6,0	X	5,5	X	6,0	X
		3,5	X	7,0	X	4,0	X	3,5	X	5,5	X	6,0	X	5,5	X	5,5	X
		4,0	X	8,0	X	4,0	X	4,0	X	4,5	X	5,0	X	5,0	X	6,0	X
	20	4,5	X	8,0	X	SC	X	5,0	X	6,0	X	7,5	X	4,5	X	7,5	X
		4,0	X	7,5	X	SC	X	5,0	X	6,0	X	7,0	X	5,0	X	6,0	X
		4,5	X	6,5	X	SC	X	5,5	X	4,5	X	8,0	X	5,0	X	7,0	X
	15	5,0	X	7,0	X	SC	X	5,0	X	6,0	X	5,5	X	6,0	X	6,0	X
		4,5	X	7,5	X	SC	X	4,5	X	6,5	X	6,0	X	5,0	X	6,0	X
		4,5	X	7,5	X	SC	X	5,0	X	6,0	X	6,0	X	5,0	X	6,0	X

10	5,0	X	8,5	X	SC	X	SC	X	7,5	X	6,0	X	5,5	X	7,0	X
	5,0	X	7,5	X	SC	X	SC	X	6,0	X	6,5	X	5,0	X	6,0	X
	4,5	X	8,0	X	SC	X	SC	X	6,0	X	6,0	X	5,5	X	7,0	X
5	3,0	X	8,0	X	SC	X	SC	X	4,5	X	4,5	X	4,0	X	4,0	12,0
	3,5	X	7,5	X	SC	X	SC	X	4,0	X	4,0	X	3,5	X	5,0	13,0
	4,0	X	7,5	X	SC	X	SC	X	4,0	X	5,0	X	4,0	X	4,0	11,0
T9	5,0	18.5	6,5	X	6,0	X	4,0	X	5,5	17.5	4,0	X	5,5	X	4,0	X
	4,5	15.5	6,0	X	5,0	X	3,5	X	6,0	20.0	4,5	X	4,0	X	4,5	X
	4,5	17.5	7,0	X	5,0	X	3,5	X	6,0	16.0	4,0	X	4,0	X	4,0	X
	4,0	26.0	5,5	X	SC	X	4,5	X	5,5	17.5	4,5	X	5,0	X	4,0	X
	4,0	26.0	6,5	X	SC	X	4,5	X	5,0	C	5,0	X	4,5	X	4,0	X
	4,0	28.0	6,5	X	SC	X	4,5	X	5,5	C	5,0	X	5,0	X	4,0	X
	4,0	18.0	4,5	X	SC	X	4,0	X	5,5	X	4,5	X	5,0	X	4,5	X
	4,0	20.0	5,0	X	SC	X	3,5	X	5,0	X	4,5	X	5,0	X	4,5	X
	4,5	20.5	4,5	X	SC	X	4,0	X	6,0	X	5,0	X	4,5	X	4,5	X
	4,0	22.5	6,0	X	SC	X	SC	X	6,5	X	5,0	X	4,5	X	4,0	X
	4,0	20.5	6,0	X	SC	X	SC	X	6,0	X	4,0	X	4,5	X	4,0	X
	4,5	20.5	6,0	X	SC	X	SC	X	6,0	X	5,0	X	4,0	X	4,0	X
2,5	20.5	5,0	X	SC	X	SC	X	4,0	X	4,5	X	4,0	X	SC	X	
2,5	20.5	5,0	X	SC	X	SC	X	4,0	X	4,0	X	4,0	X	SC	X	
3,0	19.0	5,5	X	SC	X	SC	X	4,0	X	3,5	X	3,5	X	SC	X	
T14	3,0	39.0	6,0	X	SC	X	4,0	X	6,0	32.0	5,0	49.0	4,5	X	SC	X
	3,0	37.0	6,0	X	SC	X	4,0	X	7,0	35.0	5,5	49.5	5,0	X	SC	X
	3,5	41.5	5,0	X	SC	X	4,5	X	6,0	32.0	5,0	47.0	5,5	X	SC	X
	4,5	42.5	5,5	X	300	X	4,5	X	4,5	24.5	5,5	41.5	6,0	X	SC	X
	4,0	44.0	6,0	X	350	X	5,0	X	6,0	30.0	6,0	42.0	6,0	X	SC	X
	4,0	42.0	6,5	X	300	X	4,5	X	7,0	31.0	6,5	42.5	5,0	X	SC	X
	4,0	40.0	5,0	X	SC	X	4,5	X	6,0	32.0	5,0	X	5,0	X	SC	X
	4,0	38.0	4,5	X	SC	X	4,0	X	6,5	32.5	6,0	X	5,0	X	SC	X
	4,0	C	4,5	X	SC	X	4,5	X	5,0	29.0	7,0	X	6,0	X	SC	X
	4,0	36.0	6,0	X	SC	X	SC	X	6,0	32.0	6,0	X	5,0	X	SC	X
	5,0	41.0	6,0	X	SC	X	SC	X	6,5	32.5	6,5	X	6,0	X	SC	X
	5,0	37.0	6,0	X	SC	X	SC	X	6,0	30.0	6,0	X	6,0	X	SC	X
3,0	23.0	5,0	X	SC	X	SC	X	5,0	15.0	4,0	X	5,0	X	SC	X	
3,0	21.0	4,5	X	SC	X	SC	X	5,0	19.0	5,0	X	4,5	X	SC	X	
3,0	21.0	6,0	X	SC	X	SC	X	5,0	17.0	4,0	X	4,0	X	SC	X	

Tabla 1. Las medidas se presentan en "mm". Todas las cepas se dejaron incubando durante 10 días. En negrita se remarca donde se obtuvo actividad. X = Sin actividad. SC = Sin crecimiento. C= Contaminado.

Medios de cultivo

Medio con almidón

Extracto de Levadura	1g/l
Almidón	10g/l
Sales marinas	30g/l
Agar	20g/l

El revelado se realiza con lugol. El lugol reacciona con el almidón tornándolo de color azul oscuro/negro. En caso de actividad, la presencia de halo se justifica por la ausencia de almidón en esa zona debido a la degradación del mismo por las enzimas extracelulares.

Medio con Xilano (Teather & Wood, 1982)

Extracto de levadura	1g/l
Xilano	10g/l
Sales Marinas	30g/l
Agar	20g/l

El revelado se realiza incubando con rojo Congo al 0.025% durante 30 min. Luego se realizan lavados con una solución de NaCl 1N hasta revelar la presencia de halos. El rojo congo se une a polisacáridos como la celulosa o el xilano. En caso de haber actividad Xylanasa, la degradación del polímero genera monómeros impidiendo la coloración con la tinta. De esta manera se visualiza una zona clara (traslúcida) en forma de halo alrededor de la colonia.

Medio con Carboximetil celulosa (CMC) (Teather & Wood, 1982)

CMC	0.4g/l
Sales Marinas	30g/l
Agar	12g/l

Debido a su similitud estructural con la celulosa, el revelado se realiza de la misma forma que el medio con xilano.

Medio con Caseína (Paterson & Bridge, 1994)

Leche descremada (al 15%)	25ml/l
Glucosa	10g/l
Agar	12g/l
Sales marinas	10g/l
pH	5.4

Medio con Gelatina (Paterson & Bridge, 1994)

Gelatina (al 8%)	54ml/l
Peptona	3g/l
Extracto de carne	3g/l
Agar	12g/l
Sales marinas	10g/l

Medio TSA con Lignina (Mtui & Nakamura, 2004)

Triptona	15g/l
Soytona	5g/l
Rhemazol Brilliant Blue	0.5g/l

(RBBR)	
Sales marinas	10g/l
Agar	15g/l
pH	7

Medio con Tween 80 (Paterson & Bridge, 1994)

Peptona	10g/l
Sales marinas	10g/l
Agar	15g/l
Tween 80 (al 10% v/v)*	10ml/l

*Se autoclava la solución de Tween 80 y el resto del medio por separado. Una vez que el medio se enfrió a 65°C aproximadamente, se agrega la solución de Tween 80

Medio con Tributirina (Atlas, 2010, pág. 1814)

Tributirina (Gliceril tributirato)	10g/l
Extracto de levadura	3g/l
Peptona	5g/l
Agar	15g/l
Sales marinas	10g/l
pH	7

El medio se agitó durante 15 minutos a 12.000 rpm con el fin de dispersar la tributirina. La actividad se detecta mediante la aparición de zonas claras/traslucidas alrededor de la colonia.

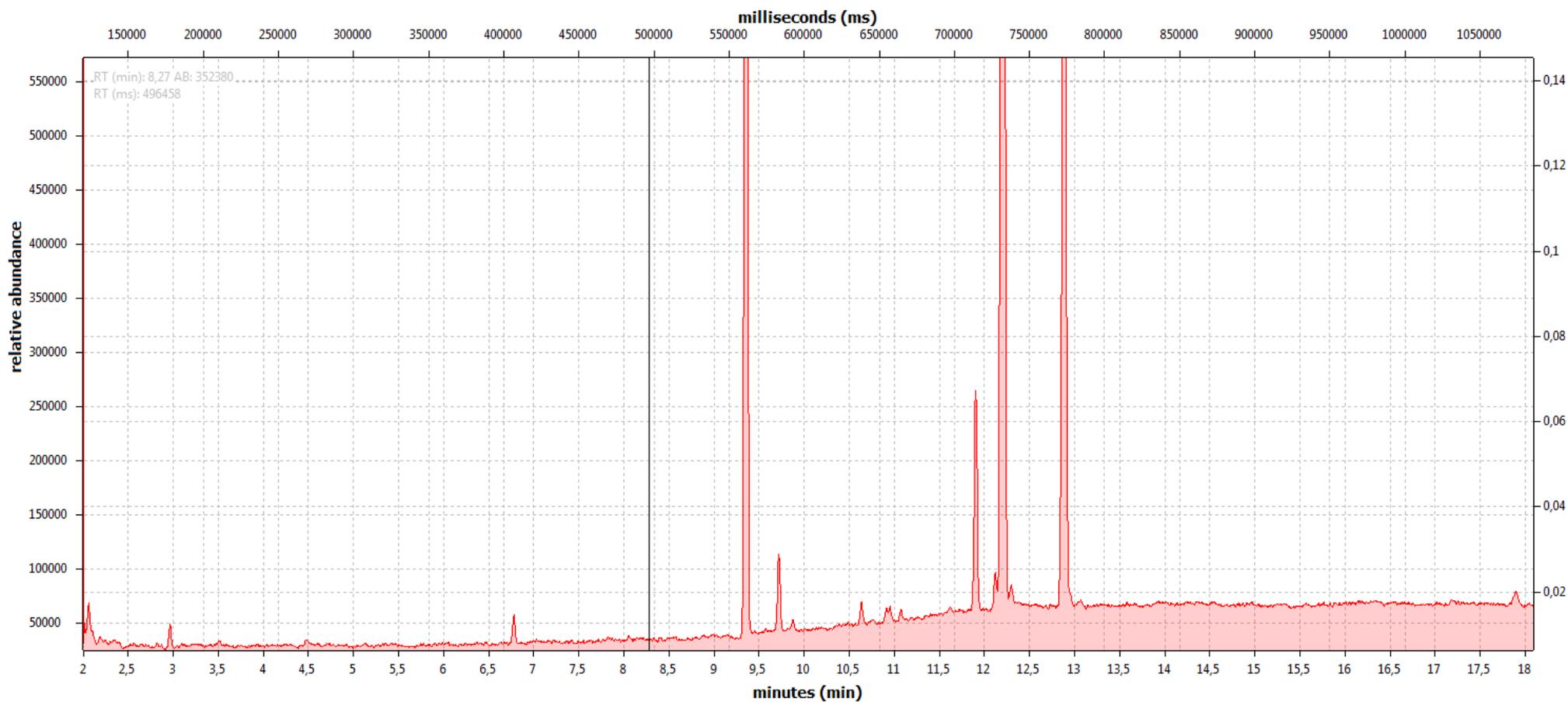
En los medios con caseína, gelatina, lignina, tween 80 y tributirina, en caso de actividad, el halo se observa sin requerir revelado y la presencia de halo se justifica por la ausencia del sustrato en esa zona debido a la degradación del mismo por las enzimas extracelulares.

Anexo III: Perfil de ácidos grasos

Se presentan los perfiles completos determinados para cada cepa analizada.

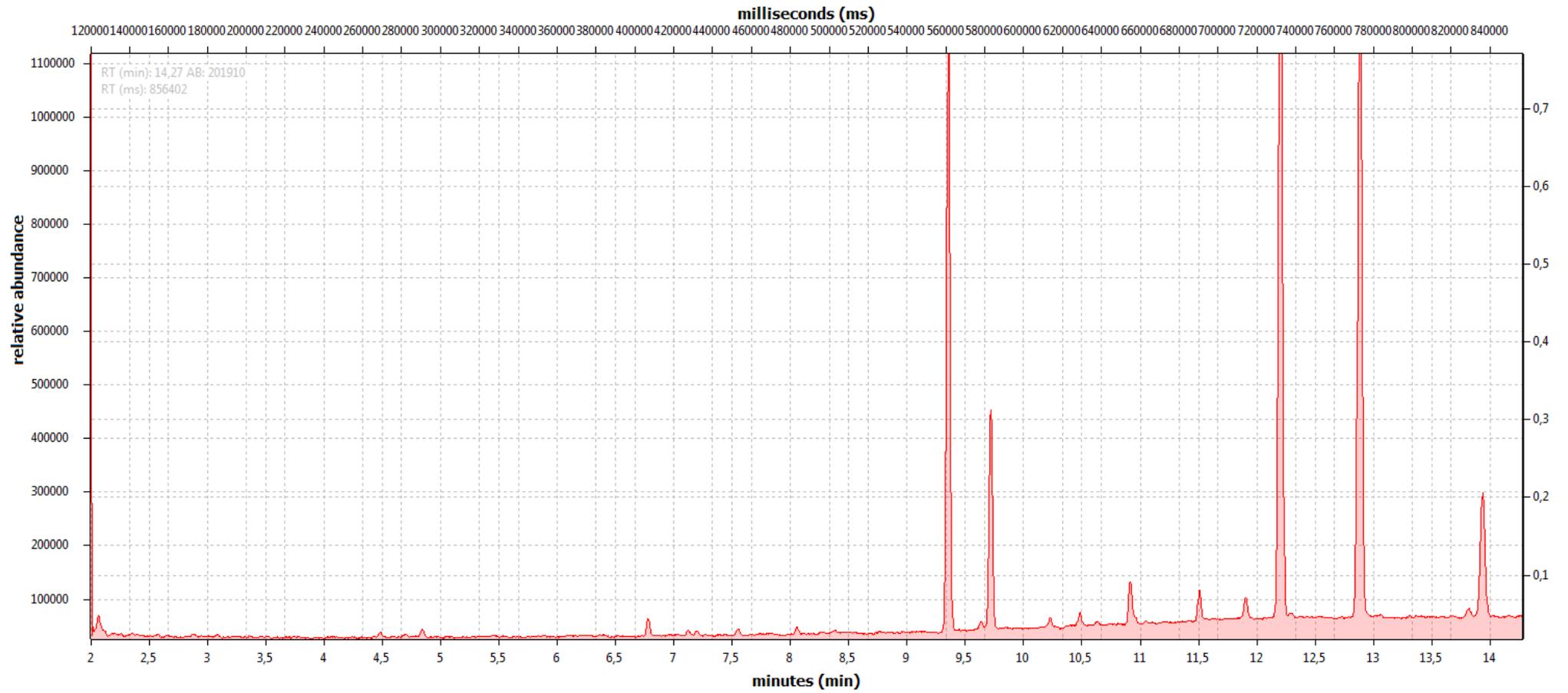
Los compuestos en **negrita** son compuestos plenamente identificados. El resto son compuestos tentativos ya que solo se cuenta con el espectro de masa. Para identificarlos plenamente sería necesario compararlos con un estándar y calcular el LRI con la información en bibliotecas. Los compuestos "NI", son compuestos no identificados de los cuales no hay información en bibliotecas y tampoco se encuentra en el estándar utilizado.

- **Perfil T4**



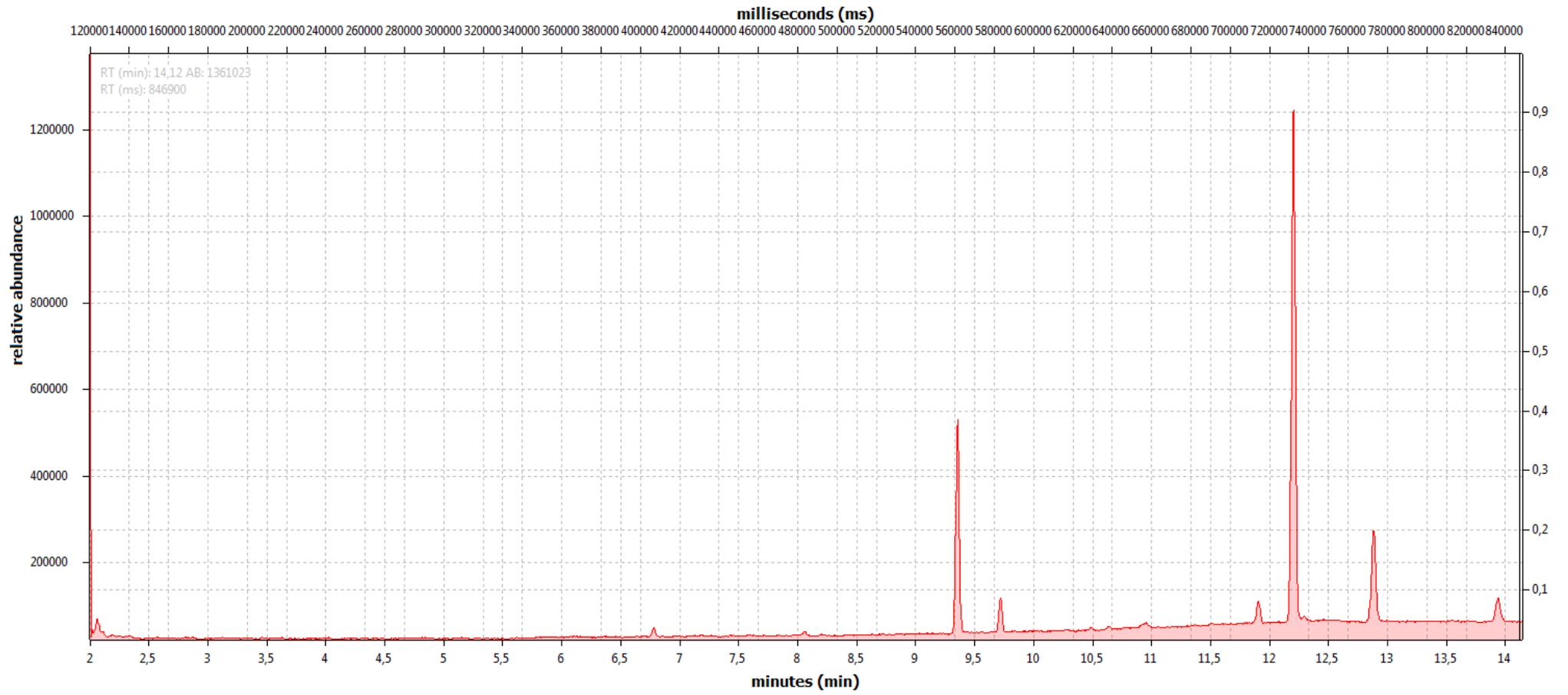
T4											
tr	% Similitud	Compuesto	% Área	N	n	tr N	tr (N+n)	LRI	LRI FAME Mix	LRI teo	Presencia en estándar: FAME Mix
2,062	90	<i>mesitileno</i>	0,29	14	1	2,061	2,371	1400	*	Sd	No
2,965	78	ácido 3-metil-(4E)-decenoico	0,27	16	1	2,843	3,518	1618	*	Sd	No
6,78	96	metil miristato (14:0)	0,31	20	1	6,678	7,905	2008	2008	2034	Si
9,355	95	metil palmitato (16:0)	21,74	22	1	9,175	10,418	2214	2215	Sd	Si
9,718	96	metil palmitoleato (16:1)	0,9	22	1	9,175	10,418	2244	2244	Sd	Si
9,875	83	<i>metil 9-E-hexadecenoato (16:1)</i>	0,09	22	1	9,175	10,418	2256	*	Sd	No
10,635	92	metil margarato (17:0)	0,27	23	1	10,418	11,673	2317	2318	Sd	Si
10,914	86	metil-10-Z-heptadecenoico (17:1)	0,17	23	1	10,418	11,673	2340	2346	Sd	Si
10,952	84	<i>metil-15-metil-(11E)-hexadecenoato</i>	0,15	23	1	10,418	11,673	2343	*	Sd	No
11,075	*	Comp. NI	0,13	23	1	10,418	11,673	2352	*	*	No
11,903	95	metil estearato (18:0)	2,77	24	1	11,673	12,999	2417	2418	2424	Si
12,121	81	ácido 2,6,10-trimetil-9-undecenoico	0,48	24	1	11,673	12,999	2434	*	Sd	No
12,208	95	metil oleato (18:1)	53,17	24	1	11,673	12,999	2440	2441	Sd	Si
12,298	93	metil elaidato (18:1)	0,2	24	1	11,673	12,999	2447	2441	Sd	Si
12,885	96	metil linoleato (18:2)	18,83	24	1	11,673	12,999	2491	2492	Sd	Si
17,9	*	Comp. NI	0,23	25	1	12,999	14,664	2794	*	*	No

- Perfil T5



tr	% Similitud	Compuesto	% Área	N	n	tr N	tr (N+n)	LRI	LRI FAME Mix	LRI teo	Presencia en estándar: FAME Mix
2,069	89	<i>mesitileno</i>	0,6	14	1	2,061	2,371	1403	*	Sd	No
4,486	92	metil laurato (12:0)	0,2	18	1	4,405	5,473	1808	1807	Sd	Si
4,844	90	<i>metil 5-Z-dodecenoato (12:1)</i>	0,34	18	1	4,405	5,473	1841	*	Sd	No
6,78	96	metil miristato (14:0)	0,57	20	1	6,678	7,905	2008	2008	2034	Si
7,122	82	<i>metil 11-Z-tetradecanoato (14:1)</i>	0,14	20	1	6,678	7,905	2036	*	Sd	No
7,2	80	metil miristoleato (14:1)	0,16	20	1	6,678	7,905	2043	2049	Sd	Si
7,554	85	<i>metil tetradecadienoato (14:2)*</i>	0,25	20	1	6,678	7,905	2071	*	Sd	No
8,055	94	metil pentadecanoato (15:0)	0,26	21	1	7,905	9,175	2112	2112	Sd	Si
9,354	95	metil palmitato (16:0)	21,17	22	1	9,175	10,418	2214	2215	Sd	Si
9,636	88	<i>metil 11-E-hexadecenoato (16:1)</i>	0,29	22	1	9,175	10,418	2237	*	Sd	No
9,719	97	metil palmitoleato (16:1)	7,71	22	1	9,175	10,418	2244	2244	Sd	Si
10,227	90	<i>metil 9,12-(E,E)-hexadecadienoato (16:2)</i>	0,34	22	1	9,175	10,418	2285	*	Sd	No
10,485	*	FAME no identificado	0,46	23	1	10,418	11,673	2305	*	*	No
10,632	84	metil margarato (17:0)	0,12	23	1	10,418	11,673	2317	2318	Sd	Si
10,915	94	metil-10-Z-heptadecenoico (17:1)	1,83	23	1	10,418	11,673	2340	2346	Sd	Si
11,508	89	<i>metil 9,12-(Z,Z)-heptadecadienoato (17:2)</i>	1,09	23	1	10,418	11,673	2387	*	Sd	No
11,904	93	metil estearato (18:0)	0,71	24	1	11,673	12,999	2417	2418	2424	Si
12,202	95	metil oleato (18:1)	29,5	24	1	11,673	12,999	2440	2441	Sd	Si
12,293	87	metil elaidato (18:1)	0,16	24	1	11,673	12,999	2447	2441	Sd	Si
12,884	96	metil linoleato (18:2)	27,7	24	1	11,673	12,999	2491	2492	Sd	Si
13,817	86	<i>9,12,15-(Z, Z, Z)-octadecatrien-1-ol</i>	0,43	25	1	12,999	14,664	2549	*	Sd	No
13,937	96	metil linolenato (18:3)	5,97	25	1	12,999	14,664	2556	2556	Sd	Si

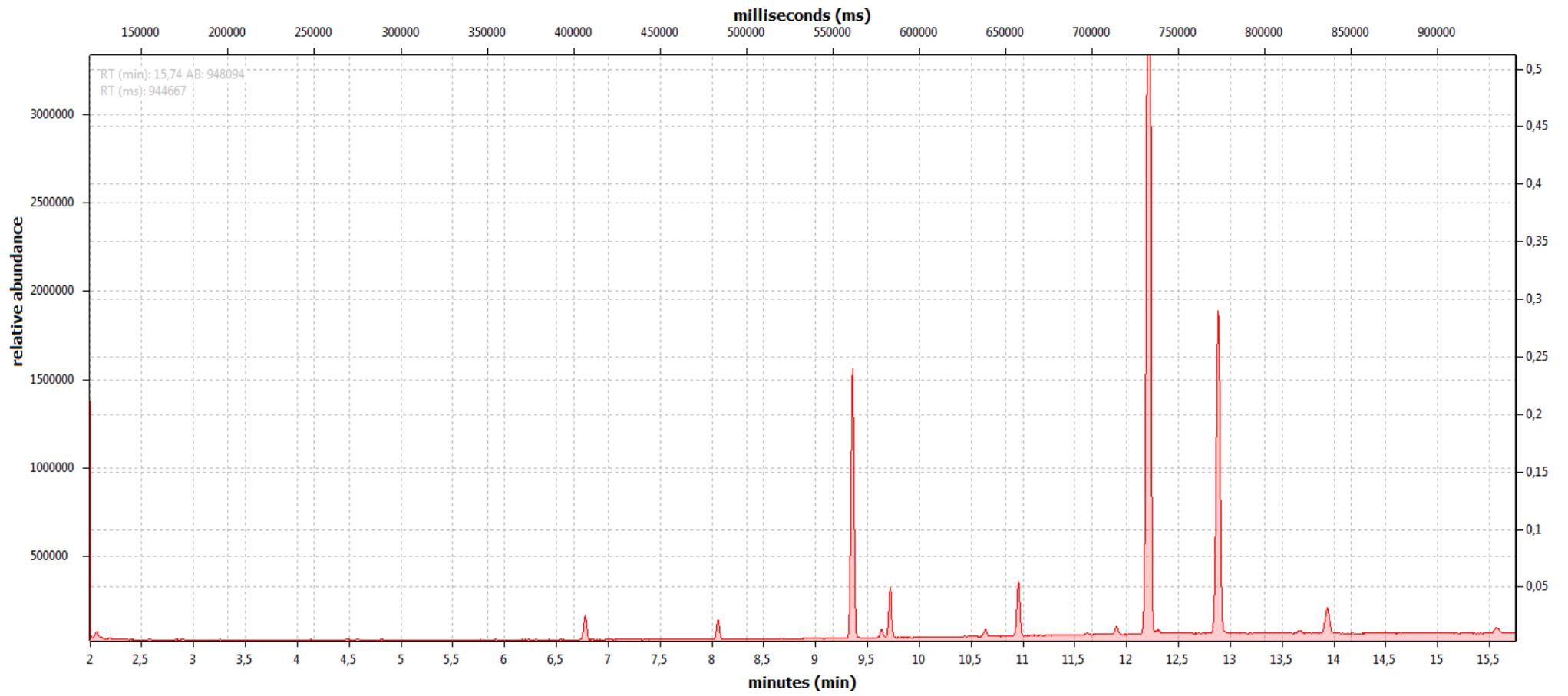
- Perfil T7



T7

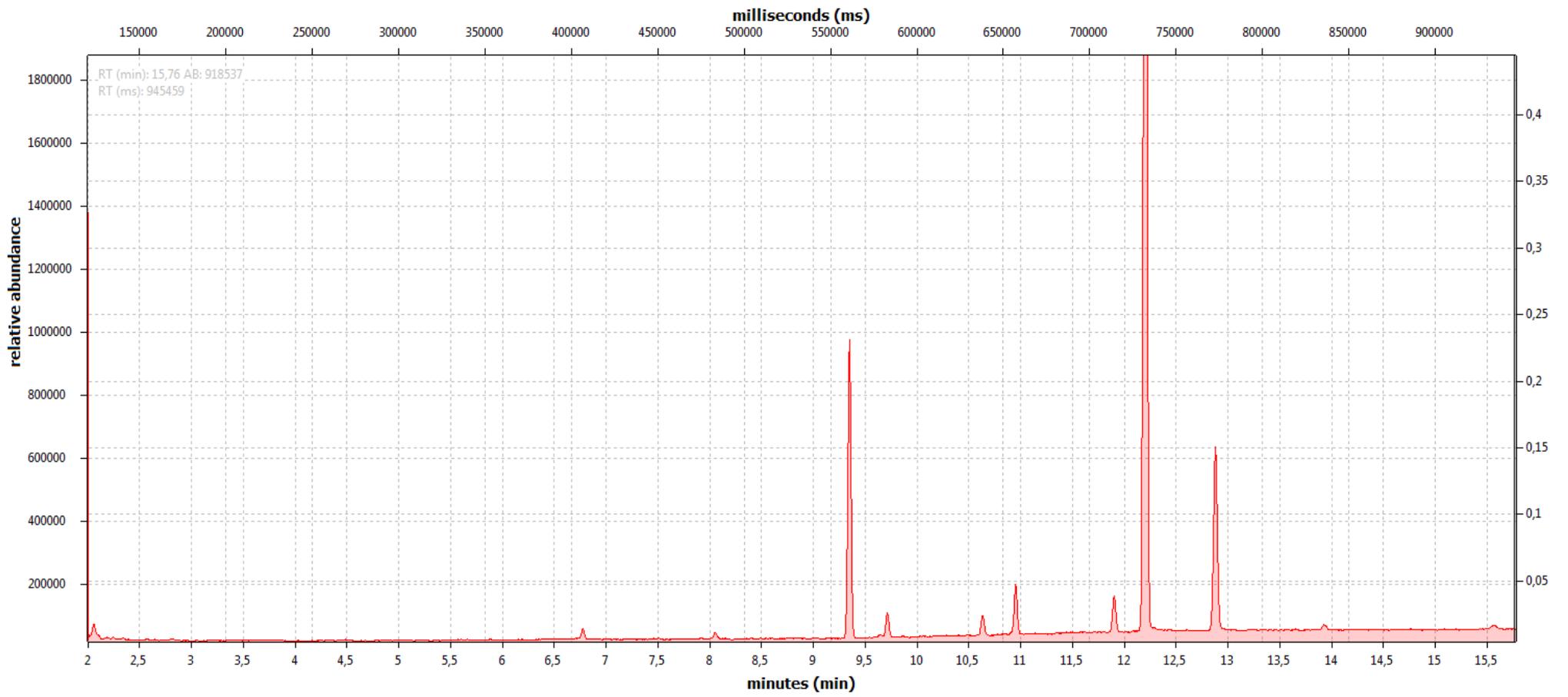
tr	% Similitud	Compuesto	% Área	N	n	tr N	tr (N+n)	LRI	LRI FAME Mix	LRI teo	Presencia en estándar: FAME Mix
2,064	93	<i>mesitileno</i>	1,21	14	1	2,061	2,371	1401	*	Sd	No
6,781	94	metil miristato (14:0)	0,92	20	1	6,678	7,905	2008	2008	2034	Si
8,061	89	metil pentadecanoato (15:0)	0,32	21	1	7,905	9,175	2112	2112	Sd	Si
9,355	95	metil palmitato (16:0)	20,85	22	1	9,175	10,418	2214	2215	Sd	Si
9,72	97	metil palmitoleato (16:1)	3,18	22	1	9,175	10,418	2244	2244	Sd	Si
10,638	87	metil margarato (17:0)	0,28	23	1	10,418	11,673	2318	2318	Sd	Si
10,953	85	metil-10-Z-heptadecenoico (17:1)	0,58	23	1	10,418	11,673	2343	2343	Sd	Si
11,905	94	metil estearato (18:0)	2,29	24	1	11,673	12,999	2417	2418	2424	Si
12,203	95	metil oleato (18:1)	55,57	24	1	11,673	12,999	2440	2441	Sd	Si
12,292	88	metil elaidato (18:1)	0,42	24	1	11,673	12,999	2447	2441	Sd	Si
12,882	96	metil linoleato (18:2)	11,16	24	1	11,673	12,999	2491	2492	Sd	Si
13,936	95	metil linolenato (18:3)	3,22	25	1	12,999	14,664	2556	2556	Sd	Si

• Perfil T9



T9											
tr	% Similitud	Compuesto	% Área	N	n	tr N	tr (N+n)	LRI	LRI FAME Mix	LRI teo	Presencia en estándar: FAME Mix
2,069	87	<i>mesitileno</i>	0,27	14	1	2,061	2,371	1403	*	Sd	No
6,78	96	metil miristato (14:0)	1,14	20	1	6,678	7,905	2008	2008	2034	Si
8,056	96	metil pentadecanoato (15:0)	0,85	21	1	7,905	9,175	2112	2112	Sd	Si
9,354	95	metil palmitato (16:0)	12,04	22	1	9,175	10,418	2214	2215	Sd	Si
9,633	90	<i>metil 11-E-hexadecenoato (16:1)</i>	0,41	22	1	9,175	10,418	2237	*	Sd	No
9,717	97	metil palmitoleato (16:1)	2,2	22	1	9,175	10,418	2244	2244	Sd	Si
10,636	95	metil margarato (17:0)	0,33	23	1	10,418	11,673	2317	2318	Sd	Si
10,955	96	metil-10-Z-heptadecenoico (17:1)	2,42	23	1	10,418	11,673	2343	2346	Sd	Si
11,622	84	ácido linolénico	0,1	23	1	10,418	11,673	2396	*	Sd	No
11,904	94	metil estearato (18:0)	0,43	23	1	10,418	11,673	2418	2418	2424	Si
12,215	96	metil oleato (18:1)	59,25	24	1	11,673	12,999	2441	2441	Sd	Si
12,3	93	metil elaidato (18:1)	0,14	24	1	11,673	12,999	2447	2441	Sd	Si
12,886	96	metil linoleato (18:2)	18,24	24	1	11,673	12,999	2491	2492	Sd	Si
13,665	89	<i>metil-10-Z-nonadecenoato (19:1)</i>	0,16	25	1	12,999	14,664	2540	*	Sd	No
13,936	96	metil linolenato (18:3)	1,64	25	1	12,999	14,664	2556	2556	Sd	Si
15,566	91	metil-11-Z-eicosenoato (20:1)	0,38	25	1	12,999	14,664	2654	2654	Sd	Si

• Perfil T14



T14											
tr	% Similitud	Compuesto	% Área	N	n	tr N	tr (N+n)	LRI	LRI FAME Mix	LRI teo	En FAME Mix?
2,062	82	<i>mesitileno</i>	0,95	14	1	2,061	2,371	1400	*	sd	No
6,775	96	metil miristato (14:0)	0,5	20	1	6,678	7,905	2008	2008	2034	Si
8,051	94	metil pentadecanoato (15:0)	0,33	21	1	7,905	9,175	2111	2112	sd	Si
9,35	95	metil palmitato (16:0)	13,83	22	1	9,175	10,418	2214	2215	sd	Si
9,643	83	<i>metil 11-E-hexadecenoato (16:1)</i>	0,12	22	1	9,175	10,418	2238	*	sd	No
9,714	97	metil palmitoleato (16:1)	1,1	22	1	9,175	10,418	2243	2244	sd	Si
10,634	95	metil margarato (17:0)	0,94	23	1	10,418	11,673	2317	2318	sd	Si
10,951	95	metil-10-Z-heptadecenoico (17:1)	2,27	23	1	10,418	11,673	2342	2346	sd	Si
11,901	94	metil estearato (18:0)	1,77	24	1	11,673	12,999	2417	2418	2424	Si
12,207	96	metil oleato (18:1)	67,51	24	1	11,673	12,999	2440	2441	sd	Si
12,878	96	metil linoleato (18:2)	10,1	24	1	11,673	12,999	2491	2492	sd	Si
13,926	87	metil linolenato (18:3)	0,33	25	1	12,999	14,664	2556	2556	sd	Si
15,573	87	metil-11-Z-eicosenoato (20:1)	0,25	25	1	12,999	14,664	2655	2654	sd	Si

Anexo IV: Determinación de la temperatura óptima de crecimiento

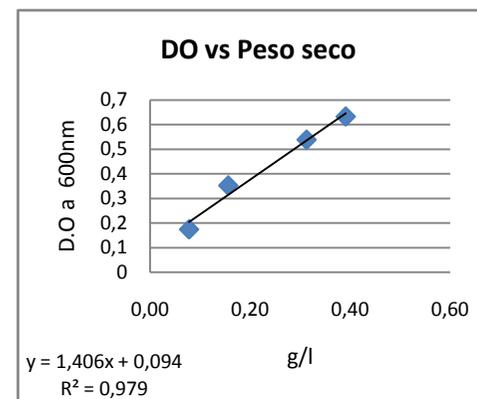
• Cepa T4 (*Cryptococcus*)

Determinación de la correspondencia entre el peso seco y la densidad óptica del cultivo

Medida de peso seco					
Cepa	Peso antes (g)	Peso después (g)	Diferencia (g)	Transformación a g/l	Promedio (g/l)
T4	5,0169	5,0479	0,0310	3,100	3,133
	5,0170	5,0476	0,0306	3,060	
	4,8832	4,9156	0,0324	3,240	

Se partió de 10ml de muestra.

Densidad óptica vs peso seco		
Dilución	g/l promedio normalizado	D.O. medida a 600nm
1/6	0,52	0,947
1/8	0,39	0,633
1/10	0,31	0,539
1/20	0,16	0,353
1/40	0,08	0,175
1/50	0,06	0,116



Medida del crecimiento en función de la temperatura y el tiempo de incubación

T4 a 25°C													
Tiempo (hs)	Dilución	D.O a 600nm			D.O. a 600nm x fac. de dilución			LN (D.O. a 600nm x fac. de dilución)			Promedio triplicado	LN Promedio triplicado	Desviación estándar de LN (D.O a 600nm x fact de dilución)
		1	2	3	1	2	3	1	2	3			
0	1/2	0,491	0,491	0,491	0,982	0,982	0,982	-0,0182	-0,0182	-0,0182	0,982	0,018	0,0000
9	1/10	0,28	0,318	0,222	2,800	3,180	2,220	1,0296	1,1569	0,7975	2,733	1,005	0,1822
13	1/10	0,423	0,409	0,394	4,230	4,090	3,940	1,4422	1,4085	1,3712	4,087	1,407	0,0355
16	1/10	0,515	0,56	0,496	5,150	5,600	4,960	1,6390	1,7228	1,6014	5,237	1,655	0,0621
19	1/10	0,675	0,727	0,631	6,750	7,270	6,310	1,9095	1,9838	1,8421	6,777	1,913	0,0708
34	1/20	0,478	0,537	0,46	9,560	10,740	9,200	2,2576	2,3740	2,2192	9,833	2,285	0,0806
37	1/20	0,506	0,525	0,463	10,120	10,500	9,260	2,3145	2,3514	2,2257	9,960	2,298	0,0646

D.O. inoculo = 0.661 (dilución 1/20)

$$\left(\frac{0.661 - 0.094}{1.406}\right) * 20 = 8.07g/l$$

Se desea partir de 0.5g/l de inoculo, en un volumen final de 70ml (en matraz de 250ml): 1000ml - 0.5g
70ml - x =

0.035g

Por lo tanto, si se parte de: 8.07g en 1000ml, 0.035g se obtiene inoculando: 4.34ml

D.O. de la muestra post inoculo = 0.491 (dilución 1/2)

Finalmente se inoculó

$$\left(\frac{0.491 - 0.094}{1.406}\right) * 2 = 0.56g/l$$

T4 a 20°C													
Tiempo (hs)	Dilución	D.O a 600nm			D.O. a 600nm x fac. de dilución			LN (D.O. a 600nm x fac. de dilución)			Promedio triplicado	LN Promedio triplicado	Desviación estándar de LN (D.O a 600nm x fact de dilución)
		1	2	3	1	2	3	1	2	3			
0	1/10	0,129	0,129	0,129	1,29	1,29	1,29	0,2546	0,2546	0,2546	1,290	0,2546	0,0000
10	1/10	0,358	0,349	0,351	3,58	3,49	3,51	1,2754	1,2499	1,2556	3,527	1,2604	0,0134
13	1/10	0,469	0,481	0,457	4,69	4,81	4,57	1,5454	1,5707	1,5195	4,690	1,5454	0,0256
16	1/10	0,539	0,560	0,554	5,39	5,60	5,54	1,6845	1,7228	1,7120	5,510	1,7066	0,0197
21	1/20	0,364	0,340	0,355	7,28	6,80	7,10	1,9851	1,9169	1,9601	7,060	1,9544	0,0345
34	1/30	0,324	0,319	0,322	9,72	9,57	9,66	2,2742	2,2586	2,2680	9,650	2,2670	0,0078
38	1/30	0,354	0,353	0,361	10,62	10,59	10,83	2,3627	2,3599	2,3823	10,680	2,3684	0,0122
42	1/20	0,389	0,373	0,381	11,67	11,19	11,43	2,4570	2,4150	2,4362	11,430	2,4362	0,0210

D.O. inoculo = 0.594 (dilución 1/30)

$$\left(\frac{0.594 - 0.094}{1.406}\right) * 30 = 10.67g/l$$

Se desea partir de 0.5g/l de inoculo en un volumen final de 70ml (en matraz de 250ml): 1000ml - 0.5g
70ml - x =

0.035g

Por lo tanto, si se parte de: 10.67g en 1000ml, 0.035g se obtiene inoculando: 3.28ml

D.O. de la muestras post inoculo = 0.129 (dilución 1/10)

$$\left(\frac{0.129 - 0.094}{1.406}\right) * 10 = 0.25g/l$$

T4 a 15°C													
Tiempo (hs)	Dilución	D.O a 600nm			D.O. a 600nm x fac. de dilución			LN (D.O. a 600nm x fac. de dilución)			Promedio triplicado	LN Promedio triplicado	Desviación estándar de LN (D.O a 600nm x fact de dilución)
		1	2	3	1	2	3	1	2	3			
0	1/3	0,266	0,266	0,266	0,798	0,798	0,798	-0,2256	-0,2256	-0,2256	0,798	-0,22564	0,0000
11	1/5	0,167	0,191	0,179	0,835	0,955	0,895	-0,1803	-0,0460	-0,1109	0,895	-0,1109	0,0672
14	1/5	0,264	0,25	0,272	1,320	1,250	1,360	0,2776	0,2231	0,3074	1,310	0,2700	0,0428
17	1/10	0,184	0,175	0,19	1,840	1,750	1,900	0,6097	0,5596	0,6418	1,830	0,6043	0,0414
20	1/10	0,275	0,289	0,293	2,750	2,890	2,930	1,0116	1,0612	1,0750	2,857	1,0496	0,0334
33	1/10	0,687	0,677	0,648	6,870	6,770	6,480	1,9271	1,9125	1,8687	6,707	1,9031	0,0304
37	1/20	0,367	0,378	0,355	7,340	7,560	7,100	1,9933	2,0228	1,9600	7,333	1,9924	0,0314

D.O. inoculo = 0.357 (dilución 1/30)

$$\left(\frac{0.357 - 0.094}{1.406}\right) * 30 = 5.61g/l$$

Se desea partir de 0.5g/l de inoculo en un volumen final de 70ml (en matraz de 250ml): 1000ml - 0.5g
70ml - x =

0.035g

Por lo tanto, si se parte de: 5.61g en 1000ml, 0.035g se obtiene inoculando: 6.24ml

D.O. de la muestras post inoculo = 0.266 (dilución 1/3)

$$\left(\frac{0.266 - 0.094}{1.406}\right) * 3 = 0.37g/l$$

T4 a 10°C													
Tiempo (hs)	Dilución	D.O a 600nm			D.O. a 600nm x fac. de dilución			LN (D.O. a 600nm x fac. de dilución)			Promedio triplicado	LN Promedio triplicado	Desviación estándar de LN (D.O a 600nm x fact de dilución)
		1	2	3	1	2	3	1	2	3			
0	1/2	0.207	0.207	0.207	0.414	0.414	0.414	-0,8819	-0,8819	-0,8819	0.414	-0.8819	0,0000
10	1/3	0.328	0.328	0.326	0.984	0.984	0.978	-0,0161	-0,0161	-0,0222	0.982	-0.0182	0,0035
13	1/3	0.440	0.448	0.405	1.320	1.344	1.215	0,2776	0,2957	0,1947	1.293	0.2570	0,0538
16	1/3	0.538	0.558	0.523	1.614	1.674	1.569	0,4787	0,5152	0,4504	1.619	0.4818	0,0325
21	1/3	0.804	0.828	0.787	2.412	2.484	2.361	0,8805	0,9099	0,8591	2.419	0.8834	0,0255
34	1/10	0.784	0.819	0.780	7.840	8.190	7.800	2,0592	2,1029	2,0541	7.943	2.0723	0,0268
38	1/10	0.962	0.988	0.951	9.620	9.880	9.510	2,2638	2,2905	2,2523	9.670	2.2690	0,0196

D.O. inoculo = 0.478 (dilución 1/3)

$$\left(\frac{0.478 - 0.094}{1.406}\right) * 3 = 0.82g/l$$

Se desea partir de 0.5g/l de inoculo en un volumen final de 70ml (en matraz de 250ml): 1000ml - 0.5g
70ml - x =

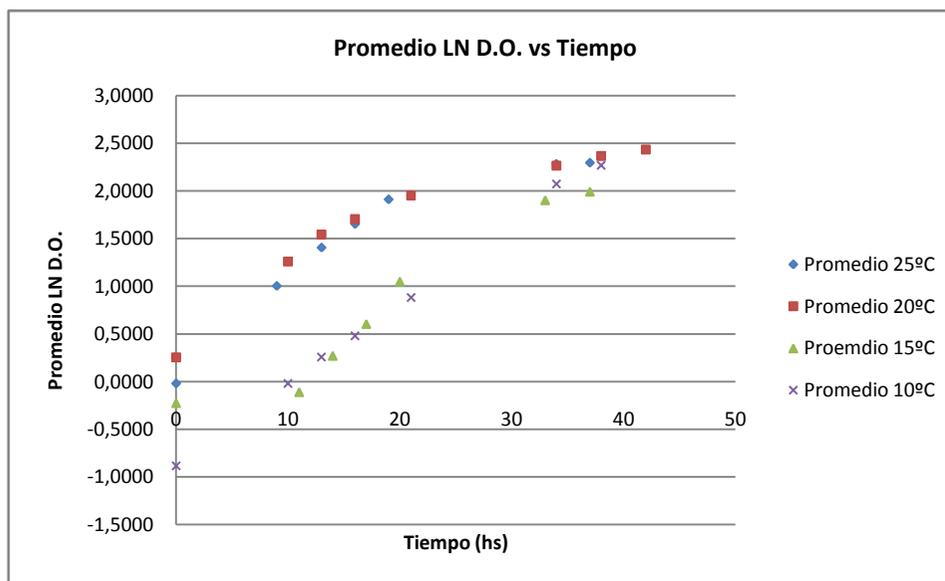
0.035g

Por lo tanto, si se parte de: 0.82g en 1000ml, 0.035g se obtiene inoculando: 42.68ml*

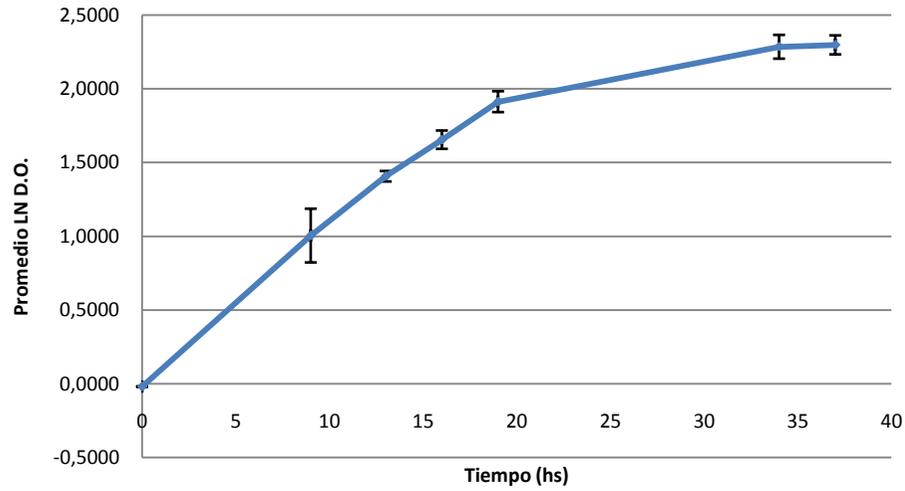
(* Por falta de volumen, se termina cargando 20ml en cada triplicado)

D.O. de la muestras post inoculo = 0.207 (dilución 1/2)

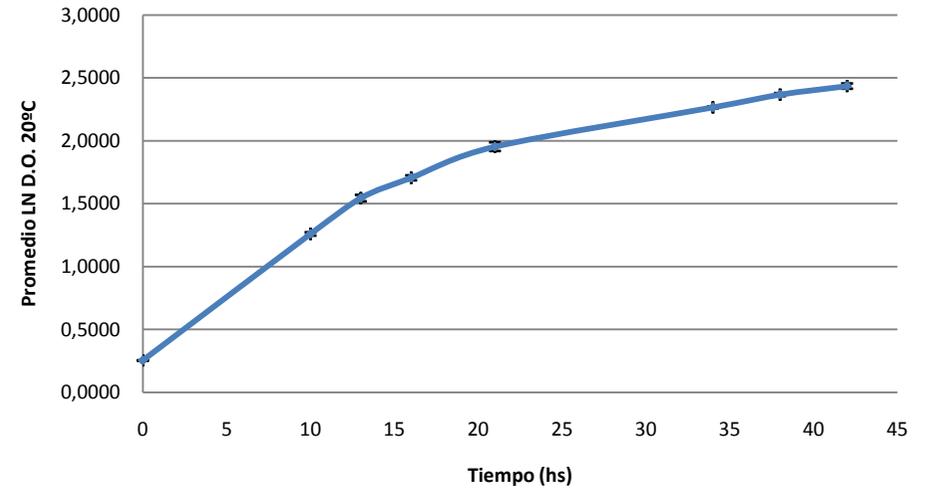
$$\left(\frac{0.207 - 0.094}{1.406}\right) * 2 = 0.16g/l$$



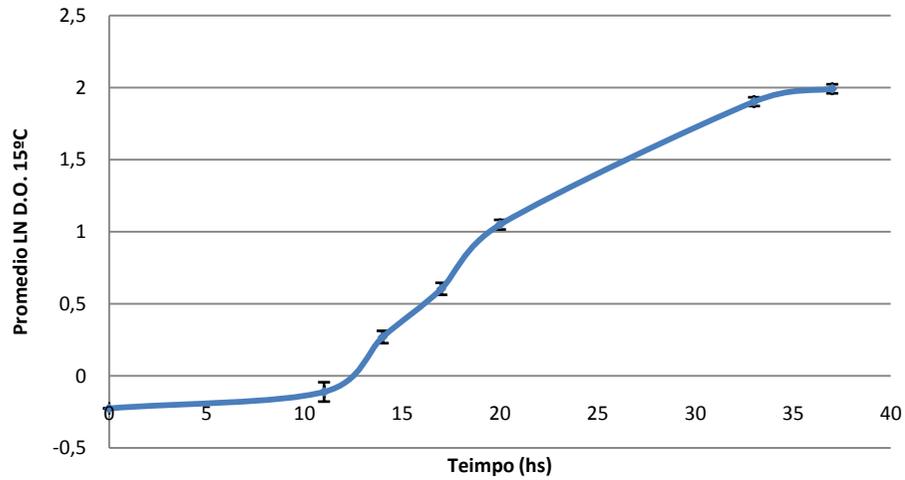
Promedio LN D.O. 25°C vs Tiempo



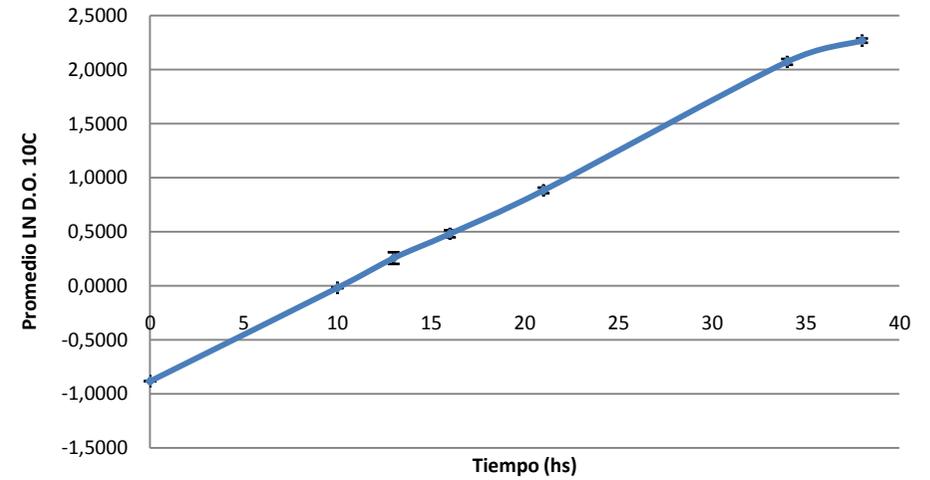
Promedio LN D.O. 20°C vs Tiempo

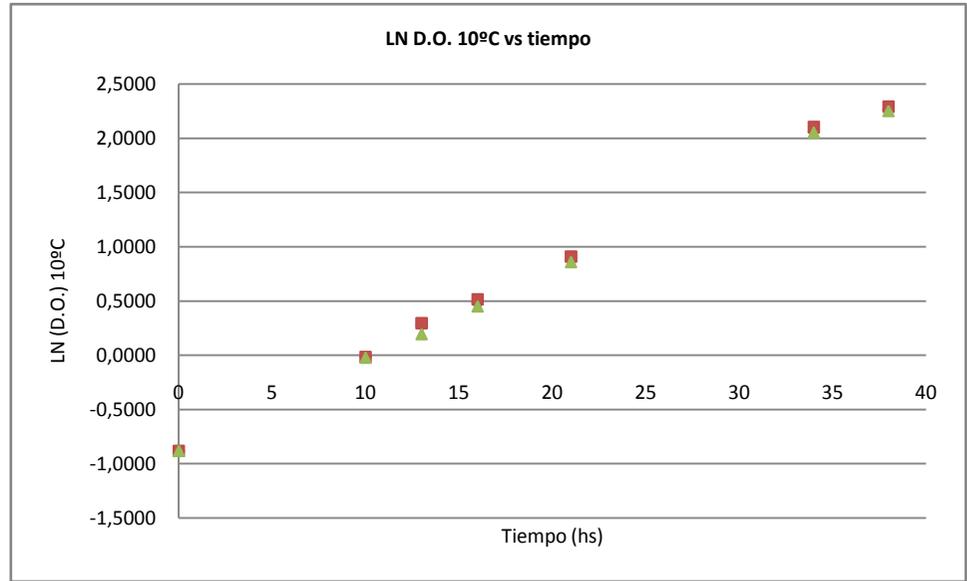
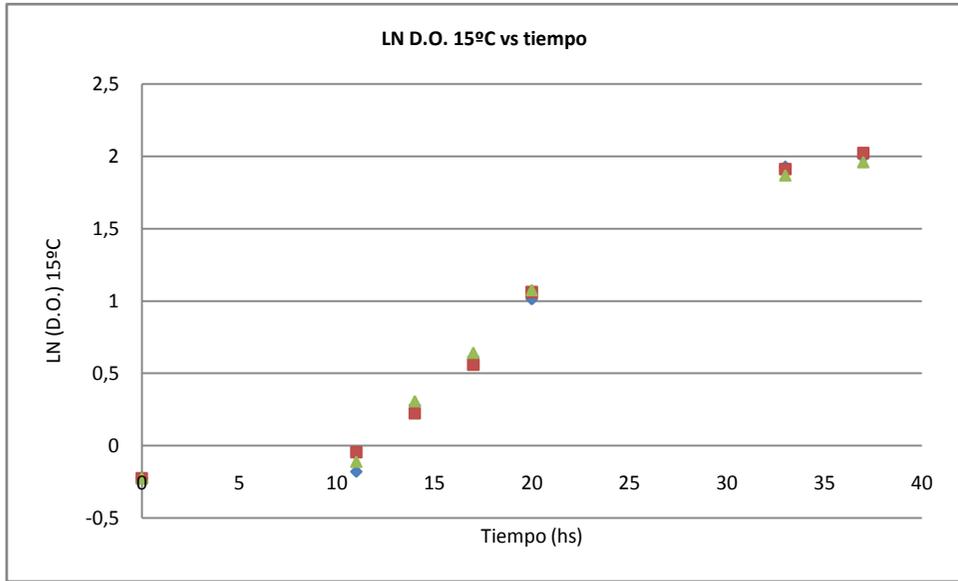
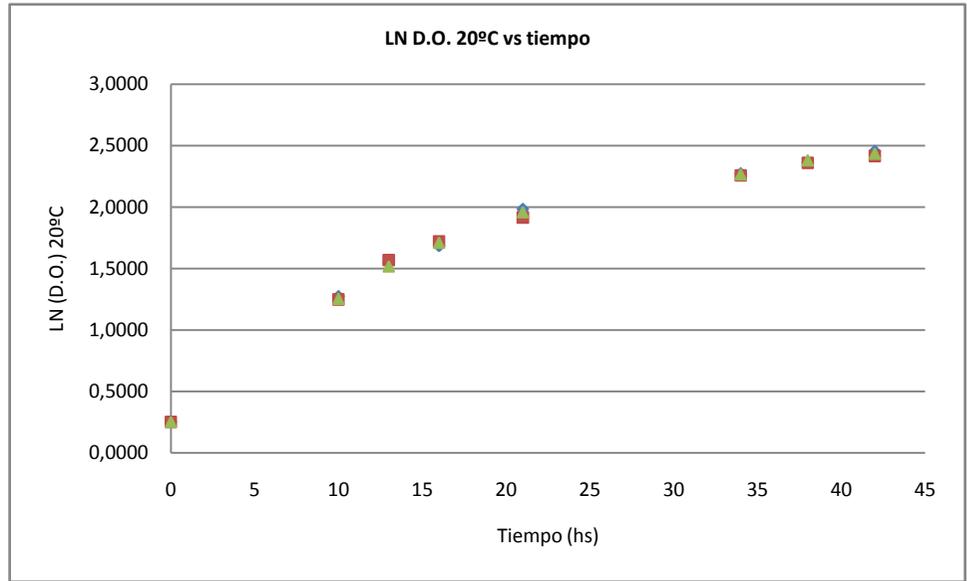
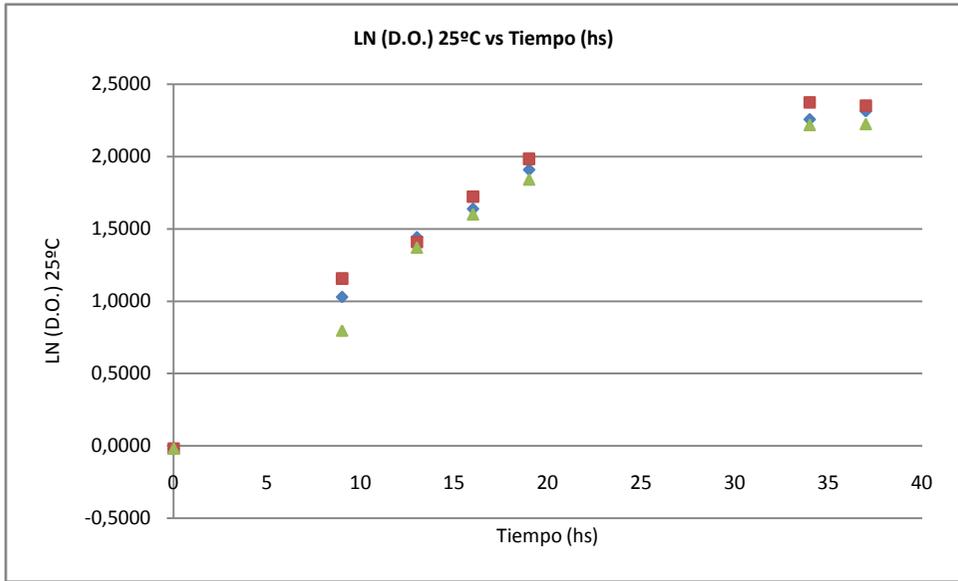


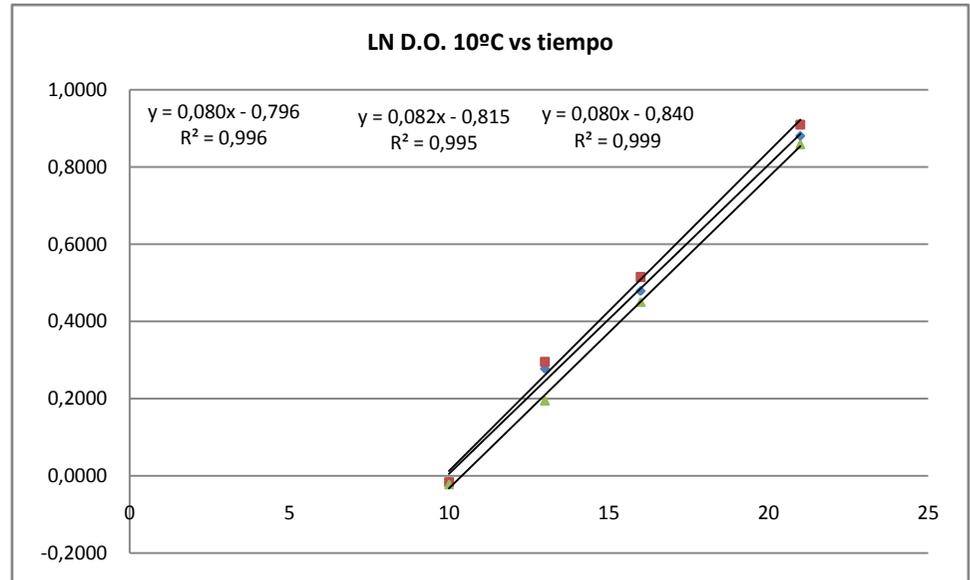
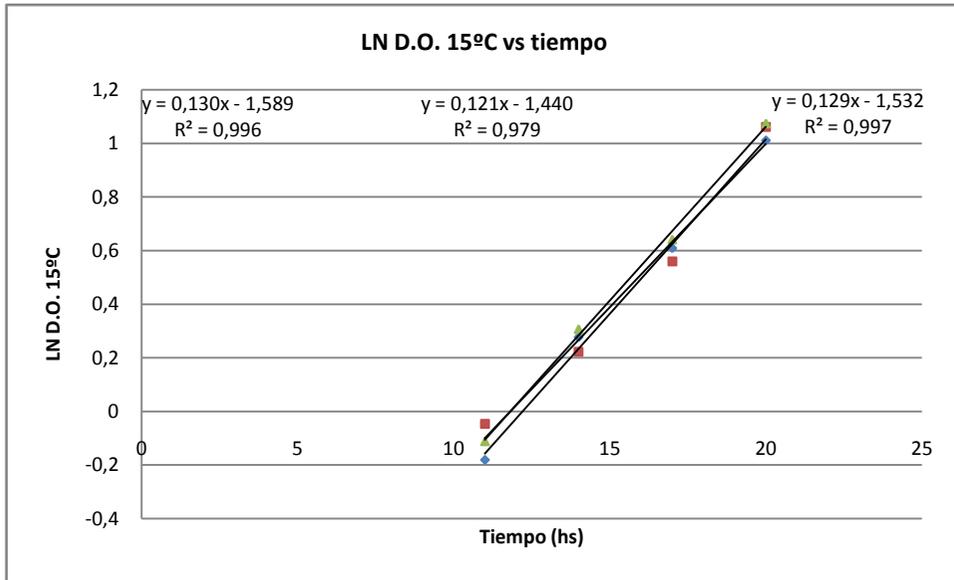
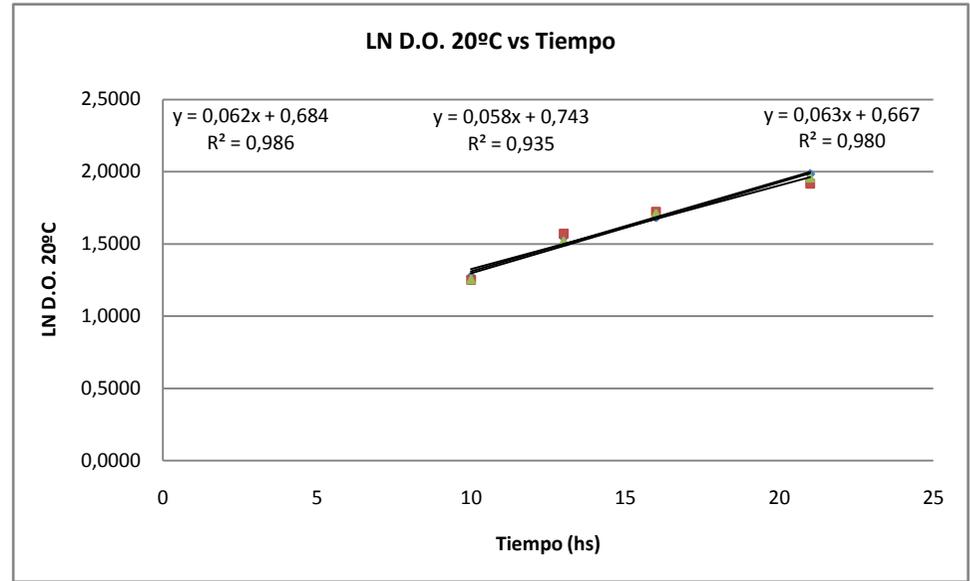
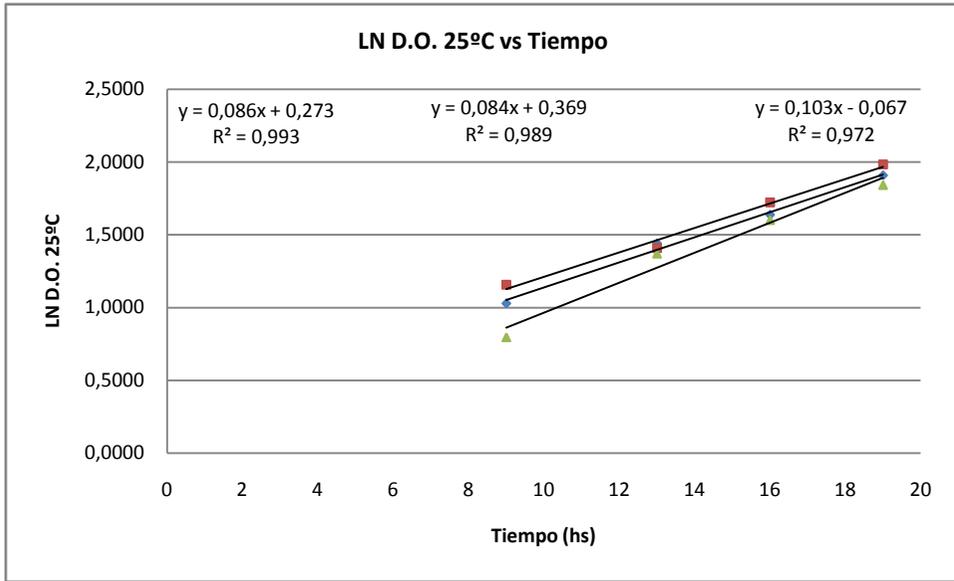
Promedio LN D.O. 15°C vs Tiempo



Promedio LN D.O. 10°C vs Tiempo







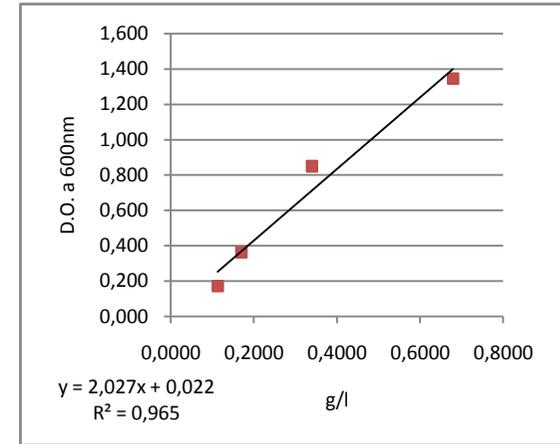
• **Cepa T5 (*Metschnikowia australis*)**

Determinación de la correspondencia entre el peso seco y la densidad óptica del cultivo

Curva de Calibración					
Cepa	Peso antes (g)	Peso después (g)	Diferencia (g)	Transformación a g/l	Promedio (g/l)
T4	5,0216	5,0576	0,0360	3,600	3,396
	5,0167	5,0517	0,0350	3,500	
	4,8428	4,8737	0,0309	3,090	

Se partió de 10ml de muestra.

Dilución	g/l promedio normalizado	D.O. medida a 600nm
1/3	1,1322	1,610
1/5	0,6793	1,345
1/10	0,3397	0,850
1/20	0,1698	0,363
1/30	0,1132	0,173
1/40	0,0849	0,105
1/50	0,0679	0,210



Medida del crecimiento en función de la temperatura y el tiempo de incubación

T5 a 25°C													
Tiempo (hs)	Dilución	D.O a 600nm			D.O. a 600nm x fac. de dilución			LN (D.O. a 600nm x fac. de dilución)			Promedio triplicado	LN Promedio triplicado	Desviación estándar de LN (D.O a 600nm x fact de dilución)
		1	2	3	1	2	3	1	2	3			
0	1/2	0.491	0.491	0.491	0.982	0.982	0.982	-0.0181	-0.0181	-0.0181	0.590	-0.528	0,0000
10	1/10	0.195	0.214	0.221	1.950	2.140	2.210	0.6678	0.7608	0.7930	2.100	0.742	0,0650
13	1/10	0.394	0.354	0.362	3.940	3.540	3.620	1.3712	1.2641	1.2865	3.700	1.308	0,0565
16	1/10	0.591	0.587	0.624	5.910	5.870	6.240	1.7766	1.7699	1.8310	6.007	1.793	0,0335
21	1/10	0.453	0.485	0.466	9.060	9.700	9.320	2.2039	2.2721	2.2322	9.360	2.236	0,0343
34	1/20	0.604	0.572	0.590	12.08	11.44	11.80	2.4916	2.4371	2.4681	11.773	2.466	0,0273
38	1/20	0.624	0.589	0.633	12.48	11,78	12.66	2.5241	2.4664	2.5384	12.307	2.510	0,0381
T5 a 20°C													
Tiempo (hs)	Dilución	D.O a 600nm			D.O. a 600nm x fac. de dilución			LN (D.O. a 600nm x fac. de dilución)			Promedio triplicado	LN Promedio triplicado	Desviación estándar de LN (D.O a 600nm x fact de dilución)
		1	2	3	1	2	3	1	2	3			
0	1/3	0.355	0.355	0.355	1.065	1.065	1.065	0.0630	0.0630	0.0630	1.065	0.0630	0,0000
11.5	1/10	1.040	0.998	1.025	2.080	1.996	2.050	0.7324	0.6911	0.7178	2.042	0.7139	0,0209
14	1/20	0.692	0.681	0.808	6.920	6.810	8.080	1.9344	1.9184	2.0894	7.270	1.9838	0,0944
16	1/20	0.554	0.442	0.481	11.080	8.840	9.620	2.4051	2.1793	2.2638	9.847	2.2871	0,1141
19	1/20	0.615	0.705	0.685	12.300	14.100	13.700	2.5096	2.6462	2.6174	13.367	2.5928	0,0720
21	1/50	0.805	0.766	0.768	16.100	15.320	15.360	2.7788	2.7292	2.7318	15.593	2.7468	0,0279
36	1/50	0.406	0.395	0.354	20.300	19.750	17.705	3.0106	2.9832	2.8738	19.252	2.9576	0,0724
38	1/50	0.432	0.287	0.465	21.600	14.350	23.250	3.0727	2.6637	3.1463	19.733	2.9823	0,2600

D.O. inoculo = 0.661 (dilución 1/20)

$$\left(\frac{0.661 - 0,022}{2.027}\right) * 20 = 6.30g/l$$

Se desea partir de 0.5g/l de inoculo en un volumen final de 70ml (en matraz de 250ml): 1000ml - 0.5g
 70ml - x = 0.035g

Por lo tanto, si se parte de: 6.30g en 1000ml, 0.035g se obtiene inoculando: 5.55ml

D.O. de la muestra post inoculo = 0.491 (dilución 1/2)

Finalmente se inoculó

$$\left(\frac{0.491 - 0.022}{2.027}\right) * 2 = 0.46g/l$$

D.O. inoculo = 0.598 (dilución 1/30)

$$\left(\frac{0.598 - 0.022}{2.027}\right) * 30 = 8.52g/l$$

Se desea partir de 0.5g/l de inoculo en un volumen final de 70ml (en matraz de 250ml): 1000ml - 0.5g
 70ml - x = 0.035g

Por lo tanto, si se parte de: 8.52g en 1000ml, 0.035g se obtiene inoculando: 4.11ml

D.O. de la muestras post inoculo = 0.355 (dilución 1/3)

$$\left(\frac{0.355 - 0.022}{2.027}\right) * 3 = 0.49g/l$$

T5 a 15°C													
Tiempo (hs)	Dilución	D.O a 600nm			D.O. a 600nm x fac. de dilución			LN (D.O. a 600nm x fac. de dilución)			Promedio triplicado	LN Promedio triplicado	Desviación estándar de LN (D.O a 600nm x fact de dilución)
		1	2	3	1	2	3	1	2	3			
0	1/3	0.355	0.355	0.355	1.065	1.065	1.065	0.0630	0.0630	0.0630	1.065	0.0630	0,0000
11.5	1/5	0.785	0.856	0.896	1.570	1.712	1.792	0.4511	0.5377	0.5833	1.691	0.5255	0,0672
14	1/10	0.632	0.580	0.655	6.320	5.800	6.550	1.8437	1.7579	1.8795	6.223	1.8283	0,0625
16	1/20	0.421	0.447	0.439	8.420	8.940	8.780	2.1306	2.1905	2.1725	8.713	2.1649	0,0307
19	1/20	0.553	0.509	0.537	11.060	10.180	10.740	2.4033	2.3204	2.3740	10.660	2.3665	0,0420
21	1/20	0.621	0.609	0.617	12.420	12.180	12.340	2.5193	2.4998	2.5128	12.313	2.5107	0,0099
36	1/50	0.410	0.337	0.397	20.500	16.850	19.850	3.0204	2.8244	2.9882	19.067	2.9479	0,1051
38	1/50	0.421	0.325	0.435	21.050	16.250	21.750	3.0469	2.7881	3.0796	19.683	2.9798	0,1597
T5 a 10°C													
Tiempo (hs)	Dilución	D.O a 600nm			D.O. a 600nm x fac. de dilución			LN (D.O. a 600nm x fac. de dilución)			Promedio triplicado	LN Promedio triplicado	Desviación estándar de LN (D.O a 600nm x fact de dilución)
		1	2	3	1	2	3	1	2	3			
0	1/2	0.084	0.084	0.084	0.168	0.168	0.168	-1.7838	-1.7838	-1.7838	0.168	-1.7838	0,0000
10	1/5	0.245	0.216	0.238	1.225	1.080	1.190	0.2029	0.0770	0.1740	1.165	0.1527	0,0660
13	1/5	0.287	0.266	0.261	1.435	1.330	1.305	0.3612	0.2852	0.2662	1.357	0.3050	0,0503
16	1/5	0.313	0.329	0.354	1.565	1.645	1.770	0.4479	0.4977	0.5710	1.660	0.5068	0,0619
21	1/10	0.351	0.324	0.195	3.510	3.240	1.950	1.2556	1.1756	0.6678	2.900	1.0647	0,3188
34	1/10	0.296	0.283	0.293	5.920	5.660	5.860	1.7783	1.7334	1.7681	5.813	1.7602	0,0235
38	1/10	0.325	0.310	0.295	6.500	6.200	5.900	1.8718	1.8245	1.7750	6.200	1.8245	0,0484

D.O. inoculo = 0.486 (dilución 1/10)

$$\left(\frac{0.486 - 0.022}{2.027}\right) * 10 = 2.29g/l$$

Se desea partir de 0.5g/l de inoculo en un volumen final de 70ml (en matraz de 250ml):1000ml - 0.5g
70ml - x =

0.035g

Por lo tanto, si se parte de: 2.29g en 1000ml, 0.035g se obtiene inoculando: 15.28ml

D.O. de la muestras post inoculo = 0.355 (dilución 1/3)

$$\left(\frac{0.355 - 0.022}{2.027}\right) * 3 = 0.49g/l$$

D.O. inoculo = 0.360 (dilución 1/3)

$$\left(\frac{0.360 - 0.022}{2.027}\right) * 3 = 0.50g/l$$

Se desea partir de 0.5g/l de inoculo en un volumen final de 70ml (en matraz de 250ml): 1000ml - 0.5g
70ml - x =

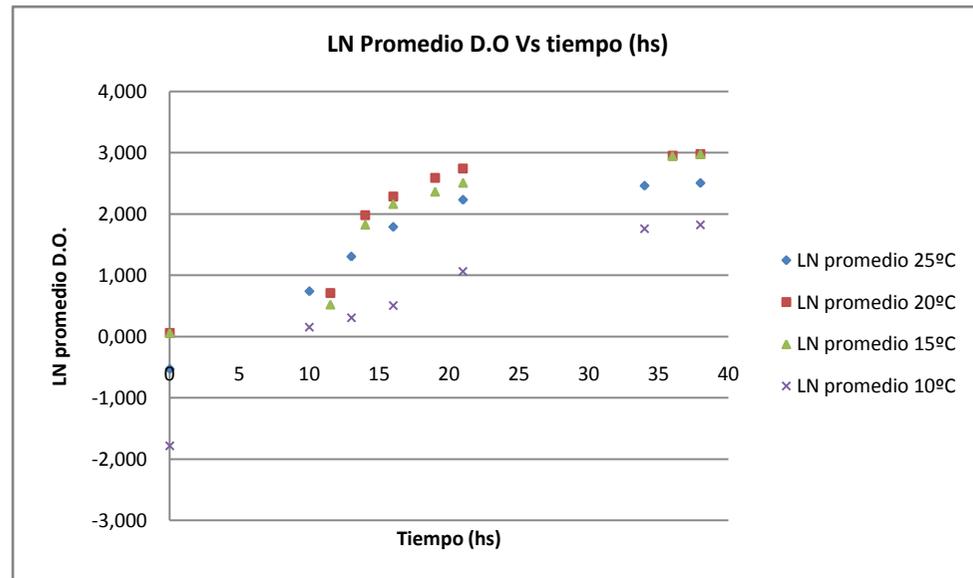
0.035g

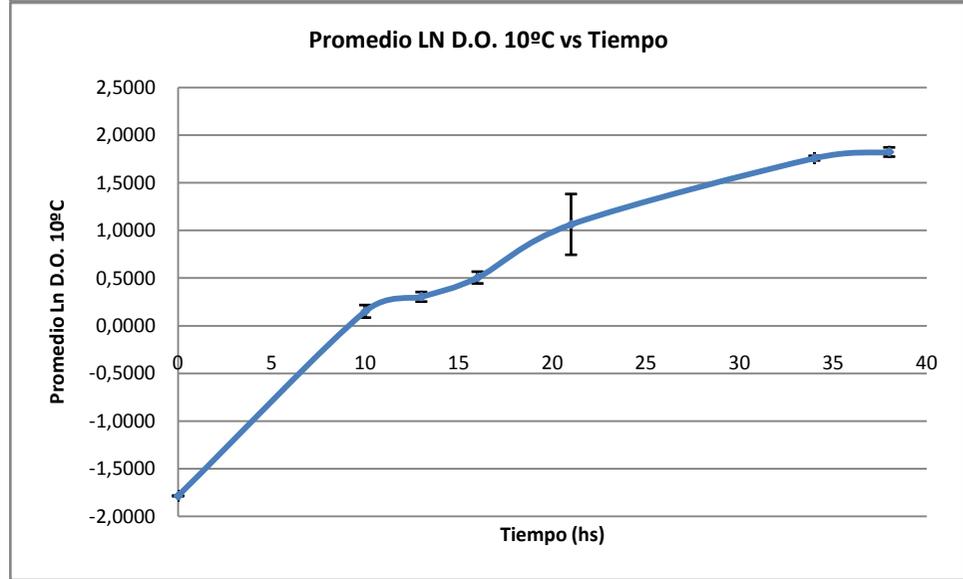
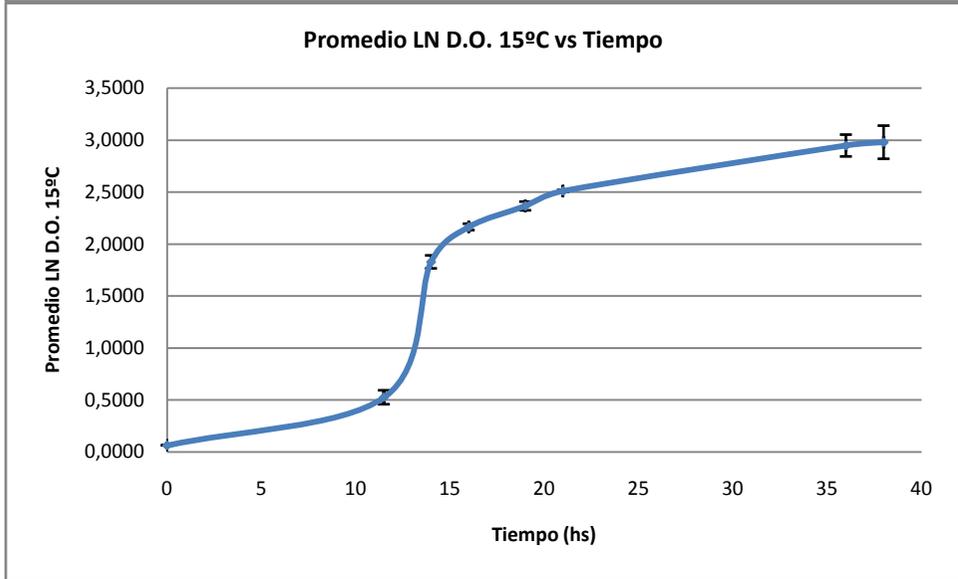
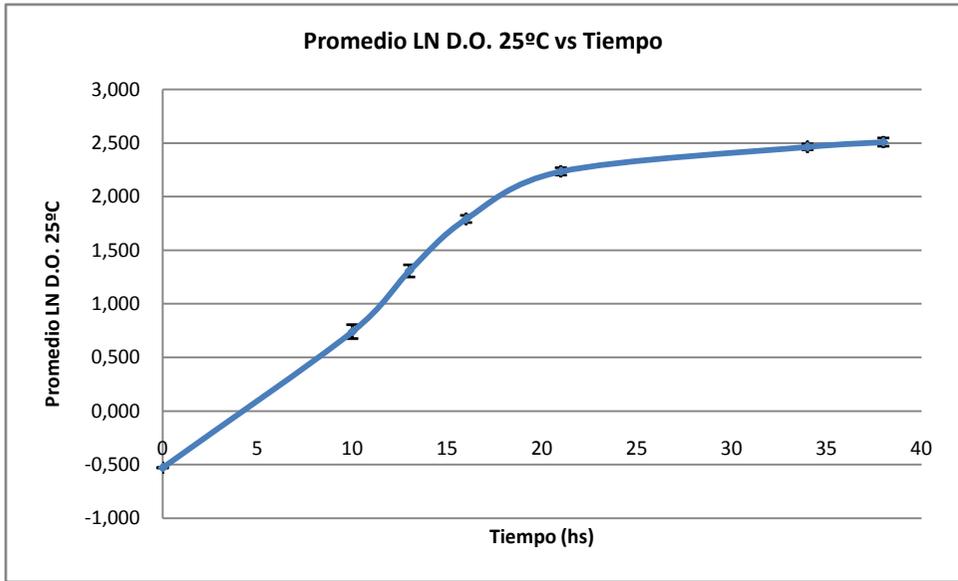
Por lo tanto, si se parte de: 0.50g en 1000ml, 0.035g se obtiene inoculando: 70ml*

(*Por falta de volumen, se termina cargando 20ml en cada triplicado)

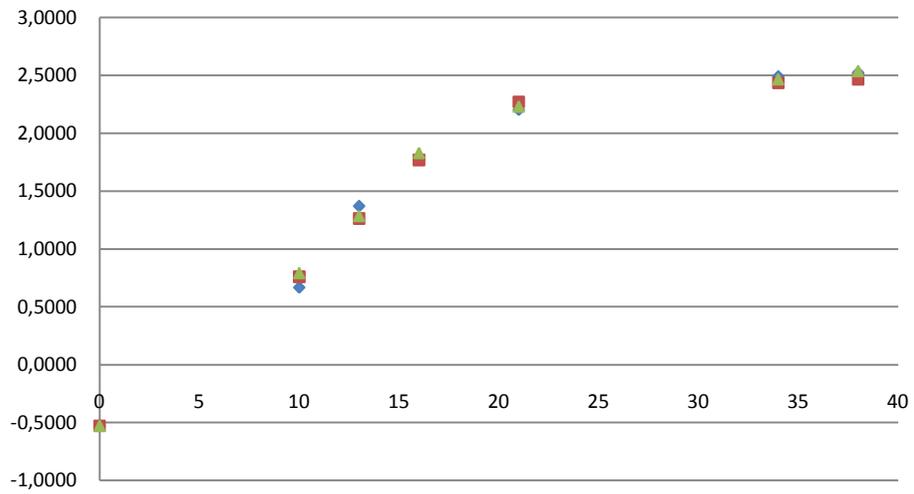
D.O. de la muestras post inoculo = 0.084 (dilución 1/2)

$$\left(\frac{0.084 - 0.022}{2.027}\right) * 2 = 0.06g/l$$

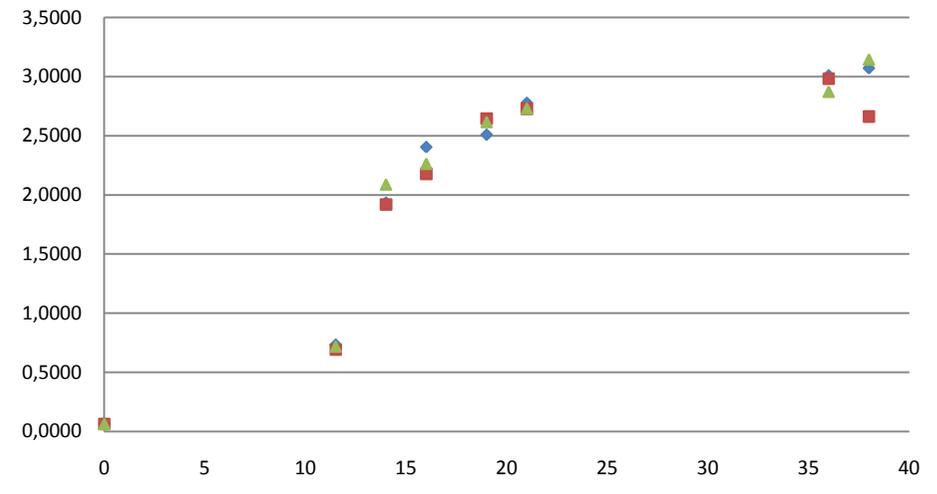




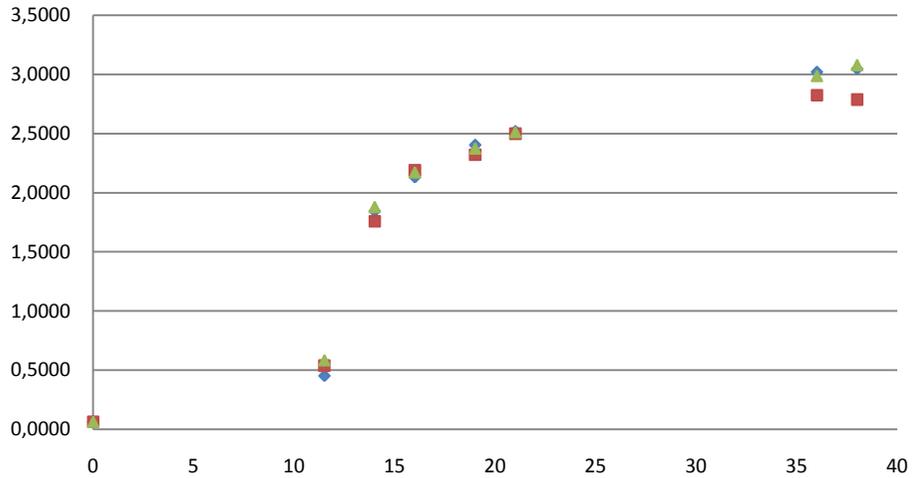
LN D.O. 25°C vs Tiempo



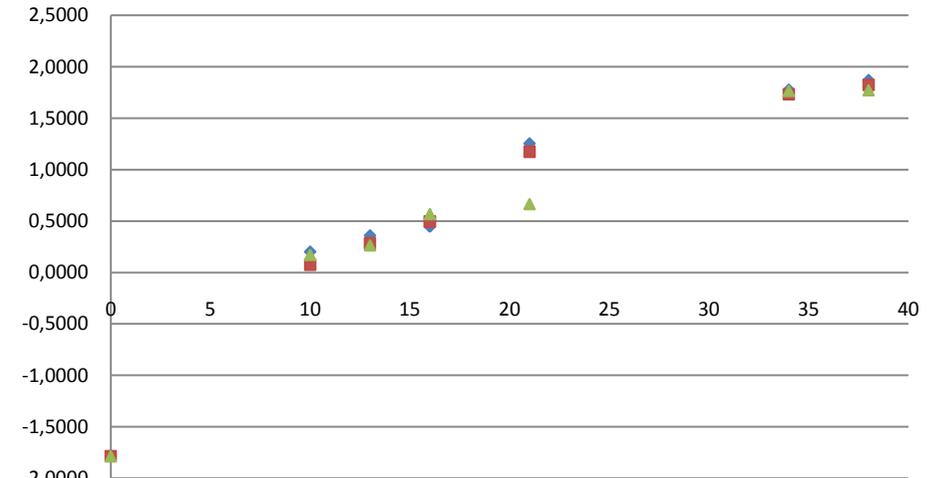
LN D.O. 20°C vs tiempo

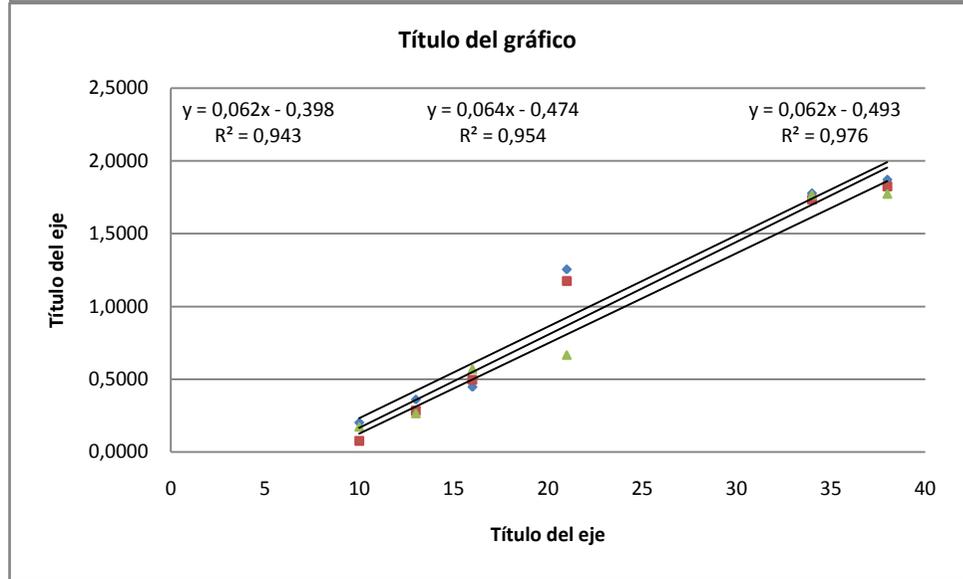
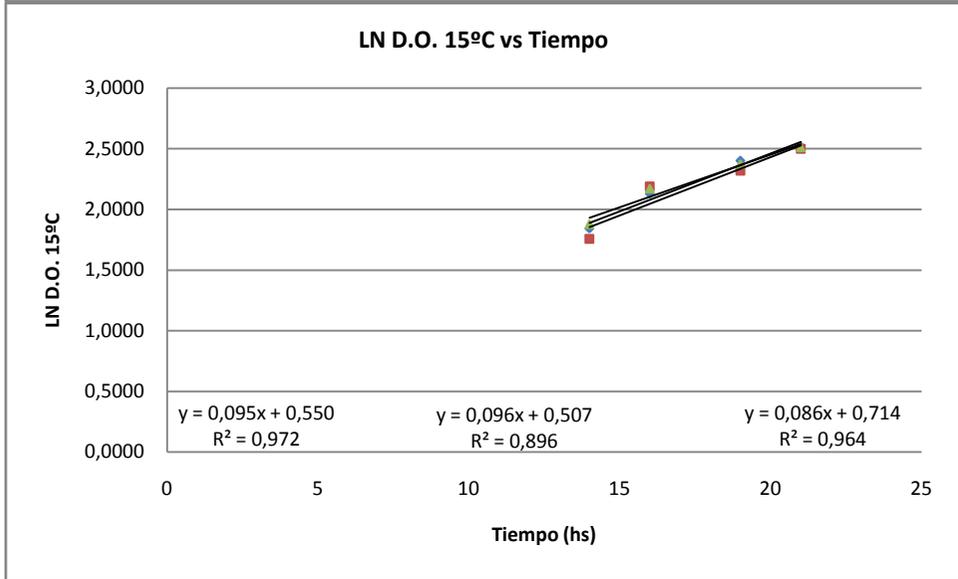
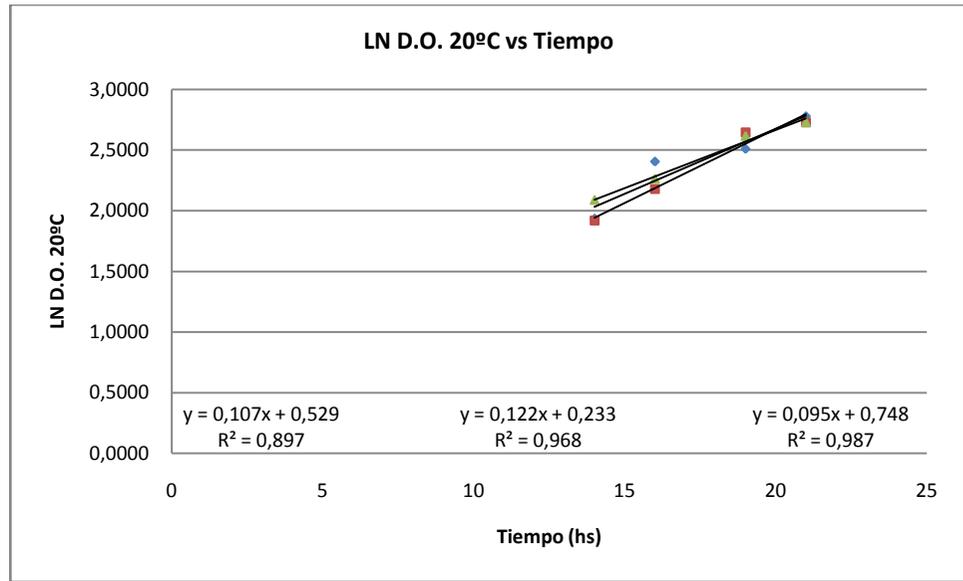
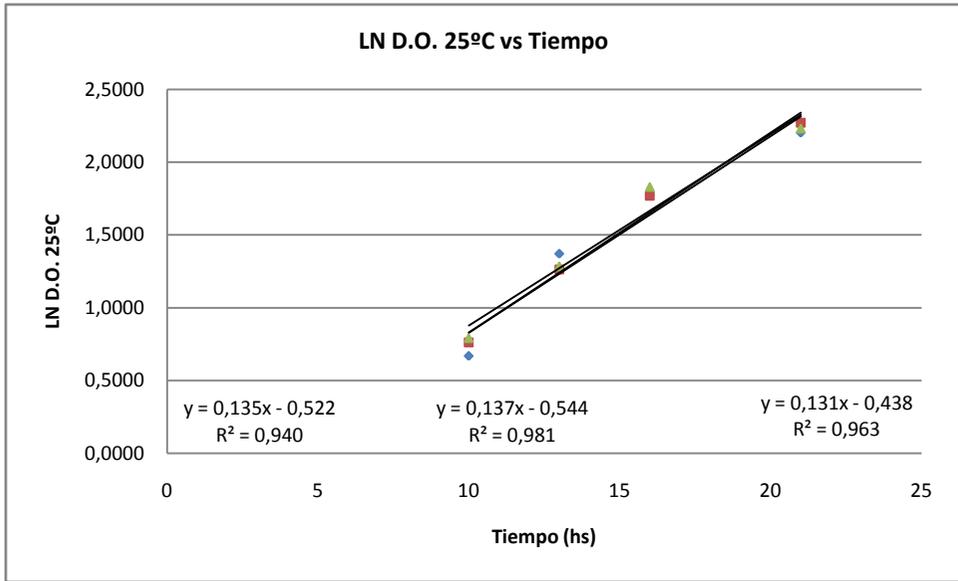


LN D.O. 15°C vs tiempo



LN D.O. 10°C vs Tiempo





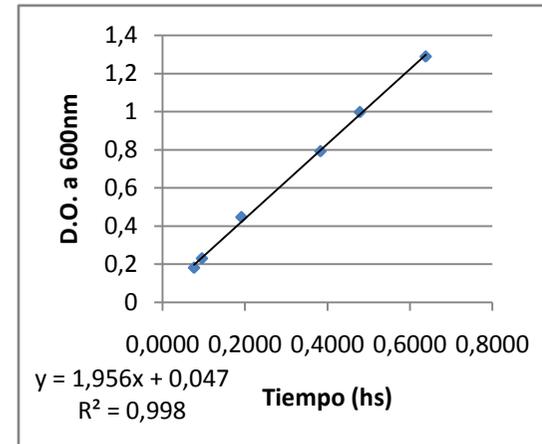
• **T9 (Rhodotorula sp.)**

Determinación de la correspondencia entre el peso seco y la densidad óptica del cultivo

Curva de Calibración					
Cepa	Peso antes (g)	Peso después (g)	Diferencia (g)	Transformación a g/l	Promedio (g/l)
T9	4.8531	4.8904	0.0373	3.730	3.833
	4.8464	4.8853	0.0389	3.890	
	4.8559	4.8947	0.0388	3.880	

Se partió de 10ml de muestra.

Dilución	g/l promedio normalizado	D.O. medida a 600nm
1/6	0.6389	1.288
1/8	0.4792	0.997
1/10	0.3833	0.792
1/20	0.1917	0.447
1/40	0.0958	0.231
1/50	0.0767	0.182



Medida del crecimiento en función de la temperatura y el tiempo de incubación

T9 a 25°C													
Tiempo (hs)	Dilución	D.O a 600nm			D.O. a 600nm x fac. de dilución			LN (D.O. a 600nm x fac. de dilución)			Promedio triplicado	LN Promedio triplicado	Desviación estándar de LN (D.O a 600nm x fact de dilución)
		1	2	3	1	2	3	1	2	3			
0	1/2	0,223	0,223	0,223	0,446	0,446	0,446	-0,8074	-0,8074	-0,8074	0,446	-0,8074	0
8	1/10	0,164	0,08	0,143	1,640	0,800	1,430	0,4947	-0,2231	0,3577	1,290	0,2546	0,38109896
12	1/10	0,118	0,199	0,297	1,180	1,990	2,970	0,1655	0,6881	1,0886	2,047	0,7162	0,46286978
15	1/10	0,155	0,227	0,327	1,550	2,270	3,270	0,4383	0,8198	1,1848	2,363	0,8601	0,37329797
18	1/10	0,174	0,269	0,430	1,740	2,690	4,300	0,5539	0,9895	1,4586	2,910	1,0682	0,4524678
33	1/20	0,452	0,517	0,620	9,040	10,340	12,400	2,2017	2,3360	2,5177	10,593	2,3602	0,15860788
36	1/20	0,477	0,580	0,663	9,540	11,600	13,260	2,2555	2,4510	2,5848	11,467	2,4394	0,16559196

D.O. inoculo = 0.300 (dilución 1/5)

$$\left(\frac{0.300 - 0.047}{1.956}\right) * 5 = 0.65g/l$$

Se desea partir de 0.5g/l de inoculo en un volumen final de 70ml (en matraz de 250ml): 1000ml - 0.5g
70ml - x =

0.035g

Por lo tanto, si se parte de: 0.65g en 1000ml, 0.035g se obtiene inoculando: 53.84ml*

(* por falta de volumen, se termina cargando 20ml en cada triplicado)

D.O. de la muestras post inoculo = 0.223 (dilución 1/2)

$$\left(\frac{0.223 - 0.047}{1.956}\right) * 2 = 0.18g/l$$

T9 a 20°C													
Tiempo (hs)	Dilución	D.O a 600nm			D.O. a 600nm x fac. de dilución			LN (D.O. a 600nm x fac. de dilución)			Promedio triplicado	LN Promedio triplicado	Desviación estándar de LN (D.O a 600nm x fact de dilución)
		1	2	3	1	2	3	1	2	3			
0	1/10	0,119	0,119	0,119	1,190	1,190	1,190	0,1740	0,1740	0,1740	1,190	0,1740	0
8	1/10	0,382	0,398	0,394	3,820	3,980	3,940	1,3403	1,3813	1,3712	3,913	1,3644	0,021379
12	1/10	0,559	0,610	0,603	5,590	6,100	6,030	1,7210	1,8083	1,7967	5,907	1,7761	0,047429
15	1/10	0,906	0,974	0,956	9,060	9,740	9,560	2,2039	2,2762	2,2576	9,453	2,2464	0,037575
18	1/20	0,710	0,742	0,789	14,200	14,840	15,780	2,6532	2,6973	2,7587	14,940	2,7040	0,052987
33	1/30	0,590	0,597	0,574	17,700	17,910	17,220	2,8736	2,8854	2,8461	17,610	2,8685	0,020160
36	1/30	0,578	0,595	0,586	17,340	17,850	17,580	2,8530	2,8820	2,8668	17,590	2,8673	0,014500
39	1/30	0,610	0,633	0,581	18,300	18,990	17,430	2,9069	2,9439	2,8582	18,240	2,9036	0,042993

D.O. inoculo = 0.913(dilución 1/30)

$$\left(\frac{0.913 - 0.047}{1.956}\right) * 30 = 13.28g/l$$

Se desea partir de 0.5g/l de inoculo en un volumen final de 70ml (en matraz de 250ml): 1000ml - 0.5g
70ml - x =

0.035g

Por lo tanto, si se parte de: 13.28g en 1000ml, 0.035g se obtiene inoculando: 2.63ml

D.O. de la muestras post inoculo = 0.119 (dilución 1/10)

$$\left(\frac{0.119 - 0.047}{1.956}\right) * 10 = 0.37g/l$$

T9 a 15°C													
Tiempo (hs)	Dilución	D.O a 600nm			D.O. a 600nm x fac. de dilución			LN (D.O. a 600nm x fac. de dilución)			Promedio triplicado	LN Promedio triplicado	Desviación estándar de LN (D.O a 600nm x fact de dilución)
		1	2	3	1	2	3	1	2	3			
0	1/3	0,123	0,123	0,123	0,246	0,246	0,246	-1,4024	-1,4024	-1,4024	0,246	-1,4024	0
8	1/5	0,082	0,098	0,087	0,820	0,490	0,435	-0,1985	-0,7133	-0,8324	0,435	-0,8324	0,33694688
12	1/5	0,124	0,174	0,152	0,620	0,870	0,760	-0,4780	-0,1393	-0,2744	0,750	-0,2877	0,17053465
15	1/10	0,124	0,135	0,145	1,240	1,350	1,450	0,2151	0,3001	0,3716	1,347	0,2976	0,07832360
18	1/10	0,278	0,261	0,269	2,780	2,610	2,690	1,0225	0,9594	0,9895	2,693	0,9908	0,03156011
33	1/20	0,254	0,240	0,238	5,080	4,800	4,760	1,6253	1,5686	1,5602	4,880	1,5851	0,03539694
36	1/20	0,269	0,257	0,255	5,380	5,140	5,100	1,6827	1,6371	1,6292	5,207	1,6499	0,02886834

D.O. inoculo = 0.168(dilución 1/10)

$$\left(\frac{0.168 - 0.047}{1.956}\right) * 10 = 0.62g/l$$

Se desea partir de 0.5g/l de inoculo en un volumen final de 70ml (en matraz de 250ml): 1000ml - 0.5g
70ml - x =

0.035g

Por lo tanto, si se parte de: 0.62g en 1000ml, 0.035g se obtiene inoculando: 56.45ml*

(*por falta de volumen, se termina cargando 24ml en cada triplicado)

D.O. de la muestras post inoculo = 0.123 (dilución 1/3)

$$\left(\frac{0.123 - 0.047}{1.956}\right) * 3 = 0.12g/l$$

T9 a 10°C													
Tiempo (hs)	Dilución	D.O a 600nm			D.O. a 600nm x fac. de dilución			LN (D.O. a 600nm x fac. de dilución)			Promedio triplicado	LN Promedio triplicado	Desviación estándar de LN (D.O a 600nm x fact de dilución)
		1	2	3	1	2	3	1	2	3			
0	1/2	0,211	0,211	0,211	0,422	0,422	0,422	-0,8627	-0,8627	-0,8627	0,422	-0,8627	0
10	1/3	0,230	0,239	0,214	0,690	0,717	0,642	-0,3711	-0,3327	-0,4432	0,683	-0,3813	0,056094758
13	1/3	0,282	0,269	0,255	0,846	0,807	0,765	-0,1672	-0,2144	-0,2679	0,806	-0,2157	0,050354119
16	1/3	0,343	0,325	0,314	1,029	0,975	0,942	0,0286	-0,0253	-0,0598	0,982	-0,0182	0,044525013
21	1/3	0,480	0,454	0,453	1,440	1,362	1,359	0,3646	0,3090	0,3067	1,387	0,3271	0,032807086
34	1/10	0,357	0,324	0,321	3,570	3,240	3,210	1,2726	1,1756	1,1663	3,340	1,2060	0,058867915
38	1/10	0,496	0,433	0,445	4,960	4,330	4,450	1,6014	1,4656	1,4929	4,580	1,5217	0,071846956

D.O. inoculo = 0.573(dilución 1/3)

$$\left(\frac{0.573 - 0.047}{1.956}\right) * 3 = 0.81g/l$$

Se desea partir de 0.5g/l de inoculo en un volumen final de 70ml (en matraz de 250ml): 1000ml - 0.5g
70ml - x =

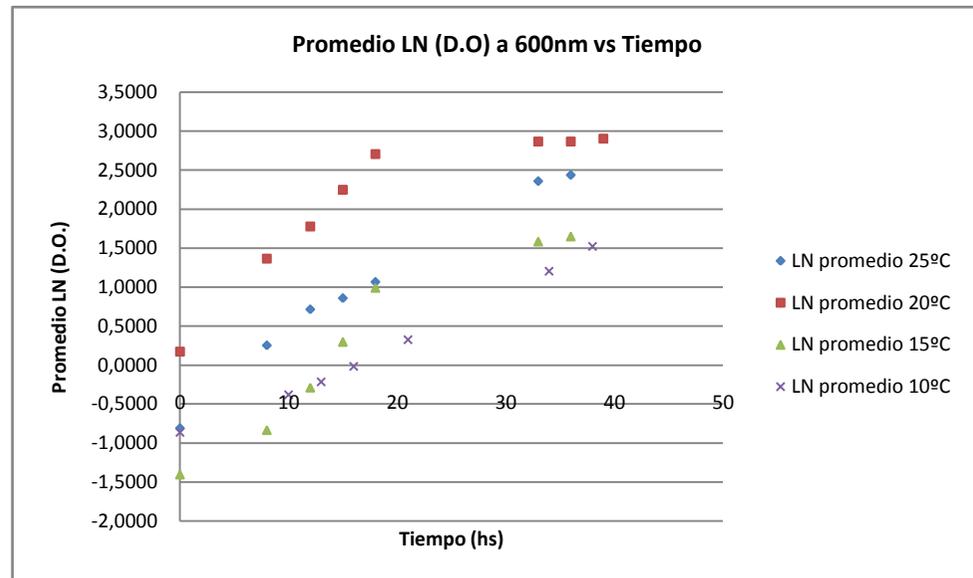
0.035g

Por lo tanto, si se parte de: 0.81g en 1000ml, 0.035g se obtiene inoculando: 43.20ml*

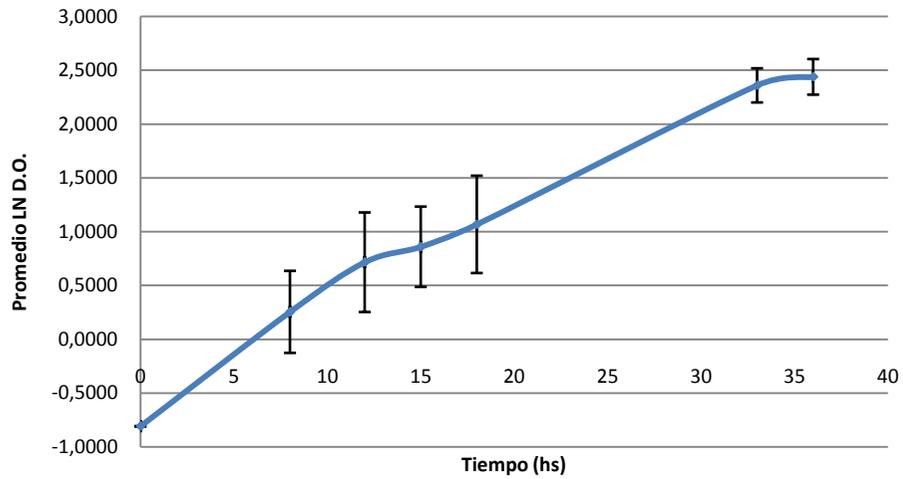
(por falta de volumen, se termina cargando 17ml en cada triplicado)

D.O. de la muestras post inoculo = 0.211 (dilución 1/2)

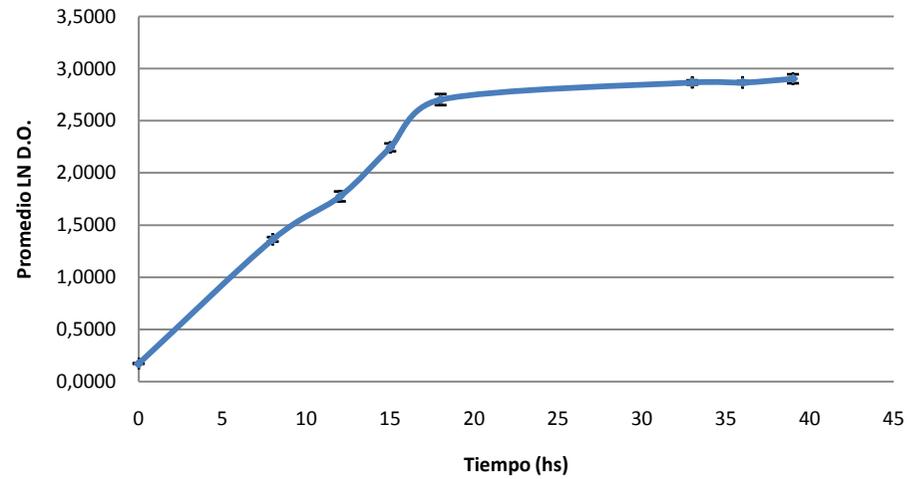
$$\left(\frac{0.211 - 0.047}{1.956}\right) * 2 = 0.17g/l$$



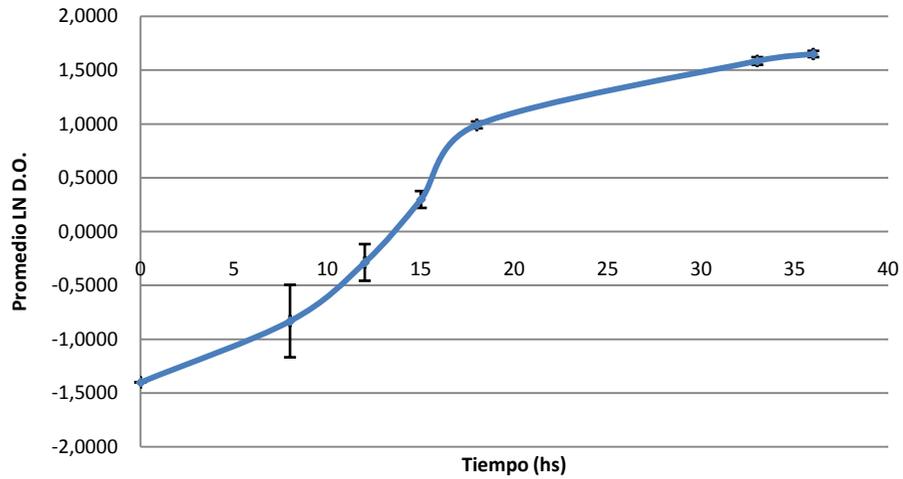
Promedio LN D.O. 25°C vs Tiempo



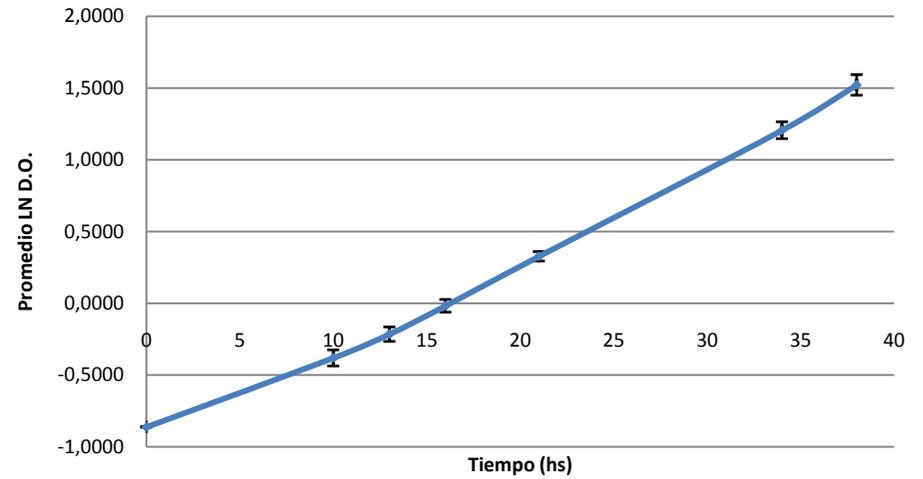
Promedio LN D.O. 20°C vs Tiempo

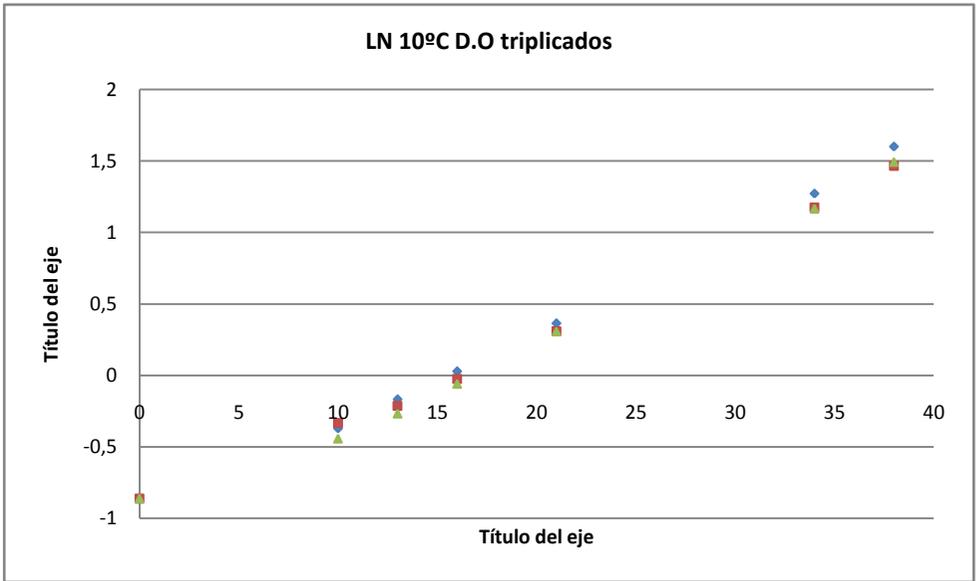
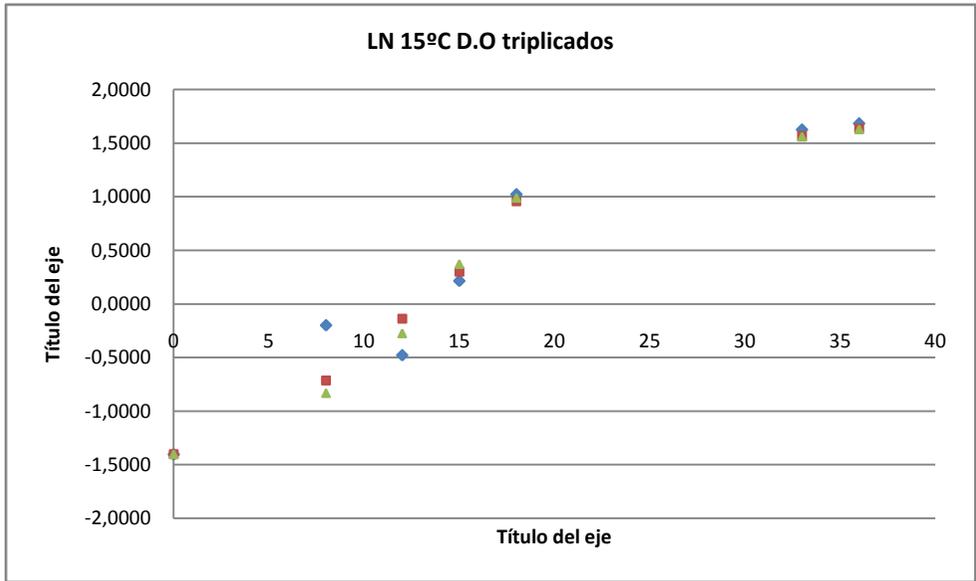
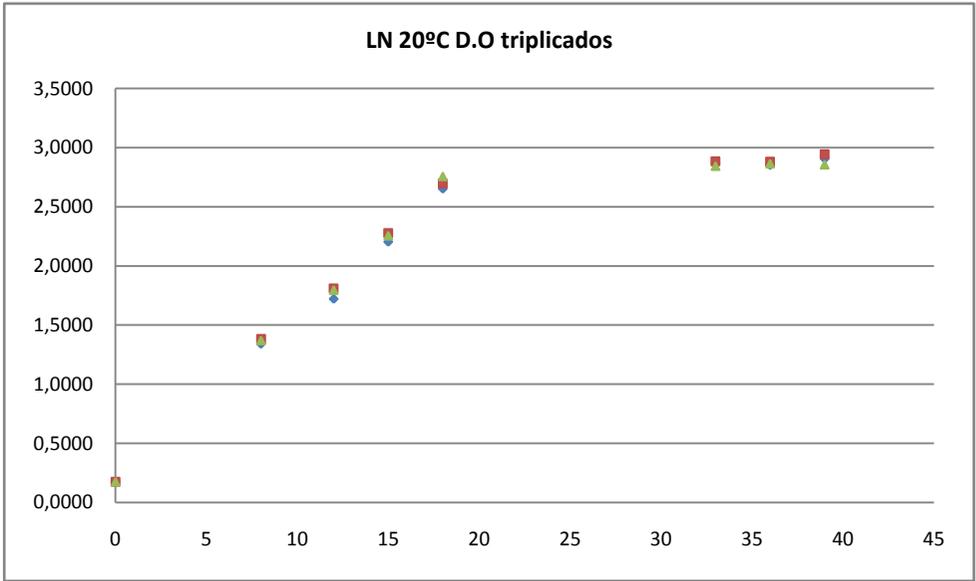
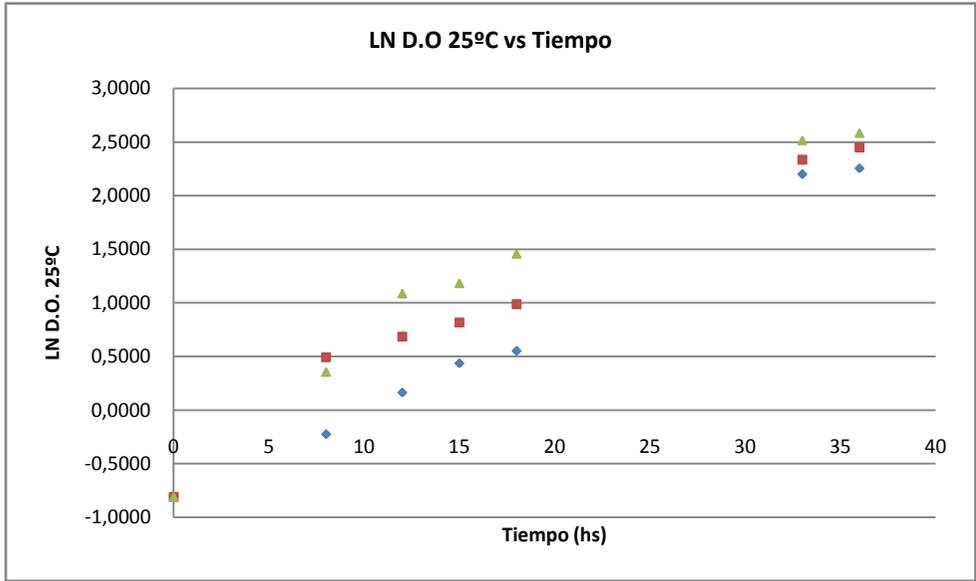


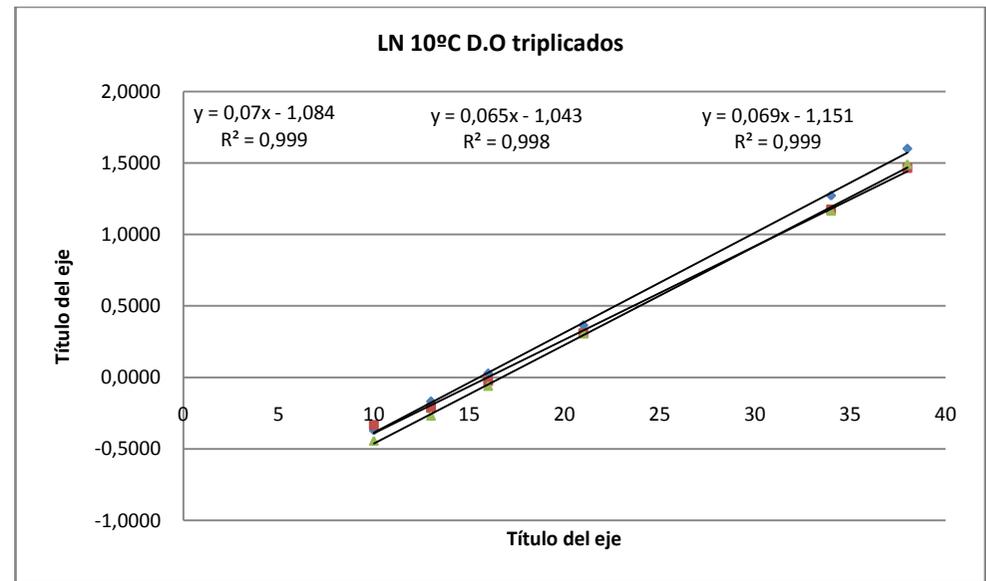
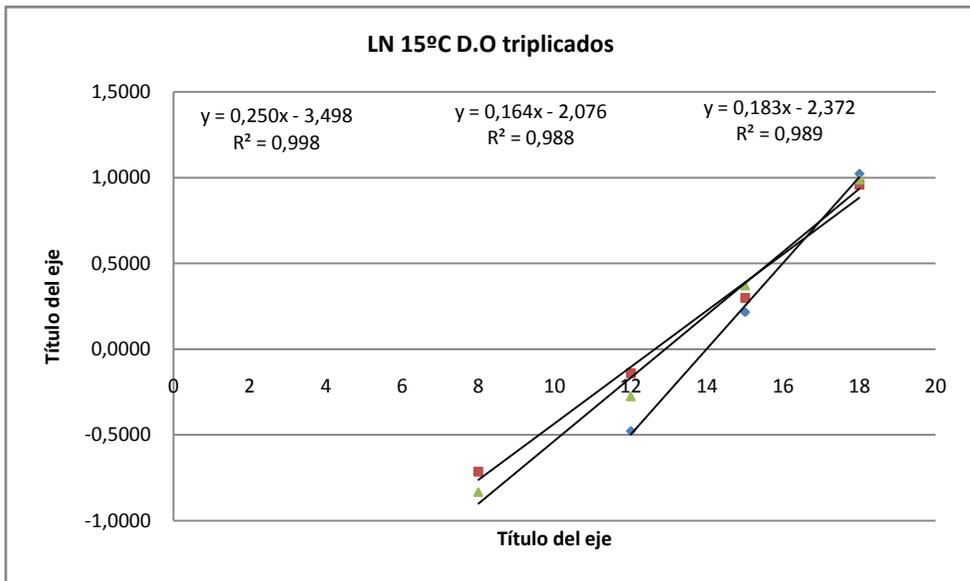
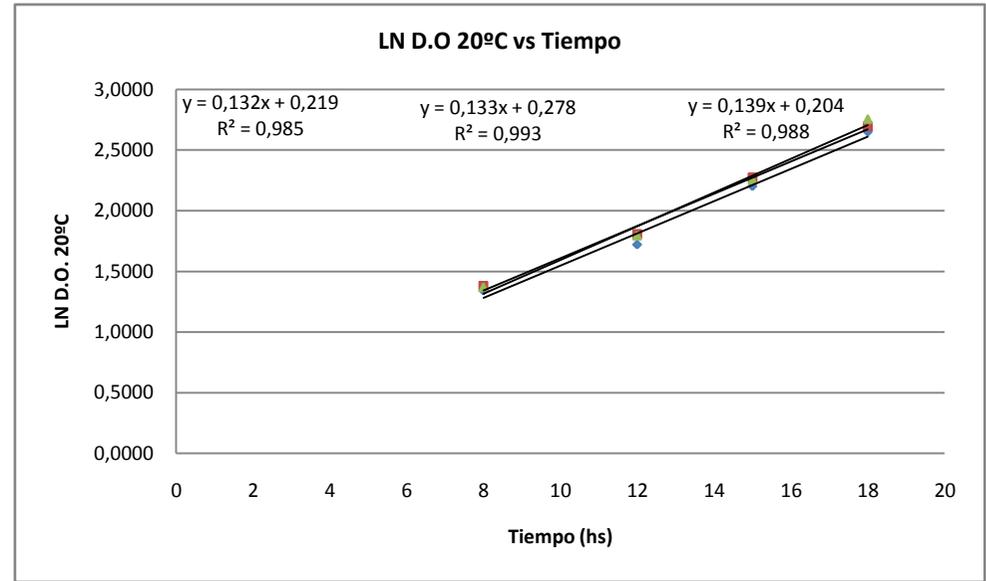
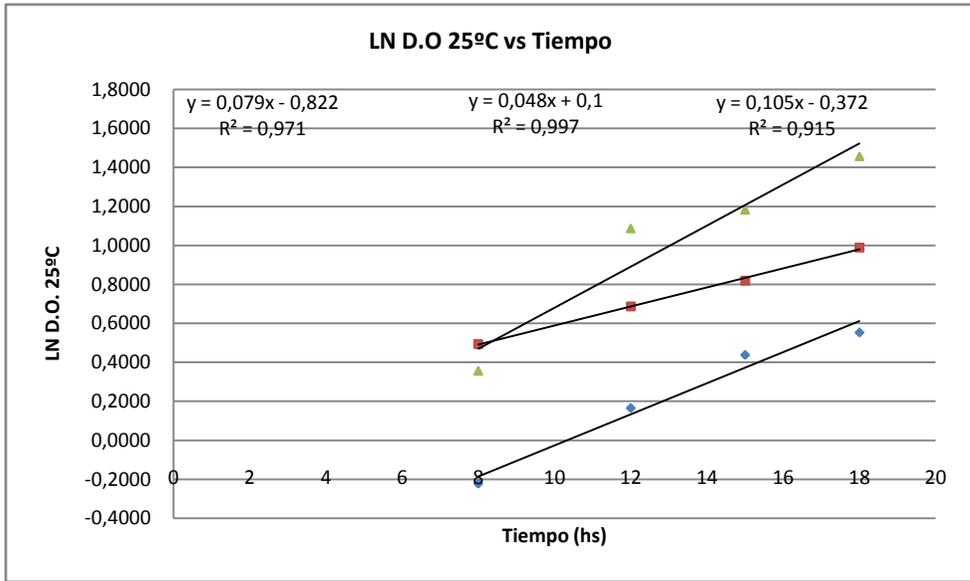
Promedio LN D.O. 15°C vs Tiempo



Promedio LN D.O. 10°C vs Tiempo







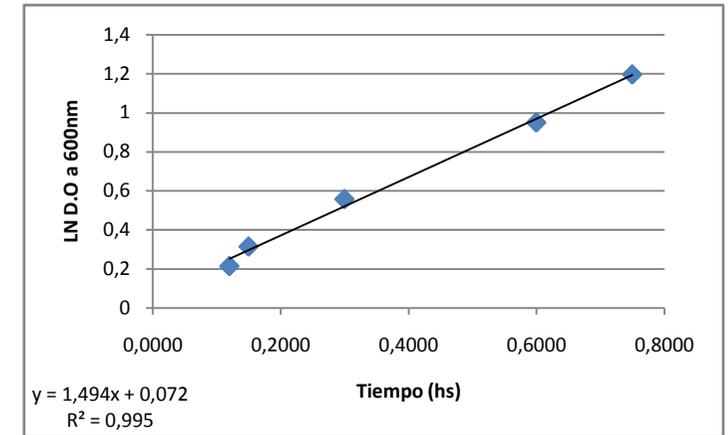
T14 (Cryptococcus)

Determinación de la correspondencia entre el peso seco y la densidad óptica del cultivo

Curva de Calibración					
Cepa	Peso antes (g)	Peso después (g)	Diferencia (g)	Transformación a g/l	Promedio (g/l)
T14	4.8647	4.9252	0.0605	6.050	5.9966
	5.0167	5.0762	0.0595	5.950	
	5.0199	5.0798	0.0599	5.990	

Se partió de 10ml de muestra.

Dilución	g/l promedio normalizado	D.O. medida a 600nm
1/6	0.9994	1.275
1/8	0.7496	1.196
1/10	0.5997	0.950
1/20	0.2998	0.557
1/40	0.1499	0.314
1/50	0.1199	0.214



Medida del crecimiento en función de la temperatura y el tiempo de incubación

T14 a 25°C													
Tiempo (hs)	Dilución	D.O a 600nm			D.O. a 600nm x fac. de dilución			LN (D.O. a 600nm x fac. de dilución)			Promedio triplicado	LN Promedio triplicado	Desviación estándar de LN (D.O a 600nm x fact de dilución)
		1	2	3	1	2	3	1	2	3			
0	1/2	0,426	0,426	0,426	0,852	0,852	0,852	-0,1602	-0,1602	-0,1602	0,8520	-0,1602	0
8	1/10	0,398	0,296	0,154	3,980	2,960	1,540	1,3813	1,0852	0,4318	2,8267	1,0391	0,48582583
12	1/10	0,570	0,690	0,405	5,700	6,900	4,050	1,7405	1,9315	1,3987	5,5500	1,7138	0,26993065
15	1/10	0,756	0,880	0,644	7,560	8,800	6,440	2,0229	2,1748	1,8625	7,6000	2,0281	0,1561307
18	1/20	0,491	0,544	0,383	9,820	10,880	7,660	2,2844	2,3869	2,0360	9,4533	2,2464	0,18044169
33	1/20	0,660	0,620	0,690	13,200	12,400	13,800	2,5802	2,5177	2,6247	13,1333	2,5752	0,05373979
36	1/20	0,674	0,595	0,587	13,480	11,900	11,740	2,6012	2,4765	2,4630	12,3733	2,5155	0,07618642

D.O. inoculo = 0.540 (dilución 1/20)

$$\left(\frac{0.540 - 0.072}{1.494}\right) * 20 = 6.27g/l$$

Se desea partir de 0.5g/l de inoculo en un volumen final de 70ml (en matraz de 250ml): 1000ml - 0.5g
70ml - x =

0.035g

Por lo tanto, si se parte de: 6.27g en 1000ml, 0.035g se obtiene inoculando: 5.58ml

D.O. de la muestras post inoculo = 0.426 (dilución 1/2)

$$\left(\frac{0.426 - 0.072}{1.494}\right) * 2 = 0.47g/l$$

T14 a 20°C													
Tiempo (hs)	Dilución	D.O a 600nm			D.O. a 600nm x fac. de dilución			LN (D.O. a 600nm x fac. de dilución)			Promedio triplicado	LN Promedio triplicado	Desviación estándar de LN (D.O a 600nm x fact de dilución)
		1	2	3	1	2	3	1	2	3			
0	1/10	0,104	0,104	0,104	1,040	1,040	1,040	0,0392	0,0392	0,0392	1,040	0,0392	0
11	1/10	0,483	0,495	0,519	4,830	4,950	5,190	1,5748	1,5994	1,6467	4,990	1,6074	0,03654152
14	1/10	0,679	0,718	0,655	6,790	7,180	6,550	1,9155	1,9713	1,8795	6,840	1,9228	0,04627378
18	1/10	0,949	0,872	0,900	9,490	8,720	9,000	2,2502	2,1656	2,1972	9,070	2,2050	0,04275867
20	1/20	0,497	0,522	0,503	9,940	10,440	10,060	2,2966	2,3456	2,3086	10,147	2,3172	0,02558432
34	1/30	0,425	0,435	0,465	12,750	13,050	13,950	2,5455	2,5688	2,6355	13,250	2,5840	0,04668923
37	1/30	0,436	0,450	0,475	13,080	13,500	14,250	2,5711	2,6027	2,6568	13,610	2,6108	0,04332426
41	1/30	0,431	0,436	0,449	12,930	13,080	13,470	2,5596	2,5711	2,6005	13,160	2,5772	0,02109613

D.O. inoculo = 0.778 (dilución 1/30)

$$\left(\frac{0.778 - 0.072}{1.494}\right) * 30 = 14.18g/l$$

Se desea partir de 0.5g/l de inoculo en un volumen final de 70ml (en matraz de 250ml): 1000ml - 0.5g
70ml - x =

0.035g

Por lo tanto, si se parte de: 14.18g en 1000ml, 0.035g se obtiene inoculando: 2.47ml

D.O. de la muestras post inoculo = 0.104 (dilución 1/10)

$$\left(\frac{0.104 - 0.072}{1.494}\right) * 10 = 0.21g/l$$

T14 a 15°C													
Tiempo (hs)	Dilución	D.O a 600nm			D.O. a 600nm x fac. de dilución			LN (D.O. a 600nm x fac. de dilución)			Promedio triplicado	LN Promedio triplicado	Desviación estándar de LN (D.O a 600nm x fact de dilución)
		1	2	3	1	2	3	1	2	3			
0	1/3	0,387	0,387	0,387	1,161	1,161	1,161	0,1493	0,1493	0,1493	1,161	0,1493	0
10	1/10	0,398	0,296	0,154	3,980	2,960	1,540	1,3813	1,0852	0,4318	2,827	1,0391	0,48582583
13	1/10	0,415	0,394	0,384	4,150	3,940	3,840	1,4231	1,3712	1,3455	3,977	1,3804	0,039549
16	1/10	0,592	0,589	0,569	5,920	5,890	5,690	1,7783	1,7733	1,7387	5,833	1,7636	0,02156175
21	1/20	0,324	0,367	0,421	6,480	7,340	8,420	1,8687	1,9933	2,1306	7,413	2,0033	0,13099559
34	1/30	0,421	0,435	0,461	12,630	13,050	13,830	2,5361	2,5688	2,6268	13,170	2,5779	0,04596831
38	1/30	0,437	0,449	0,467	13,110	13,470	14,010	2,5734	2,6005	2,6398	13,530	2,6049	0,03338483
42	1/30	0,431	0,429	0,455	12,930	12,870	13,650	2,5596	2,5549	2,6137	13,150	2,5764	0,03271167

D.O. inoculo = 0.445 (dilución 1/30)

$$\left(\frac{0.445 - 0.072}{1.494}\right) * 30 = 7,49g/l$$

Se desea partir de 0.5g/l de inoculo en un volumen final de 70ml (en matraz de 250ml): 1000ml - 0.5g
70ml - x =

0.035g

Por lo tanto, si se parte de: 7.49g en 1000ml, 0.035g se obtiene inoculando: 4.67ml

D.O. de la muestras post inoculo = 0.387 (dilución 1/3)

$$\left(\frac{0.387 - 0.072}{1.494}\right) * 3 = 0.63g/l$$

T14 a 10°C													
Tiempo (hs)	Dilución	D.O a 600nm			D.O. a 600nm x fac. de dilución			LN (D.O. a 600nm x fac. de dilución)			Promedio triplicado	LN Promedio triplicado	Desviación estándar de LN (D.O a 600nm x fact de dilución)
		1	2	3	1	2	3	1	2	3			
0	1/2	0,512	0,512	0,512	1,024	1,024	1,024	0,0237	0,0237	0,0237	1,024	0,0237	0
10	1/5	0,767	0,77	0,782	3,835	3,850	3,910	1,3442	1,3481	1,3635	3,865	1,3520	0,01024287
13	1/5	0,795	0,744	0,815	3,975	3,720	4,075	1,3800	1,3137	1,4049	3,923	1,3669	0,04711855
16	1/6	0,860	0,886	0,910	5,160	5,316	5,460	1,6409	1,6707	1,6974	5,312	1,6700	0,02826988
21	1/6	1,067	1,080	1,103	6,402	6,480	6,618	1,8566	1,8687	1,8898	6,500	1,8718	0,01679191
34	1/15	0,831	0,813	0,859	12,465	12,195	12,885	2,5229	2,5010	2,5561	12,515	2,5269	0,02770955
38	1/30	0,442	0,490	0,494	13,260	14,700	14,820	2,5848	2,6878	2,6960	14,260	2,6575	0,06200259

D.O. inoculo = 0.689 (dilución 1/10)

$$\left(\frac{0.689 - 0.072}{1.494}\right) * 10 = 4.13g/l$$

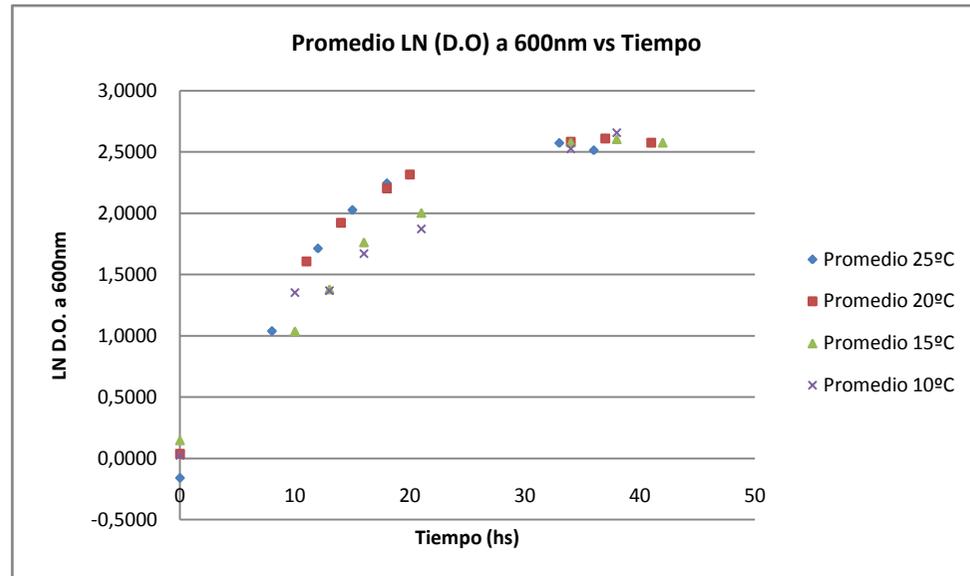
Se desea partir de 0.5g/l de inoculo en un volumen final de 70ml (en matraz de 250ml): 1000ml - 0.5g
70ml - x =

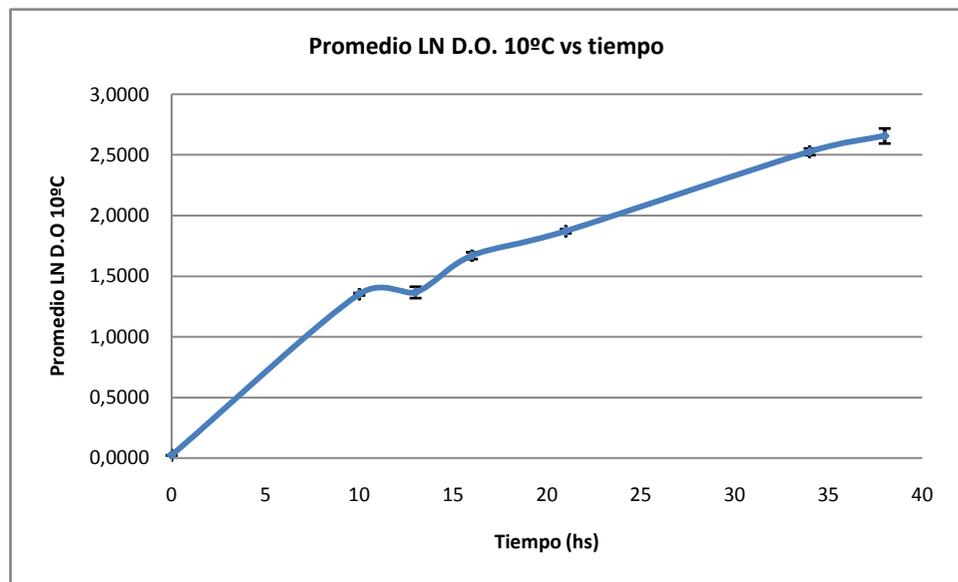
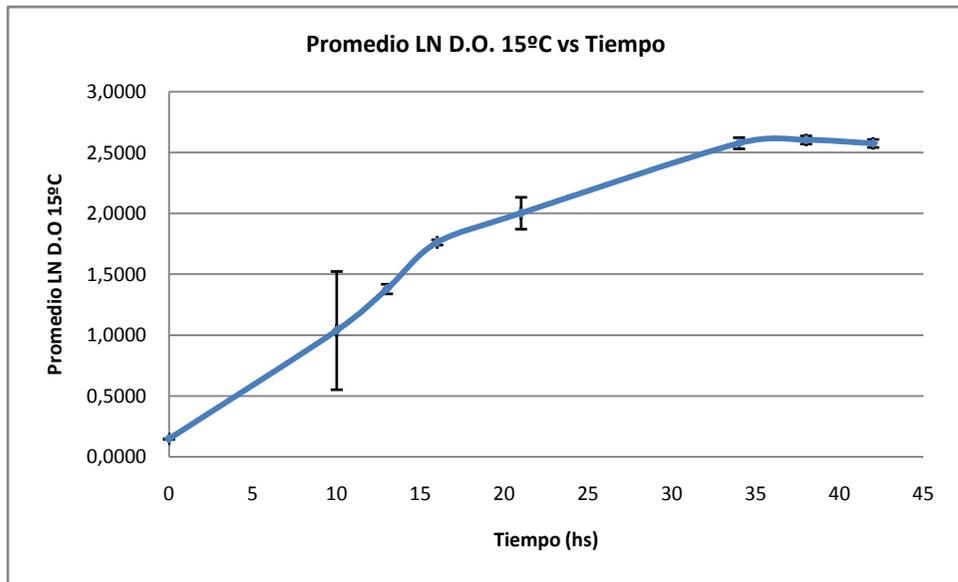
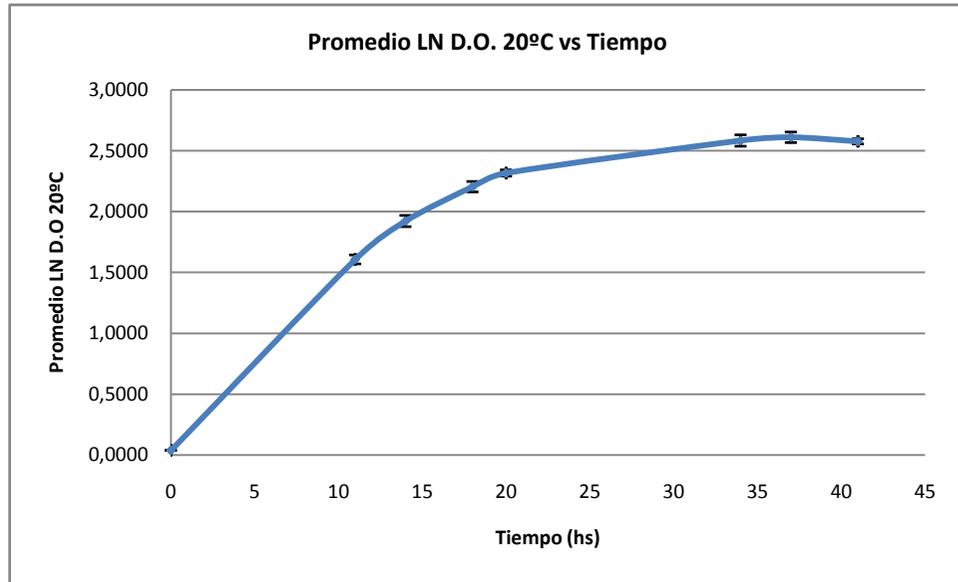
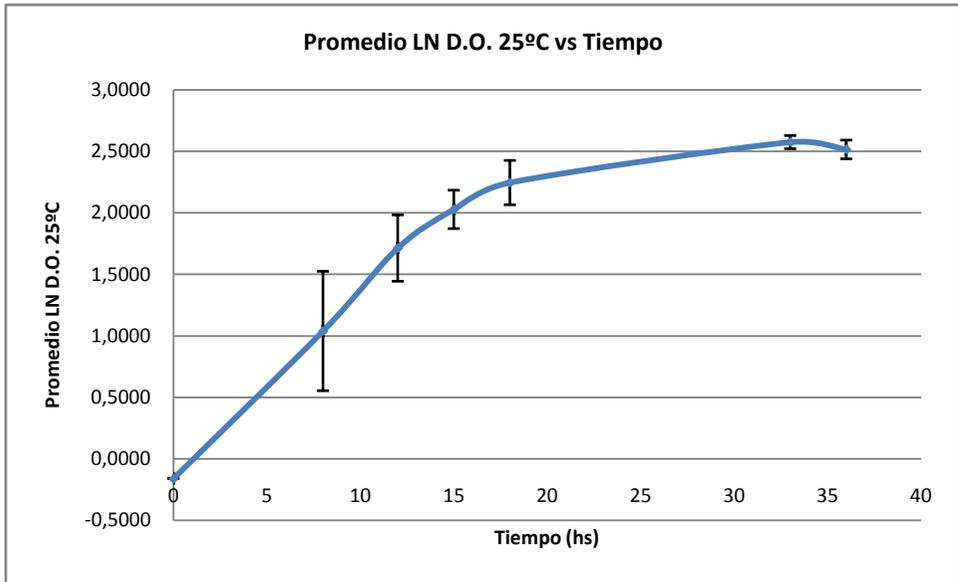
0.035g

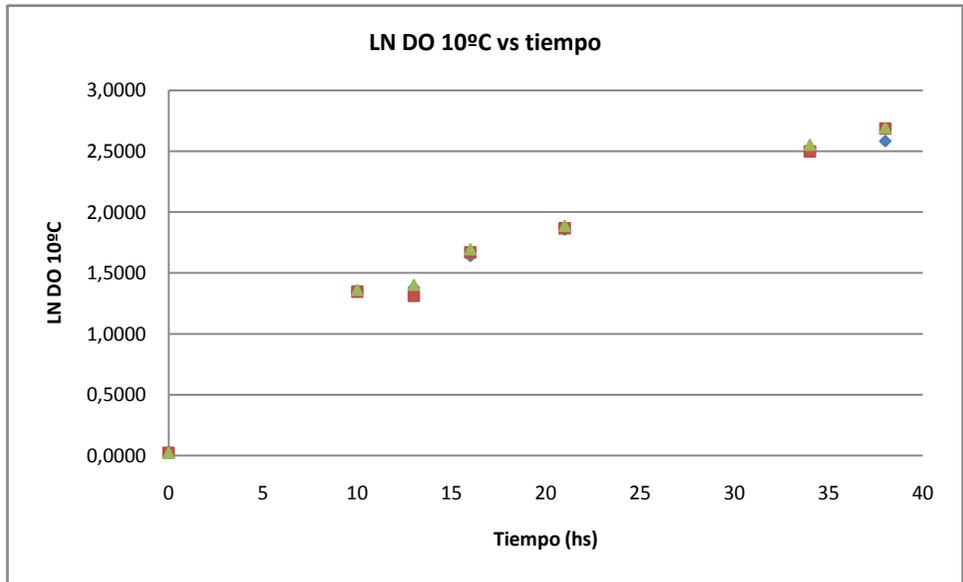
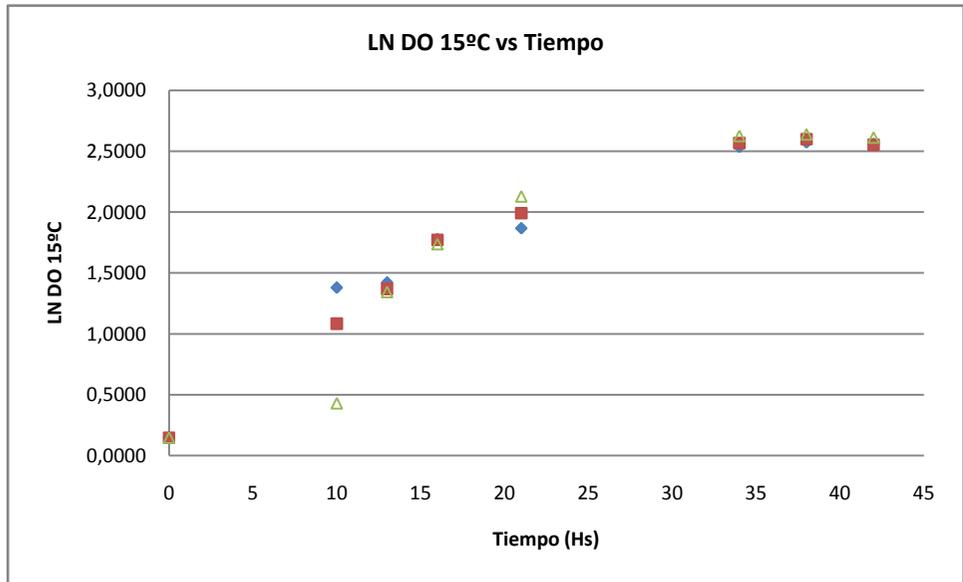
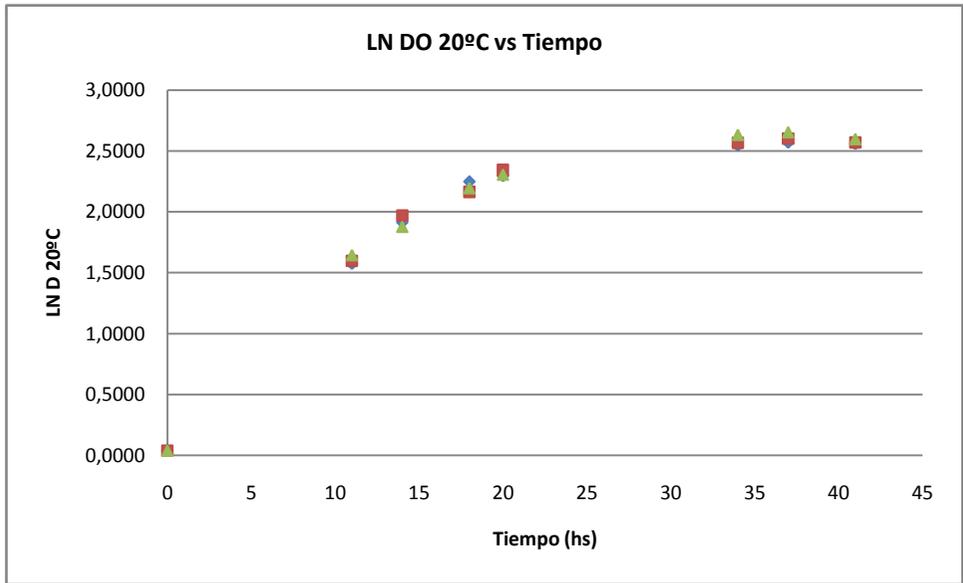
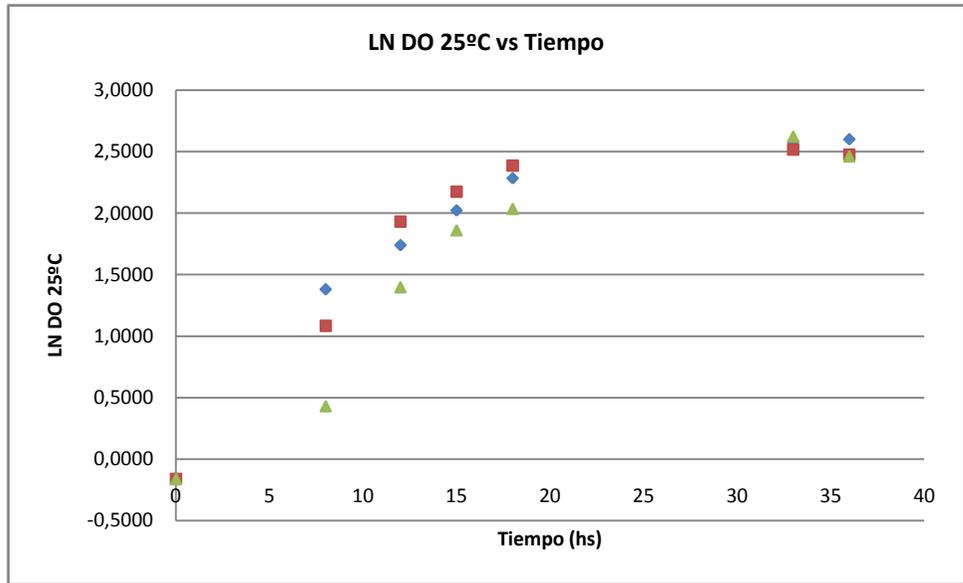
Por lo tanto, si se parte de: 4.13g en 1000ml, 0.035g se obtiene inoculando: 8.47ml

D.O. de la muestras post inoculo = 0.512 (dilución 1/2)

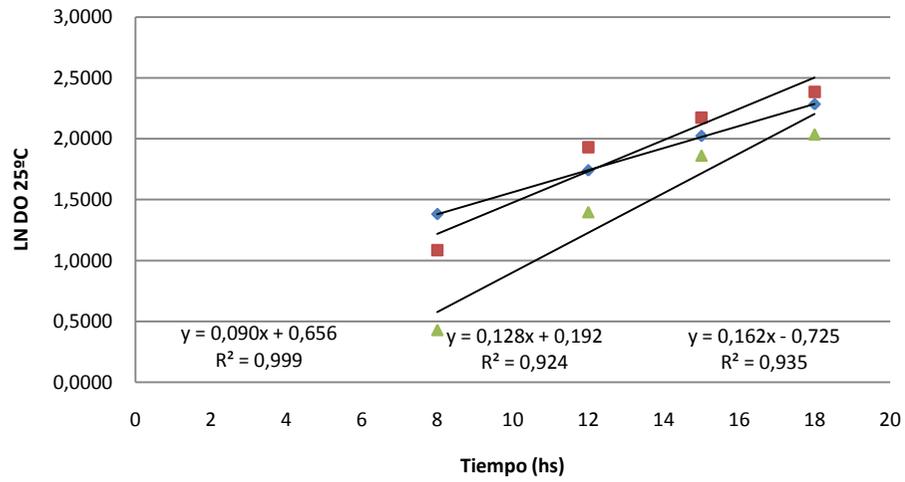
$$\left(\frac{0.512 - 0.072}{1.494}\right) * 2 = 0.59g/l$$



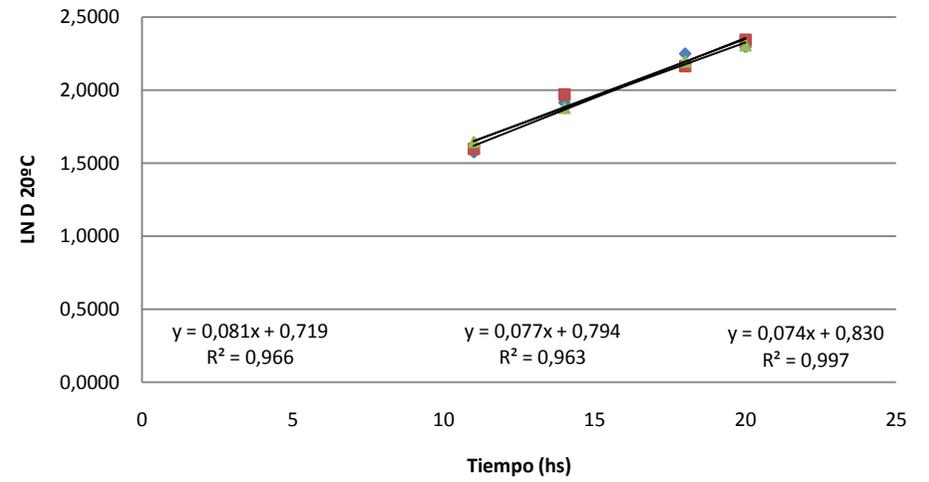




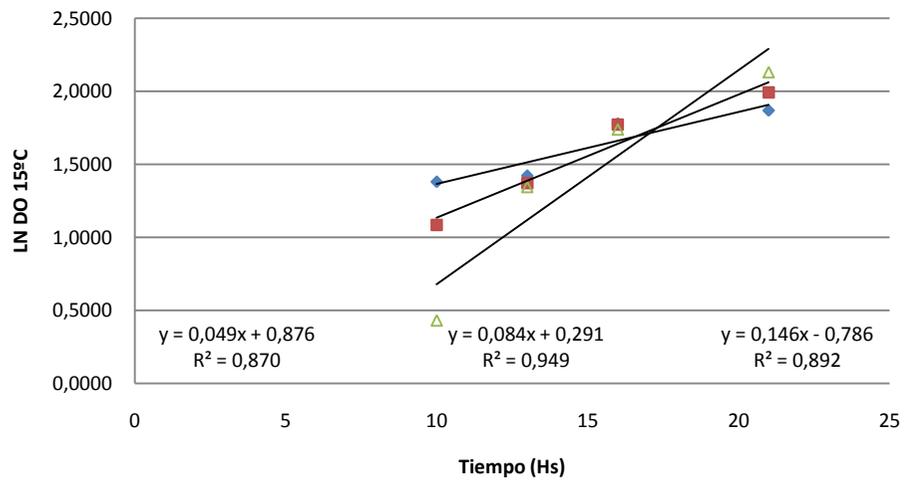
LN DO 25°C vs Tiempo



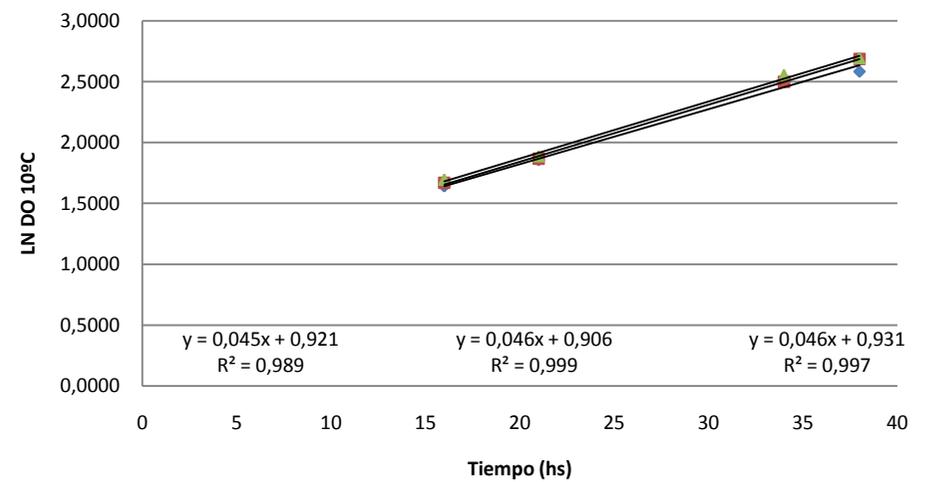
LN DO 20°C vs Tiempo



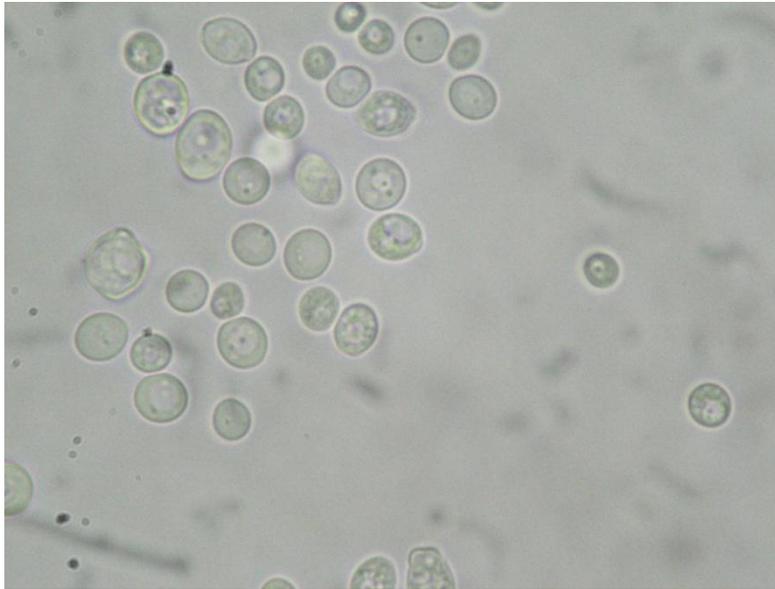
LN DO 15°C vs Tiempo



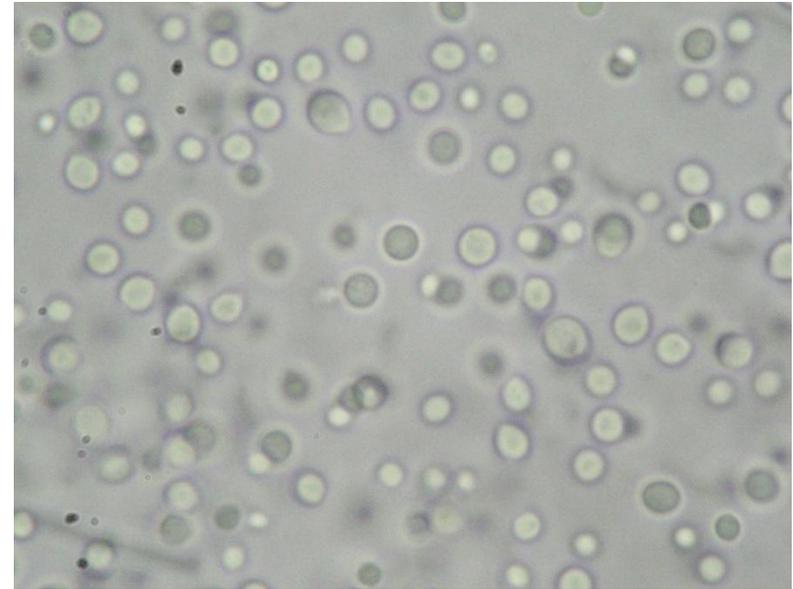
LN DO 10°C vs tiempo



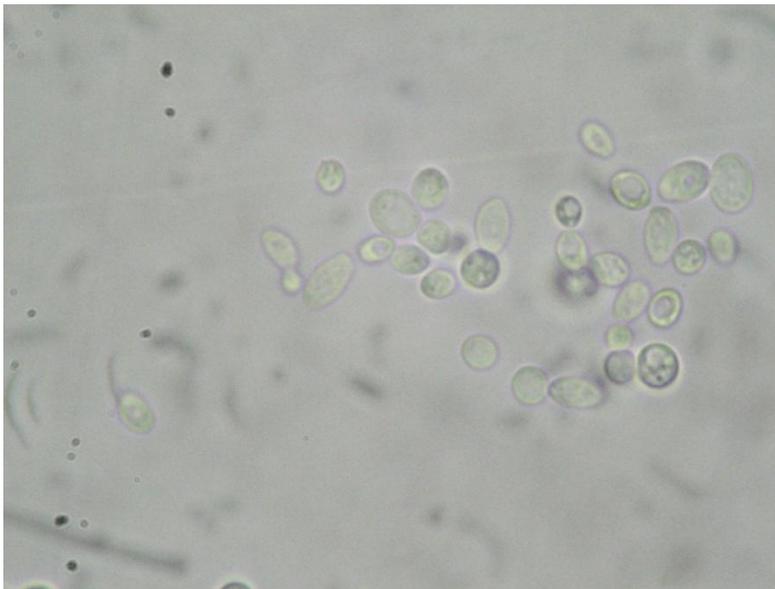
Anexo V: Características morfológicas



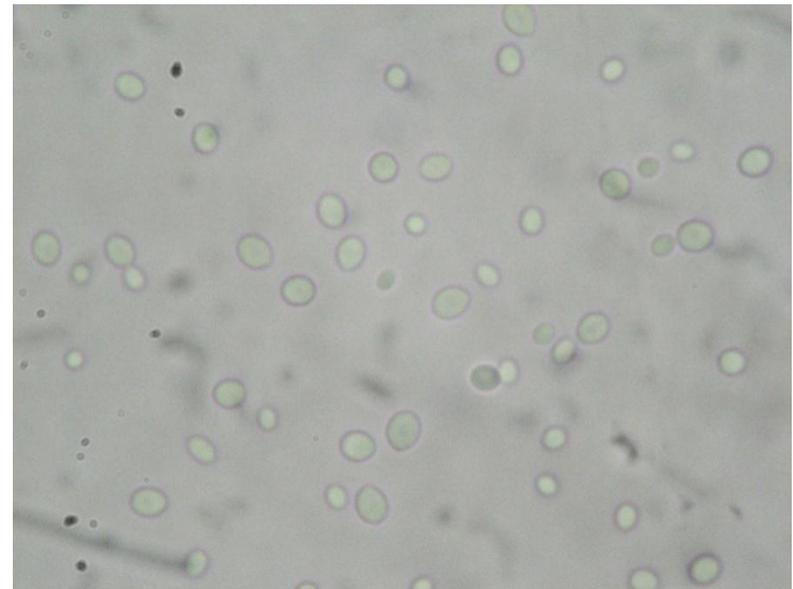
T1 - 400X - lamina/laminilla



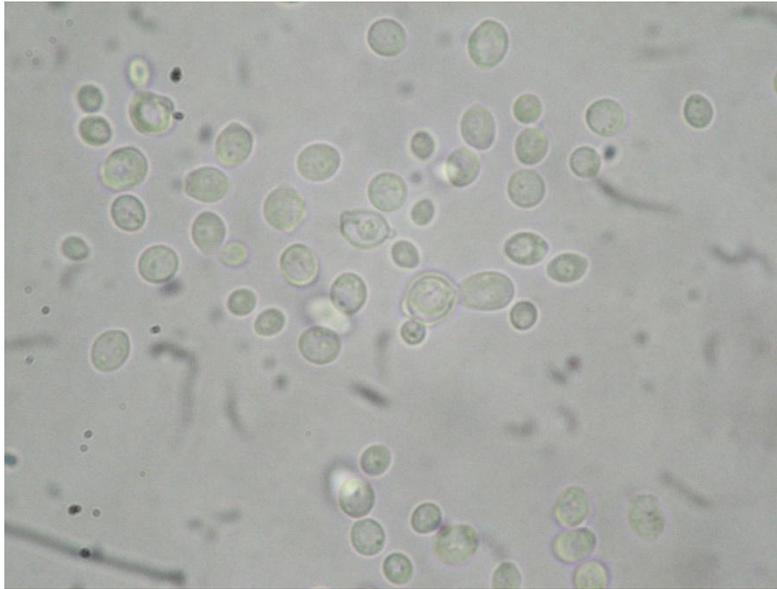
T2 - 400X - lamina/laminilla



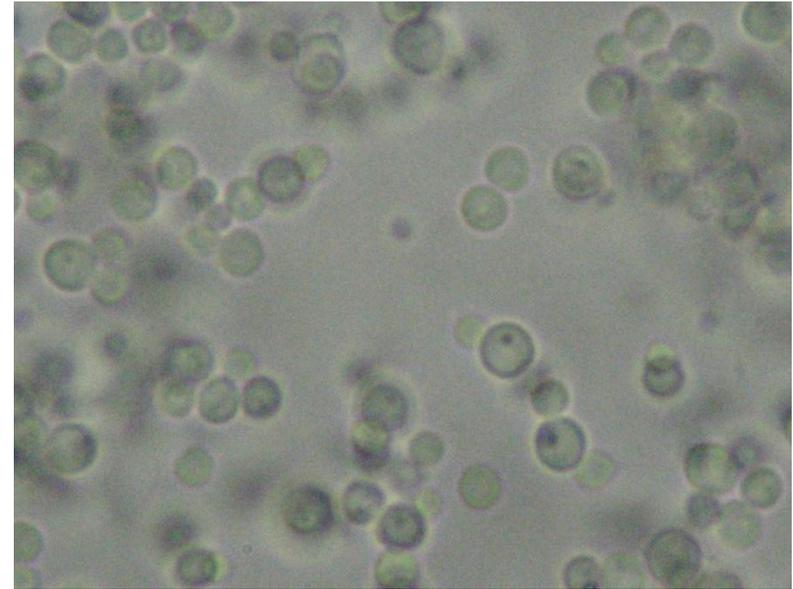
T3 - 400X - lamina/laminilla



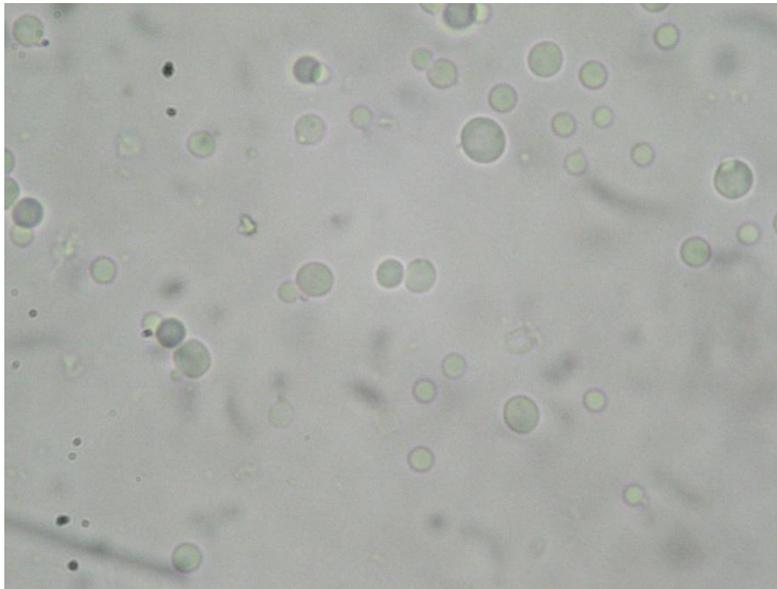
T4 - 400X - lamina/laminilla



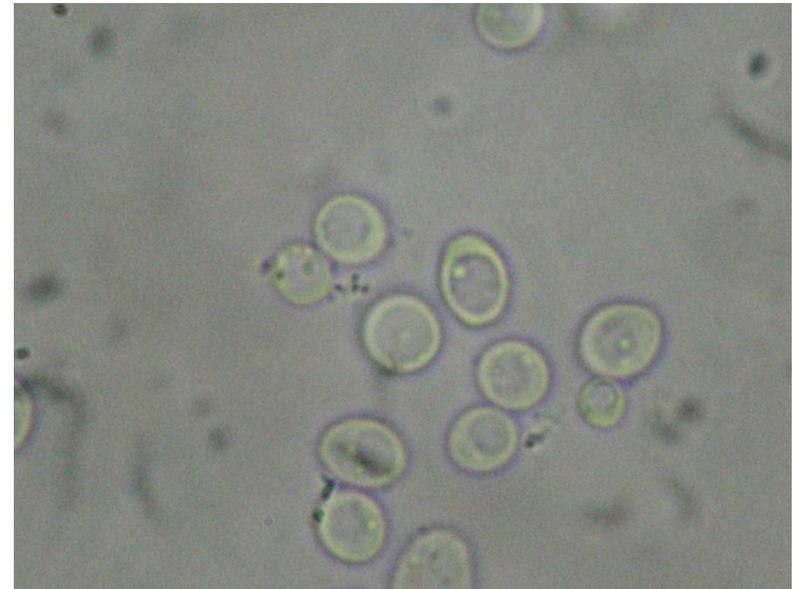
T5 - 400X - lamina/laminilla



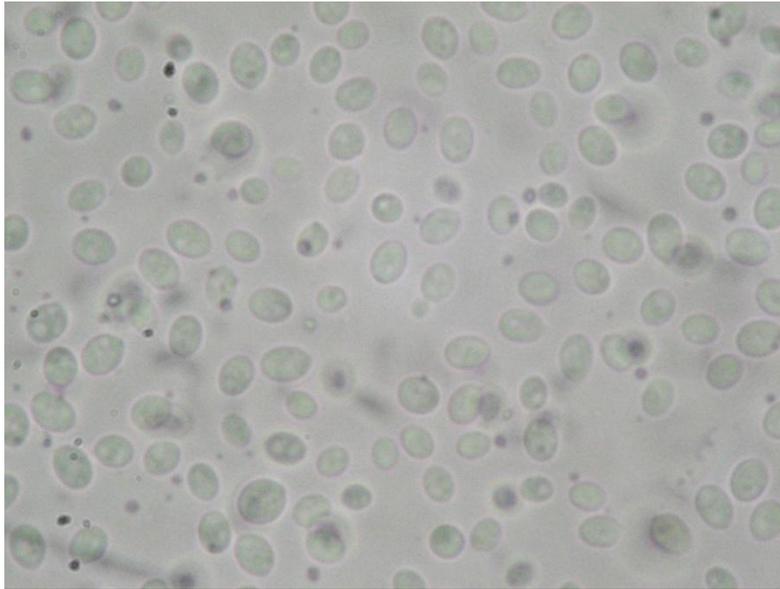
T6 - 400X - lamina/laminilla



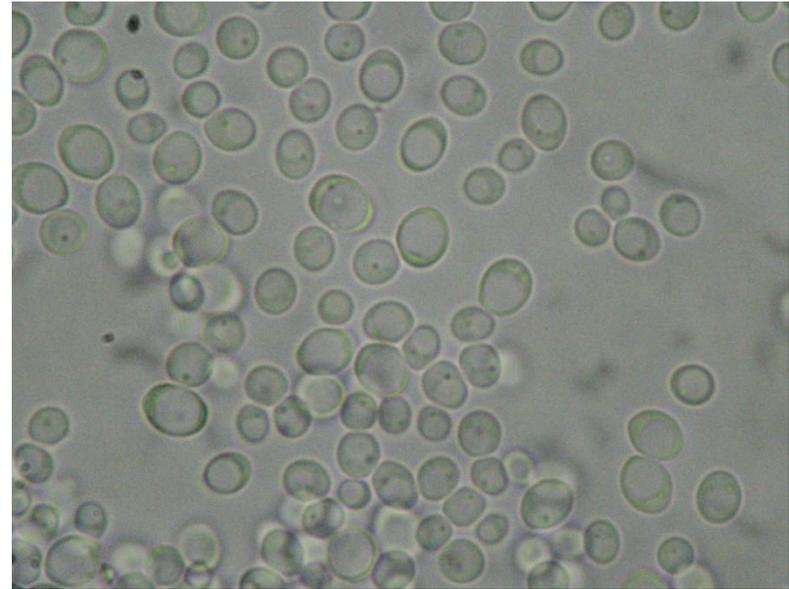
T7 - 400X - lamina/laminilla



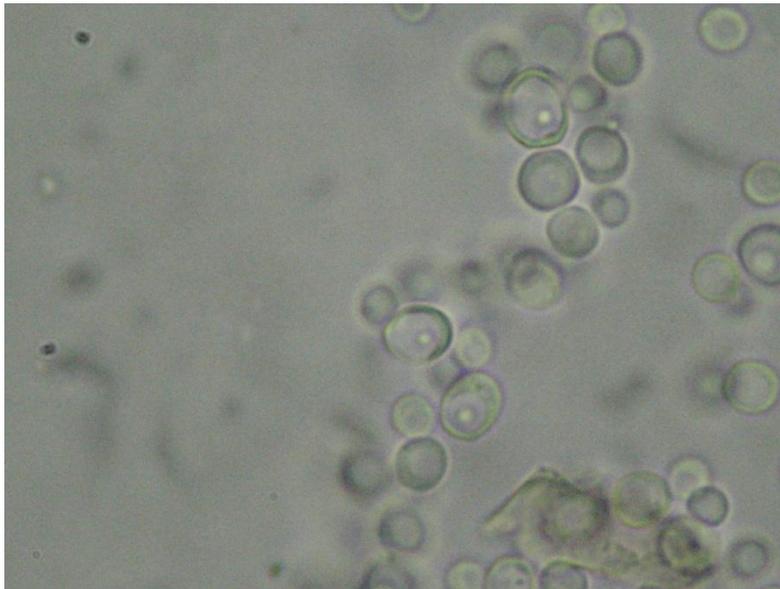
T8 - 400X - lamina/laminilla



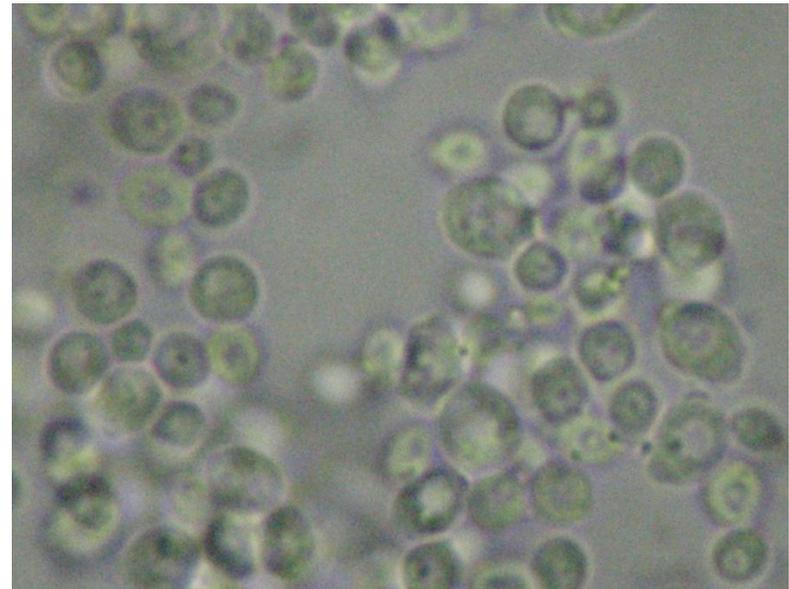
T9 - 400X - lamina/laminilla



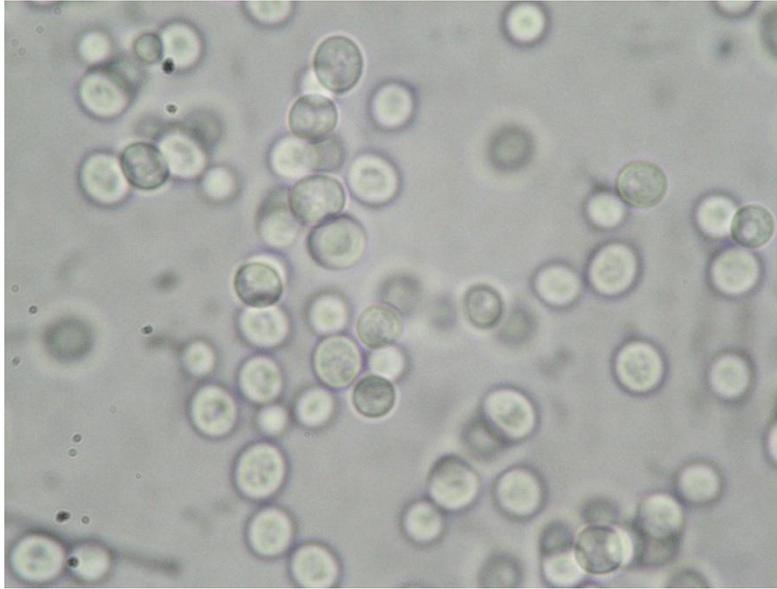
T10 - 400X - lamina/laminilla



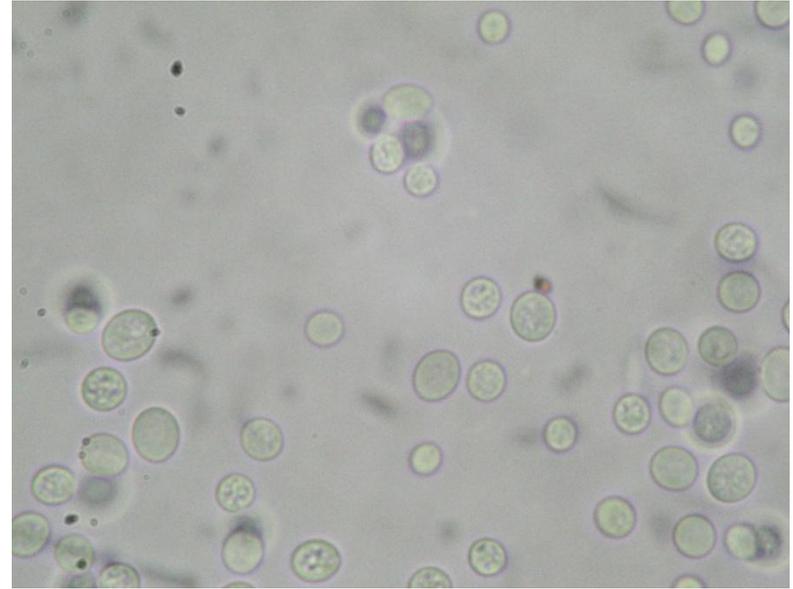
T11 - 400X - lamina/laminilla



T12 - 400X - lamina/laminilla



T13 - 400X - lamina/laminilla



T14 - 400X - lamina/laminilla