



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS
CARRERA DE INGENIERÍA BIOQUÍMICA

Proyecto de Trabajo de Titulación, modalidad Proyecto de Investigación, previo la obtención del Título de Ingeniera Bioquímica, otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos.

**Análisis de la resistencia a estrés por metales pesados de levaduras
aisladas del volcán Tungurahua, Ecuador.**

Autora: María Fernanda Moreta Changoluisa

Tutora: Ph.D. Gloria Serrano Bueno

Ambato – Ecuador

Febrero 2016

APROBACIÓN DEL TUTOR

PhD. Gloria Serrano Bueno

CERTIFICA:

Que el presente Trabajo de Titulación modalidad Proyecto de Investigación ha sido prolijamente revisado. Por lo tanto autorizo la presentación de este Proyecto de Investigación, el mismo que responde a las normas establecidas en el Reglamento de Títulos y Grados de la Facultad.

Ambato, 16 de Diciembre de 2015.



Ph.D. Gloria Serrano Bueno
C.I: 28827695R
TUTORA

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo, María Fernanda Moreta Changoluisa, manifiesto que los resultados obtenidos en el presente Proyecto de Investigación, previo la obtención del título de Ingeniera Bioquímica son absolutamente originales, auténticos y personales; a excepción de las citas.

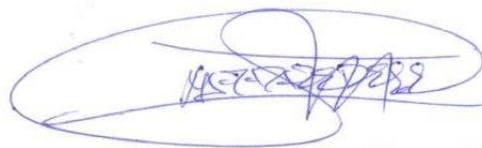
A photograph of a handwritten signature in blue ink on a white background. The signature reads "María F. Moreta" in a cursive script.

Srta. María Fernanda Moreta Changoluisa
C.I. 050385905-0
AUTORA

APROBACIÓN DE LOS MIEMBROS DE TRIBUNAL DE GRADO

Los suscritos profesores Calificadores, aprueban el presente Trabajo de Titulación modalidad Proyecto de Investigación, el mismo que ha sido elaborado de conformidad con las disposiciones emitidas por la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos de la Universidad Técnica de Ambato.

Para constancia firman:



Presidente del Tribunal



Lic. Mg. Yunys Pérez Betancourt
C.I. 175647274-0



Ph.D. Milton Rubén Ramos Moya
C.I. 1801119635

Ambato, 18 de Enero de 2016

DERECHOS DE AUTOR

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato, para que haga de este Proyecto de Investigación o parte de él, un documento disponible para su lectura, consulta y procesos de investigación, según las normas de la Institución.

Cedo los Derechos en línea patrimoniales de mi Proyecto, con fines de difusión pública, además apruebo la reproducción de este Proyecto dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia económica y se realice respetando mis derechos de autor.

A handwritten signature in blue ink, reading "María F. Moreta". The signature is written in a cursive style with a large, stylized initial 'M'.

María Fernanda Moreta Changoluisa
C.I. 050385905-0
AUTORA

AGRADECIMIENTO

Educación es lo que queda después de olvidar lo que se ha aprendido en la escuela.

Mi más sincero agradecimiento a la Dra. Gloria Serrano, por la incentivación y motivación constante hacia la investigación. Infinitas gracias por todo el conocimiento adquirido en el transcurso de la elaboración del presente proyecto. Y a mis padres por dejarme la herencia más preciada, la "educación".

INDICE GENERAL DE CONTENIDOS

PÁGINAS PRELIMINARES

PortadaI
Aprobación por el tutorII
Autoría del trabajo de titulaciónIII
Aprobación del tribunal de gradoIV
Derechos de AutorV
AgradecimientoVI

TEXTO

CAPÍTULO I

EL PROBLEMA

1.1. Tema de la investigación4
1.2. Justificación4
1.3. Objetivos5
1.3.1. Objetivo general5
1.3.2. Objetivos específicos5

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes investigativos6
2.2. Hipótesis8
2.2.1 Resistencia a estrés por MP de las levaduras aisladas del volcán TNG8
2.2.2 Supervivencia celular de levaduras aisladas del volcán TNG después un tratamiento con MP8
2.2.3 Resistencia frente al estrés provocado por cada uno de los MP sometidos a estudio, de al menos una cepa de levadura aislada del volcán TNG9

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Materiales	10
3.2. Métodos	10
3.2.1. Cultivo de levaduras en medio sólido	10
3.2.2. Cultivo de levaduras en medio líquido	10
3.2.3. Tratamiento con metales pesados	11
3.2.4. Resistencia al estrés por metales pesados de las levaduras	11
3.2.4.1 Método de goteo en placa	11
3.2.5 Determinación de la viabilidad celular	12
3.3. Diseño experimental	12

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Análisis y discusión de los resultados	13
4.1.1. Análisis de la resistencia a estrés por metal pesado de levaduras aisladas del volcán TNG	13
4.1.2. Viabilidad celular de levaduras tras un tratamiento con metales pesados	27
4.2. Verificación de hipótesis	32
4.2.1. Resistencia a estrés por MP de las levaduras aisladas del volcán TNG	32
4.2.2. Supervivencia celular de levaduras aisladas del volcán TNG después un tratamiento con MP	33
4.2.3. Resistencia frente a todos los MP sometidos a estudio en al menos una cepa de levadura aislada del volcán TNG	34

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones36
5.2. Recomendaciones37

MATERIALES DE REFERENCIA

Referencias bibliográficas38
Anexos44

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I. Concentraciones de sales de los MP en estudio11
Tabla II. Frecuencias obtenidas del crecimiento de las levaduras aisladas del volcán TNG en presencia de diferentes MP32
Tabla III. Valor calculado para la prueba X ² y valor p32
Tabla IV. Análisis de varianza de la supervivencia de las especies de levaduras aisladas del volcán TNG frente a Zn33
Tabla V. Análisis de varianza de la supervivencia de las especies de levaduras aisladas del volcán TNG frente a Cu33
Tabla VI. Análisis de varianza de la supervivencia de las especies de levaduras aisladas del volcán TNG frente a Cd34
Tabla VII. Valor calculado para la prueba X ² y valor p para <i>Rhodotorula mucilaginosa</i>35
Tabla VIII. Valor calculado para la prueba X ² y valor p para <i>Metschnikowia pulcherrima</i>36

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Árbol filogenético obtenido mediante análisis “Neighbour-joining” del dominio D1/D2 del gen 26S RNA de las levaduras aisladas del volcán TNG3
Figura 2. Crecimiento de las cepas de levaduras aisladas del volcán TNG frente a estrés por diferentes MP (Zn, Cr, Pb, Ni, Cd y Cu)14
Figura 3. Crecimiento de las cepas de levaduras aisladas del volcán TNG frente a estrés por Zn17
Figura 4. Crecimiento de las cepas de levaduras aisladas del volcán TNG frente a estrés por Cu19
Figura 5. Crecimiento de las cepas de levaduras aisladas del volcán TNG frente a estrés por Pb21
Figura 6. Crecimiento de las cepas de levaduras aisladas del volcán TNG frente a estrés por Ni23
Figura 7. Crecimiento de las cepas de levaduras aisladas del volcán TNG frente a estrés por Cd24
Figura 8. Crecimiento de las cepas de levaduras aisladas del volcán TNG frente a estrés por Cu26
Figura 9. Capacidad de supervivencia de <i>Metschnikowia pulcherrima</i> , <i>Metschnikowia</i> sp. y <i>Candida sake</i> a la mayor concentración de Zn (10mM)28
Figura 10. Crecimiento de las cepas de levaduras aisladas del volcán TNG resistentes a estrés por Zn en un rango de 2 a 20 mM28
Figura 11. Capacidad de supervivencia de <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> y <i>Cryptococcus gastricus</i> a la mayor concentración de Cd (1mM)29
Figura 12. Capacidad de supervivencia de las 9 especies de levaduras aisladas del volcán TNG frente a altas concentraciones de Cu (2 mM)31
Figura 13. Crecimiento de las cepas de levaduras aisladas del volcán TNG resistentes a estrés por Cu en un rango de 0.2 a 2 mM31

RESUMEN EJECUTIVO

Los ecosistemas contaminados con altas concentraciones de metales pesados constituyen un factor determinante en la evolución de la fisiología celular de ciertas especies de microorganismos, ya que inducen la selección de mecanismos que les permitan su supervivencia y adaptación a las condiciones cambiantes del mismo, como lo es el volcán Tungurahua.

A partir del análisis de la resistencia frente a estrés por metales pesados de las 10 cepas de levaduras aisladas a partir de este ecosistema volcánico, se pudo obtener especies resistentes y viables después del tratamiento a concentraciones crecientes de metales pesados como Zn, Cr, Cd, Pb, Ni y Cu. *Metschnikowia pulcherrima* y *Rhodotorula mucilaginosa* fueron especies que mostraron gran capacidad de resistencia frente a estrés provocado por todos los metales pesados sometidos a estudio, pues crecieron en medios suplementados con 2mM de Zn, Pb, Ni y Cr, y 0.2mM de Cd, y Cu, respectivamente. Frente a un estrés provocado por una concentración de 2mM de Cu, se encontraron 9 especies de levaduras altamente resistentes y con una gran viabilidad celular, siendo este el metal más tolerado por la biota del volcán Tungurahua. A pesar de la alta toxicidad del Cd, se obtuvo dos cepas de levaduras; *Rhodotorula mucilaginosa* y *Cryptococcus gastricus*, que presentaron resistencia a una cantidad significativa de 1mM de este metal pesado. También se encontraron tres cepas resistentes a concentraciones altas de 10mM de Zn; *Metschnikowia pulcherrima*, *Metschnikowia sp* y *Candida sake*.

Con los resultados obtenidos se exhiben cepas de levaduras, aisladas de una fuente de contaminación ambiental natural, con potencialidad en cuanto a la resistencia frente a estrés por metales pesados constituyéndose especies aptas para ser aplicadas en procesos de biorremediación de ecosistemas contaminados con metales pesados como Cu, Zn y Cd.

Palabras claves: Resistencia, metales pesados, volcán Tungurahua, levaduras.

ABSTRACT

Contaminated with high concentrations of heavy metals ecosystems are a determining factor in the evolution of cell physiology of certain species of microorganisms, as they induce selection mechanisms that allow them to survive and adapt to changing conditions thereof, as it is the Tungurahua volcano.

From the analysis of resistance to heavy metal stress of 10 strains of yeasts isolated from this volcanic ecosystem, could be obtained robust and viable species after treatment with increasing concentrations of heavy metals such as Zn, Cr, Cd, Pb, Ni and Cu. *Metschnikowia* and *Rhodotorula pulcherrima* were mucilaginous species showed great resilience to stress caused by all heavy metals under study, as they grew in media supplemented with; 2mM Zn, Pb, Ni and Cr, Cd and 0.2mM, and Cu, respectively. Against stress caused by a concentration of 2 mM Cu, 9 species of highly resistant yeasts and great cell viability was found, which is the metal most tolerated by the biota of the Tungurahua volcano. Despite the high toxicity of Cd, two strains of yeast was obtained; *Rhodotorula mucilaginosa* and *Cryptococcus gastricus* that were resistant to a significant amount of this metal 1mM. Three resistant to high concentrations of 10mM Zn strains were also found; *Metschnikowia pulcherrima*, *Metschnikowia sp* and *Candida sake*.

With the results obtained yeast strains isolated from a natural source of environmental pollution, with the potential to tell the resistance to heavy metal stress becoming species suitable for application in bioremediation of polluted ecosystems with heavy metals such as Cu are displayed , Zn and Cd.

Keywords: Resistance, heavy metals, Tungurahua volcano, yeasts.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad, la problemática de contaminación ambiental por Metales Pesados (MP) se ha incrementado paralelamente al desarrollo industrial y tecnológico a nivel mundial (**Borchardt et al., 2004; Vullo, 2003**). Sin embargo, la causa de esta problemática no solo radica en las actividades antropogénicas, sino también se debe a la presencia de fuentes naturales, como erupciones volcánicas, minerales primarios, minerales secundarios, rocas sedimentarias, granito, basalto, entre otras, que están liberando continuamente MP en el entorno (**Brown et al., 1999; Bautista, 1999**).

El volcán TuNGurahua (TNG) en el Ecuador, se constituye un foco natural de este tipo de contaminación por MP, debido a la actual emisión de ceniza generada por sus erupciones volcánicas (**Narváez & Cano, 2014**). La ceniza volcánica está formada por fragmentos muy finos de vidrio molido y un gran contenido de MP como Manganeseo (Mn), Cobre (Cu), Zinc (Zn) o Plomo (Pb) y, en menor medida Cadmio (Cd), Cromo (Cr) y Mercurio (Hg), lo que la hace tóxica para cualquier organismo vivo (**Narváez & Cano, 2014; Hepp, 2008**).

El impacto de los contaminantes sobre los seres humanos y otros organismos depende de sus niveles de concentración, toxicidad y biodisponibilidad de los mismos (**Brown et al., 1999**). Los MP, ya sean esenciales o no, llegan a ser tóxicos, cuando su aporte es excesivo (**Navarro et al, 2007; TULAS-Libro VI, 2010**). Esto se debe principalmente a que no son biodegradables y tienden a biomagnificarse fácilmente en la cadena trófica, acumulándose en los organismos vivos que se encuentren en contacto con estos y afectando así negativamente el crecimiento y reproducción de los mismos, pudiéndoles causar incluso la muerte (**Cargua, 2010; Binbin et al., 2014**). Los MP en los organismos vivos ocasionan problemas de toxicidad (capacidad intrínseca de causar daño, incluyendo los efectos potencialmente carcinogénicos, mutagénicos y teratogénicos) a nivel celular, por la afinidad que tienen por el azufre presente en las proteínas, evitando la función enzimática, precipitación de fosfatos y formando enlaces con ellas a través de

sus grupos con azufre (**Manahan, 2007**). Del mismo modo, los iones metálicos se unen a las membranas celulares, impidiendo los procesos de transporte a través de la pared celular. Asimismo, el reemplazo de otros cationes esenciales en la estructura de las biomoléculas (**Bautista, 1999 & Manahan, 2007**).

Los ecosistemas contaminados con altas concentraciones de sustancias tóxicas constituyen un factor determinante en la evolución de la fisiología celular de ciertas especies de microorganismos, ya que inducen la selección de mecanismos que les permitan su supervivencia y adaptación a las condiciones cambiantes del mismo. (**Brown et al., 1999, Vullo, 2003; Volesky, 2001; Massaccesi et al., 2002**).

Existen métodos químicos para la descontaminación de ambientes contaminados con MP, pero resultan ser muy costosos y de baja especificidad, debido a que se requieren ciertas condiciones ambientales para que el proceso obtenga su máxima eficiencia. Una alternativa viable es la biorremediación que se basa en el uso de microorganismos en procesos de degradación química o biológica para eliminar sustancias contaminantes tóxicas, que puedan comprometer seriamente el uso de recursos naturales (**Esam & Mohamed, 2007; Vullo, 2003**).

Las levaduras que habitan ambientes ácidos contaminados con elementos metálicos disueltos en concentraciones elevadas, están adaptadas a este entorno gracias a sus características metabólicas y presentan una elevada tolerancia a distintos metales pesados, ya que desempeñan un papel importante en la oxidación y la reducción de los mismos, por lo cual son buenos candidatos para utilizarse en procesos de biorremediación (**Vullo, 2003; CONICET, 2013**). Las interacciones entre microorganismos y metales son fundamentales a través de métodos de bioadsorción, remoción, recuperación o detoxificación de MP. (**CONICET, 2013; Verghese, 2012**).

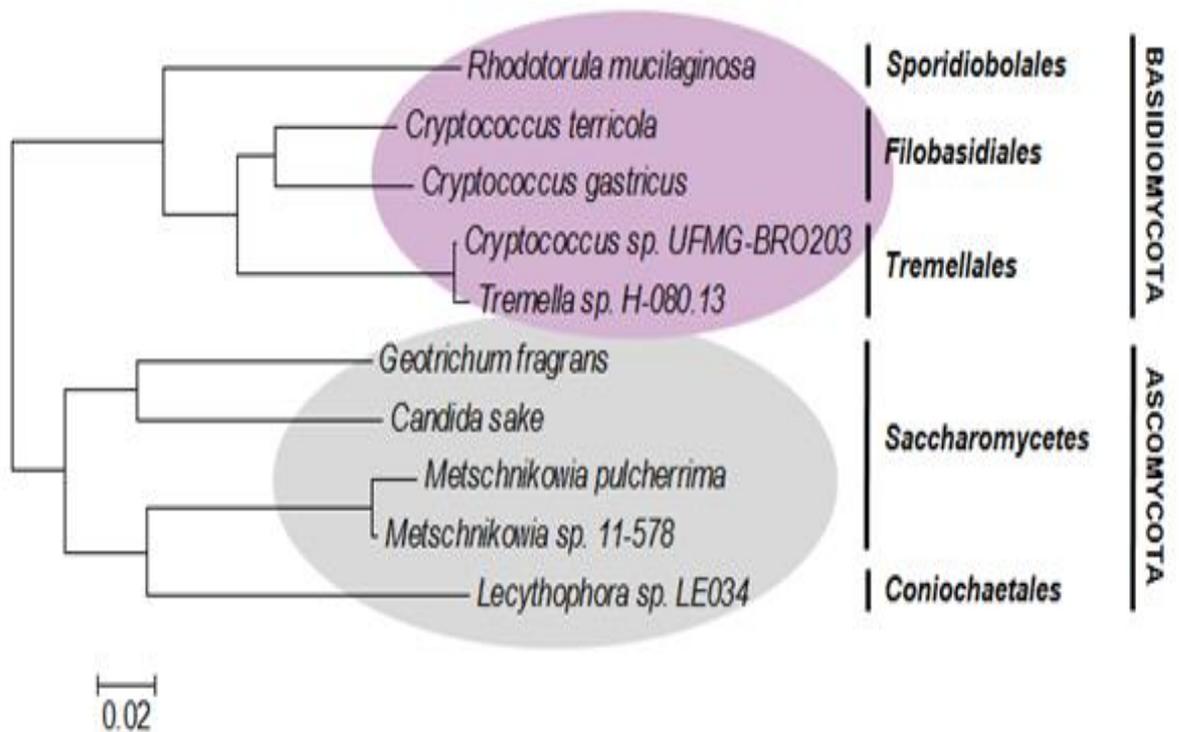


Figura 1. Árbol filogenético obtenido mediante análisis “Neighbour-joining” del dominio D1/D2 del gen 26S RNA de las levaduras aisladas del volcán TNG. Las secuencias de las especies aisladas del volcán TNG aparecen destacadas con un punto negro (•). Los grupos sombreados corresponden a diferentes subórdenes (Hidalgo, 2015).

La necesidad de nuevas alternativas eficientes, limpias y de bajo costo que permitan reducir los altos niveles de contaminación por MP, sin provocar impactos secundarios hacia al ambiente, conlleva a la investigación de especies nuevas, autóctonas y resistentes a estos elementos contaminantes, que permitan producir nuevas tecnologías de biorremediación de ambientes contaminados por metales pesados. Mediante una investigación previa, relacionada con el aislamiento e identificación de microorganismos nativos de medios ambientes extremos como el volcán TNG, se ha obtenido una colección de cepas de levaduras ecuatorianas (Figura 1), las mismas que serán utilizadas para el presente trabajo, que tiene como objetivo el análisis de la resistencia de cada una de las especies aisladas frente al estrés provocado por diferentes metales pesados, con el fin de proponer alternativas limpias frente a este tipo de contaminación.

CAPÍTULO I

EL PROBLEMA

1.1. Tema de la investigación

Análisis de la resistencia a estrés por metales pesados de levaduras aisladas del volcán Tungurahua, Ecuador

1.2. Justificación

A nivel mundial, surge la problemática de la contaminación ambiental por la presencia de altas concentraciones de MP. El Ecuador, a pesar de ser un país pequeño y poco industrializado, no está excluido de esta problemática ambiental; debido a que las industrias existentes, no realizan una adecuada disposición de sus desechos inorgánicos que contienen MP y son liberados directamente a los diferentes ecosistemas. Además, se cuenta con la presencia de varios volcanes, como TuNGurahua (TNG), cuyas emisiones volcánicas expulsan al ambiente importantes cantidades de los metales pesados más tóxicos para los seres vivos, como son el Cobre (Cu), Zinc (Zn), Plomo (Pb), Cadmio (Cd), Cromo (Cr) y Niquel (Ni).

En la actualidad, los focos contaminantes han sido usados como nichos para la búsqueda de nuevas alternativas de biorremediación de ecosistemas contaminados, debido a que existen ciertos microorganismos, entre ellos las levaduras, capaces de adaptarse a condiciones ambientales extremas, incluyendo altas concentraciones de MP.

El estudio de la resistencia al estrés metálico de las levaduras que han sido previamente aisladas de uno de los ecosistemas más contaminados por metales pesados en el Ecuador: volcán TNG, es de gran importancia, ya que permitirá determinar las especies más aptas, de origen autóctono, para ser aplicadas en procesos de biorremediación.

1.3. Objetivos

1.1.1. Objetivo general

Determinar la resistencia que presentan las levaduras aisladas del volcán TNG, frente al estrés por MP.

1.1.2. Objetivos específicos

1. Evaluar la tolerancia a estrés por Cadmio (Cd) de levaduras aisladas del Volcán TNG
2. Evaluar la tolerancia a estrés por Cromo (Cr) de levaduras aisladas del Volcán TNG
3. Evaluar la tolerancia a estrés por Níquel (Ni) de levaduras aisladas del Volcán TNG
4. Evaluar la tolerancia a estrés por Plomo (Pb) de levaduras aisladas del Volcán TNG
5. Evaluar la tolerancia a estrés por Zinc (Zn) de levaduras aisladas del Volcán TNG
6. Evaluar la tolerancia a estrés por Cobre (Cu) de levaduras aisladas del Volcán TNG
7. Identificar las especies que presenten una mejor respuesta frente al estrés por MP.

CAPÍTULO II MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes investigativos

Los MP en altas concentraciones son tóxicos debido a su poca biodegradabilidad y alta bioacumulación en los seres vivos. El riesgo del consumo de plantas y animales contaminados por MP puede ocasionar serios problemas en la salud humana, que en algunos casos puede ser irreversible. En el siguiente cuadro se muestra los principales problemas de salud que se producen a causa de MP (Manahan, 2007).

Cuadro 1. Efectos de los metales pesados sobre la salud humana.

METALES	RIESGO SOBRE LA SALUD HUMANA
Plomo	Anemia e Hipertensión. Tóxico para los riñones (causa lesiones y cáncer al riñón). Reducción del periodo de gestación. Problemas de desarrollo intelectual y del oído niño. Afecta el sistema nervioso central (saturnismo).
Cromo	Cáncer. Infecciones de sangre. Leucemia
Cadmio	Afecta al riñón. Hipertensión. Afecciones de tipo vascular. Cáncer de próstata. Infertilidad. Bronquitis
Níquel	Causa la pérdida de peso corporal. Daño del corazón y del hígado. Irritación de piel.
Zinc	Infección de las mucosas. Envenenamiento por vitriolo (Sulfato de zinc). Afecta al sistema inmunológico y enzimático de los niños.
Cobre	Causa anemia. Daño del hígado y del riñón. Irritación del estómago e intestino.

Fuente: Manahan, 2007

Existen ciertas especies de levaduras consideradas como microorganismos extremófilos, debido a la capacidad que presentan para sobrevivir a condiciones ambientales extremas de temperatura, alta salinidad, alta alcalinidad (pH superior a 8), alta acidez (pH menor de 4) y altas concentraciones de sustancias tóxicas como MP (Park *et al.*, 2010; Vullo, 2003; Volesky, 2001; Massaccesi *et al.*, 2002). La biodiversidad de levaduras aisladas a partir de ecosistemas ácidos, debido a la presencia de MP, demuestra que este tipo de microorganismos presenta un elevado potencial de supervivencia frente a medios contaminados con estos elementos tóxicos (Aguilera, 2013; Hidalgo, 2015).

Se ha demostrado que la biomasa de ciertas levaduras tiene un gran capacidad de bio-extracción de MP del medio, ya que sus células son capaces de adquirir, utilizar y almacenar estas sustancias tóxicas de manera eficaz por medio de mecanismos homeostáticos sofisticados para regular sus niveles y evitar la toxicidad (**Ali & Hashem, 2007; Cyert, 2013**). Según **Ruotolo et al., (2008)**, específicamente las levaduras, presentan una serie de vías metabólicas en las que se utilizan iones metálicos como co-factores para la activación de ciertas enzimas, formación de bases, de aminoácidos, proteínas, entre otros. Además se ha encontrado que existe una estrecha relación entre la tolerancia a los MP y la funcionalidad de la vacuola, debido al papel desempeñado por este orgánulo en el secuestro de metal dentro de la célula y la liquidación de las macromoléculas dañadas por el metal (**Sun, 2014; Cyert, 2013**).

Algunas de las especies de levaduras en las que se ha encontrado resistencia a estrés por MP como Zn, Pb y Cd, aisladas de fuentes de contaminación directa, son por ejemplo *Saccharomyces cerevisiae*, *Cryptococcus neoformans*, *Rhodotorula mucilaginosa* (**Vullo, 2003; Navarro, et al., 2007; Sala et al., 2010; Salvadori et al., 2014**). Una cepa de *Rhodotorula mucilaginosa*, aislada de una fuente de contaminación directa, como el agua residual de la minería del Cu, presenta un alto grado de tolerancia al estrés generado por este metal, mediante el desarrollo de varios mecanismos para mantener un equilibrio entre las concentraciones de metales intracelulares y la toxicidad contra el Cu presente en el medio (**Salvadori et al., 2014; Ollivier, 2011**). Una cepa de *Candida* sp, aislada del agua residual de una planta de curtido de cuero, presenta resistencia a uno de los MP más tóxicos Cr, creciendo a una concentración de 2 mM. El mecanismo de acción es la reducción de Cr (VI) a Cr (III), el cual es acumulado en la maquinaria celular (**Baldi et al., 1990**).

Como se menciona anteriormente, las levaduras aisladas de ecosistemas extremos presentan un gran potencial de resistencia a estrés por elementos altamente tóxicos. Este hecho, unido al carácter extremo del volcán TNG respecto al alto contenido de MP, hace interesante el realizar un análisis

de la resistencia a estrés por MP de las levaduras aisladas del volcán TNG, Ecuador, proporcionando así, una colección de levaduras autóctonas del Ecuador con gran potencial para ser aplicadas en procesos de biorremediación.

2.2 Hipótesis

2.2.1 Resistencia a estrés por MP de las levaduras aisladas del volcán TNG.

Hipótesis nula

Las levaduras aisladas del volcán TNG no presentan resistencia frente a estrés por MP.

Hipótesis alternativa

Las levaduras del volcán TNG si presentan resistencia hacia el estrés por MP

2.2.2 Supervivencia celular de levaduras aisladas del volcán TNG después un tratamiento con MP.

Hipótesis nula

Las levaduras aisladas del volcán TNG no sobreviven después de un tratamiento con MP.

Hipótesis alternativa

Las levaduras aisladas del volcán TNG sobreviven después de un tratamiento con MP.

2.2.3 Resistencia frente al estrés provocado por cada uno de los MP sometidos a estudio, de al menos una cepa de levadura aislada del volcán TNG.

Hipótesis nula

No existe ninguna cepa de levadura, aislada del volcán TNG, resistente al estrés provocado por cada uno de los MP sometidos a estudio.

Hipótesis alternativa

Existe por lo menos una cepa de levadura, aislada del volcán TNG, resistente al estrés provocado por cada uno de los MP sometidos a estudio.

2.3. Señalamiento de variables de la hipótesis

2.3.1 Evaluación de la resistencia frente a estrés por metales pesados de levaduras aisladas del volcán TNG.

- Desarrollo de levaduras en medio de cultivo sólido.
- Desarrollo de levaduras en medio de cultivo líquido.
- Valoración por espectrofotometría según las estimaciones mediante O.D. 600.
- Desarrollo de levaduras aplicando el método de goteo en placa en presencia de concentraciones crecientes de MP.
- Evaluación del crecimiento de levaduras en presencia de MP.

2.3.2 Análisis de la supervivencia de levaduras aislada del volcán TNG tras el tratamiento con metales pesados

- Desarrollo de levaduras en medio de cultivo sólido.
- Desarrollo de levaduras en medio de cultivo líquido.
- Desarrollo de levaduras en medio de cultivo líquido suplementado con MP.
- Cultivo de 300 células de levaduras en medio de cultivo sólido con previa evaluación por espectrofotometría según las estimaciones mediante O.D. 600.
- Valoración de la viabilidad celular de levaduras.

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Materiales

PDA (agar papa dextrosa), (Difco™, Francia), caldo YM (yeast and moulds); cloruro crómico hexahidratado ($\text{CrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), (BDH Chemicals, Inglaterra); sulfato de zinc heptahidratado ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), (Baker Analyzed®, USA); acetato de plomo trihidratado (CH_3COO)₂Pb.3H₂O, (Baker Analyzed®, USA); nitrato de cadmio tetrahidratado ($\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), (Merck, Alemania); cloruro de níquel hexahidratado ($\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), (May & Baker, Inglaterra).

3.2. Métodos

3.2.1 Cultivo de levaduras en medio sólido

Las levaduras previamente aisladas del volcán TNG, se sembraron en medio de cultivo sólido PDA (extracto de papa 4,0 g, glucosa 20,0 g, agar 15,0 g, agua destilada 1000 mL), mediante la realización de estrías compuestas en cajas Petri, en una incubadora (Mettler, Alemania) a una temperatura constante de 20°C (± 2 °C), por un tiempo de 48 horas.

3.2.2 Cultivo de levaduras en medio líquido

Se sembraron las levaduras en medio de cultivo líquido YM (glucosa 10g, peptona 5g, maltosa 3g, extracto de levadura 3g, agua destilada 1000 mL) trasladando con un asa un inóculo de biomasa desde las placas de medio sólido, a tubos de ensayo con 3 ml de medio, se mezcló con cuidado hasta observar turbidez. Se dejó crecer a 20°C, por 24 horas y con agitación constante de 150 rpm en una incubadora shaker (New Brunswick, USA).

3.2.3 Tratamiento con metales pesados

Los medios de cultivo, tanto sólidos como líquidos, fueron suplementados con sales metálicas, a concentraciones, entre 0.2 y 20 mM, de los diferentes MP sometidos a estudio: Cd, Cr, Ni, Pb, Cu y Zn, como se describe a continuación:

Tabla I. Concentraciones de sales de los MP en estudio

Metal pesado	Sal metálica	Concentración (mM)		
Cd	Cd(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	0.2	1	2
Cr	CrCl ₃ .6H ₂ O	2	10	20
Ni	NiCl ₂ .6H ₂ O	2	10	20
Pb	(CH ₃ COO) ₂ Pb.3H ₂ O	2	10	20
Zn	ZnSO ₄ .7H ₂ O	2	10	20
Cu	CuSO ₄ .5H ₂ O	0.2	1	2

3.2.4 Resistencia al estrés por metales pesados de las levaduras

3.2.4.1 Método de goteo en placa

Para evaluar el impacto que la concentración metálica tiene sobre el crecimiento de levaduras aisladas previamente del volcán TNG, se empleó el método de goteo en placa (**Serrano-Bueno et al., 2013**). Inicialmente se sembraron las levaduras en medio de cultivo líquido YM a 150 r.p.m. durante 24 horas a una temperatura ambiente (pre inóculo). A continuación, de cada pre inóculo se realizaron diluciones seriadas en agua estéril a 10, 10⁻², 10⁻³ y 10⁻⁴ células/ml, correspondientes a una Abs₆₀₀ de 0.4, 0.04, 0.004 y 0.0004 respectivamente. Posteriormente, se sembraron 2,5 µl de cada una de ellas sobre placas con medio de cultivo PDA suplementado con sales metálicas de Cd, Cr, Ni, Pb, Cu y Zn. Como control se utilizó medio PDA sin adición de MP. Las placas sembradas se incubaron a 20°C y pH 7, por 48 horas.

Se determinaron las levaduras resistentes a cierta concentración de MP en este primer ensayo preliminar, las cuales fueron sometidas al mismo experimento pero a concentraciones crecientes del MP, con el mismo protocolo mencionado en el apartado anterior.

3.2.5 Determinación de la viabilidad celular

La supervivencia celular se evaluó como la capacidad para formar colonias a partir de células individuales (unidades formadoras de colonias, UFCs) después de un tratamiento con Cu, Zn, Cr, Pb, Ni y Cd en función del tiempo (**Serrano-Bueno et al., 2013**). Primero, se realizó un pre inóculo de células de levadura, en medio YM y se dejó crecer en una incubadora shaker a 150 r.p.m. durante 24 horas a 20 °C (± 2 °C), para la obtención de células jóvenes. Se realizó un segundo inóculo con las células sembradas anteriormente en un medio suplementado con la sal metálica a la máxima concentración; Cu 2mM, Zn 10 mM y Cd 1 mM, y se dejó crecer por 24 horas a las mismas condiciones mencionadas anteriormente. Obteniendo el inóculo sometido a estrés metálico por 24 horas, se procedió a sembrar 300 células tomadas de medio líquido suplementado con metal pesado a diferentes concentraciones, según las estimaciones mediante O.D.₆₀₀, en placas con medio sólido PDA, las mismas que fueron incubadas a 20 °C por un período de 48 horas. Se usó como control un inóculo que no fue sometido a estrés metálico. La supervivencia se calculó como el porcentaje de colonias formadas a partir del número de células inoculadas inicialmente.

3.3 Estadística

Todos los experimentos planteados en este proyecto de trabajo de titulación se realizarán por triplicado. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba no paramétrica Chi-cuadrado (X^2) con $p \leq 0,05$, la prueba t y análisis de varianza tabla ANOVA.

CAPÍTULO IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Análisis y discusión de los resultados

4.1.1. Análisis de la resistencia a estrés por metal pesado de levaduras aisladas del volcán TNG

4.1.1.1. Ensayo preliminar de crecimiento de levaduras en presencia de metales pesados.

Con el objetivo de identificar las cepas de levaduras resistentes a estrés por MP, aisladas previamente del volcán TNG, se realizó un ensayo preliminar de goteo en placa a concentraciones iniciales de 0.2 mM para Cd y Cu y 2mM para Zn, Cr, Pb y Ni (Figura 2).

Mediante los resultados obtenidos en el primer ensayo realizado de goteo en placa, en el cual se sometieron a todas las levaduras aisladas del volcán TNG, a un medio suplementado con una concentración de 0.2 mM de Cd y Cu y 2mM de Zn, Cr, Pb y Ni respectivamente, se pudo evidenciar la resistencia que presenta cada especie hacia el estrés metálico, lo cual se ve reflejado por el crecimiento positivo frente a los metales adicionados en el medio. Como se observa en la figura 2, la mayoría de las especies presentan resistencia hacia al menos un MP. Por el hecho de que fueron microorganismos aislados de una fuente natural de contaminación por MP, como lo es el volcán TNG, dada sus emisiones de ceniza volcánica, se demuestra que los focos contaminantes si constituyen nichos para la evolución de especies capaces de adaptarse a condiciones ambientales extremas, incluyendo altas concentraciones de MP (**Vullo, 2003; Volesky, 2001; Massaccesi et al., 2002**).

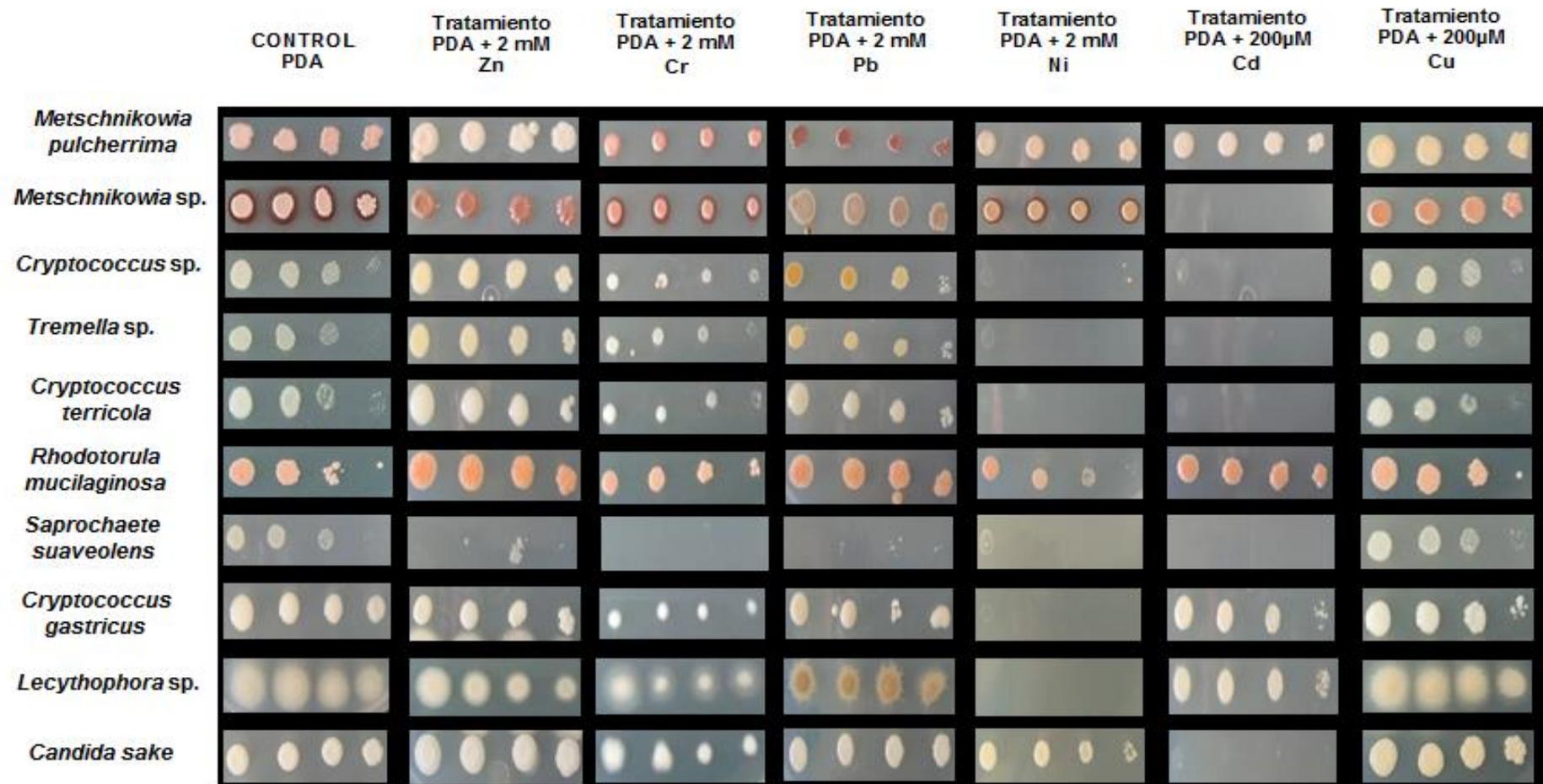


Figura 2. Crecimiento de las cepas de levaduras aisladas del volcán TNG frente a estrés por diferentes MP (Zn, Cr, Pb, Ni, Cd y Cu). Se realizaron diluciones seriadas de cada cultivo, de las cuales se sembraron alícuotas de 2,5 µl (10^4 , 10^3 , 10^2 y 10 células) en medio PDA (control) y en medio PDA suplementado con las distintas concentraciones de MP. Las fotografías se tomaron después de 72 horas de incubación a 20°C.

En relación al MP que se suplementó al medio, se obtuvo que el Cu fue el elemento metálico más tolerado con un 100% de cepas de levaduras del volcán TNG resistentes a este metal, seguido por Zn, Pb y Cr con un 90% de levaduras resistentes. Por el contrario, en el caso de Cd y Ni, solo se observó un 40 % resistencia por parte de las levaduras, siendo estos dos los MP menos tolerados. Esto puede deberse a que la ceniza volcánica tiene un gran contenido Cu, Zn y Pb, por ende las especies autóctonas de esta fuente, van a desarrollar mecanismo de supervivencia mayoritariamente hacia estos elementos metálicos **(Narváez & Cano, 2014; Ruotolo et al., 2008)**.

En cuanto a las cepas de levadura sometidas a análisis, se determinó que dos especies presentan resistencia frente a todos los MP sometidos a estudio: *Rhodotorula mucilaginosa*, de la cual se han descrito mecanismos que incluye secuestro de MP por metalotioneínas través de su alto contenido de cisteína y la adsorción de cationes metálicos por las paredes celulares **(Salvadori et al., 2014; Ollivier et al., 2011)**, y *Metschnikowia pulcherrima*, de la cual también se han reportado diferentes trabajos en lo que se demuestra un alto grado de resistencia frente a Cd, Ni, Pb y Zn **(Vadkertiova y Slavikova, 2006)**. Se han realizado estudios acerca de la resistencia frente a estrés por MP de estas dos especies, oriundas de fuentes de contaminación con origen antropogénico, sin embargo, no existe información acerca de la tolerancia frente a MP de cepas pertenecientes a estas dos especies aisladas de nichos naturales, es por esto, que se asume el presente trabajo como el primer estudio que relaciona la tolerancia a estrés metálico de cepas de *Rhodotorula mucilaginosa* y *Metschnikowia pulcherrima* aisladas de un ecosistema natural.

Metschnikowia sp y *Candida sake* presentan una resistencia similar en cuanto al tipo de estrés metálico al que fueron sometidas de Zn, Cr, Pb, Ni, y Cu. Estudios han demostrado que el género de *Metschnikowia* presenta tolerancia a Cd e inhibición ante Cu y Cr **(Vadkertiova y Slavikova, 2006)**. Lo cual resulta controversial con los resultados obtenidos con la cepa de *Metschnikowia* sp de origen volcánico, y en base a que la ceniza volcánica

está conformada mayoritariamente por Cu, Zn y Pb (**Narváez & Cano, 2014**), se demostró la influencia que las características del medio de origen tienen sobre la resistencia que presenta cada especie frente al estrés metálico.

4.1.1.2. Crecimiento de levaduras en presencia de concentraciones crecientes de metales pesados

Las cepas de levaduras resistentes a la concentración preliminar de MP fueron sometidas a un segundo ensayo de goteo en placa a concentraciones crecientes de Zn, Cr, Pb, Ni, Cd y Cu. Se tomó como control negativo levaduras no resistentes al metal en análisis.

4.1.1.2.1 Crecimiento de levaduras en presencia de concentraciones crecientes de Zn

El Zn se encuentra de manera natural formando parte de algunos minerales como la blenda, la marmatita o esfalerita de Zn, en forma de sulfuro de zinc (**Cargua, 2010**). También se encuentran en los ecosistemas volcánicos, como constituyente significativo de las cenizas volcánicas (**Calabrese & D'Alessandro, 2015; Narváez & Cano, 2014**). A pesar de ser un MP poco común en la naturaleza, sus concentraciones están aumentando por causas de las actividades antropogénicas, como la adición durante actividades industriales mineras, la combustión de carbón y residuos, el procesado de acero o el galvanizado (**Brown et al., 1999**). A concentraciones elevadas, este elemento se vuelve tóxico afectando a la mayoría de los seres vivos, ya que tiende a bioacumularse afectando la fisiología celular (**TULAS, Libro VI, 2010**).

En general, la biomasa fúngica, aislada de aguas residuales galvánicas, presentan tolerancia frente a estrés provocado por Zn, destacando ciertas levaduras del género *Candida*, las cuales presentan una gran capacidad de resistir altas concentraciones de este elemento metálico (**Brady et al., 2008**).

Debido a que el 90% de las levaduras del volcán TNG presentaron resistencia frente a una concentración de 2mM de Zn, siendo la excepción únicamente *Saprochaete suaveolens*, se procedió a realizar un segundo ensayo a concentraciones crecientes de este metal (10 y 20mM) y a las mismas condiciones (Figura 3). Los resultados obtenidos exponen la resistencia de tres cepas de levadura hacia una concentración de 10mM de Zn en el medio *Metschnikowia pulcherrima*, *Metschnikowia* sp y *Candida sake*. La capacidad de resistencia del género *Candida* hacia este MP, se debe a que a partir de una concentración 2 mM de Zn en el medio, las células comienzan a almacenar la sustancia tóxica en el interior de la vacuóla, para mantener la homeostásis del medio celular con respecto al estrés provocado por este MP (Böttcher *et al.*, 2015; Taff *et al.*, 2013). En el caso de los resultados obtenidos con el género *Metschnikowia*, concordaron con ensayos realizados por Vadkertiova y Slavikova en 2006, por lo que se pudo verificar la resistencia de estas especies frente a estrés por Zn a una concentración de 10mM. Además al utilizar *Saprochaete suaveolens*, como control negativo, se pudo verificar la inhibición de crecimiento de esta cepa por acción de la sal de zinc.

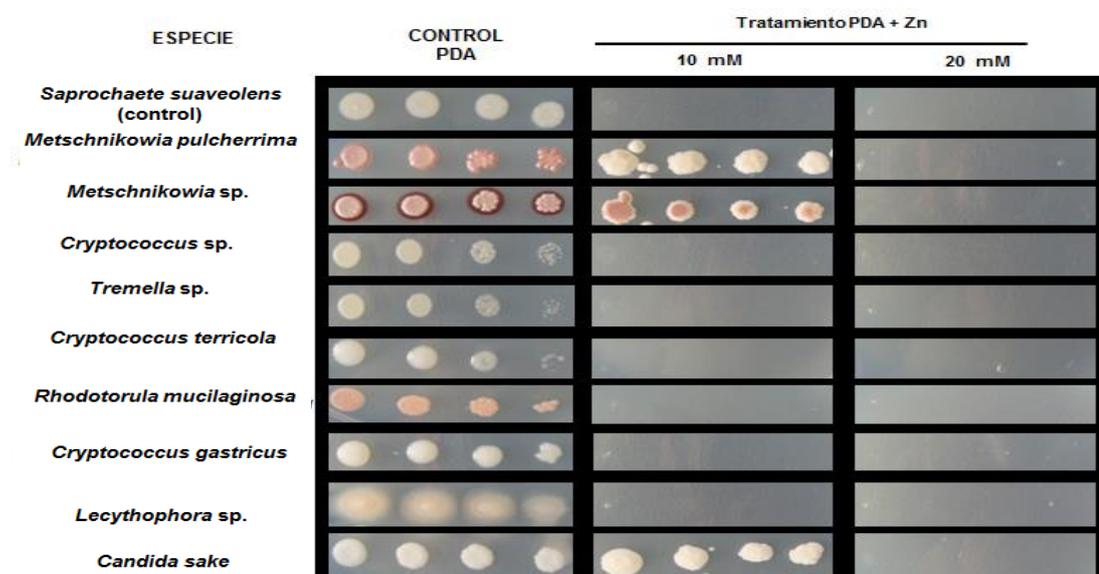


Figura 3. Crecimiento de las cepas de levaduras aisladas del volcán TNG frente a estrés por Zn. Se realizaron diluciones seriadas de cada cultivo, de las cuales se sembraron alícuotas de 2,5 μ l (10^4 , 10^3 , 10^2 y 10 células) en medio PDA (control) y en medio PDA suplementado con las distintas concentraciones de MP. Las fotografías se tomaron después de 72 horas de incubación a 20°C.

4.1.1.2.2 Crecimiento de levaduras en presencia de concentraciones crecientes de Cr

El Cr es uno de los MP más tóxicos, que a concentraciones elevadas causan importantes daños a la salud humana. Las fuentes de contaminación para este elemento son las industrias de cemento, colorantes, construcción, curtidurías, metalurgia, pinturas (anticorrosivas) y material fotográfico (**Cargua, 2010**). También se encuentra en la composición química de las cenizas volcánicas (**Calabrese y D'Alessandro, 2015; Narváez & Cano, 2014**).

Una cepa de *Candida* sp, aislada del agua residual de una planta de curtido de cuero, presenta resistencia a uno de los MP más tóxicos Cr, creciendo a una concentración de 2 mM. El mecanismo de acción es la reducción de Cr (VI) a Cr (III), el cual es acumulado en la maquinaria celular (**Baldi et al., 1990**). Levaduras como *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Yarrowia lipolytica* son incapaces de tolerar Cr (**Cervantes, 2001**).

Las especies de levaduras que presentaron resistencia frente a Cr (III) a una concentración de 2mM en el primer ensayo, fueron sometidas a un segundo ensayo de goteo en placa a concentraciones crecientes de este metal, 10 y 20mM. Se incluyó a *Saprochaete suaveolens* como control negativo debido a que no presentó resistencia en el primer ensayo (Figura 4). A partir de los resultados obtenidos se pudo observar que las levaduras del volcán TNG *Metschnikowia pulcherrima*, *Metschnikowia* sp., *Cryptococcus* sp, *Tremella* sp., *Tremella* sp., *Cryptococcus terricola*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Saprochaete suaveolens*, *Cryptococcus gastricus*, *Lecythophora* sp. y *Candida sake* no presentaron crecimiento en este segundo ensayo, por lo que se estableció que no son resistentes a concentraciones altas de Cr.

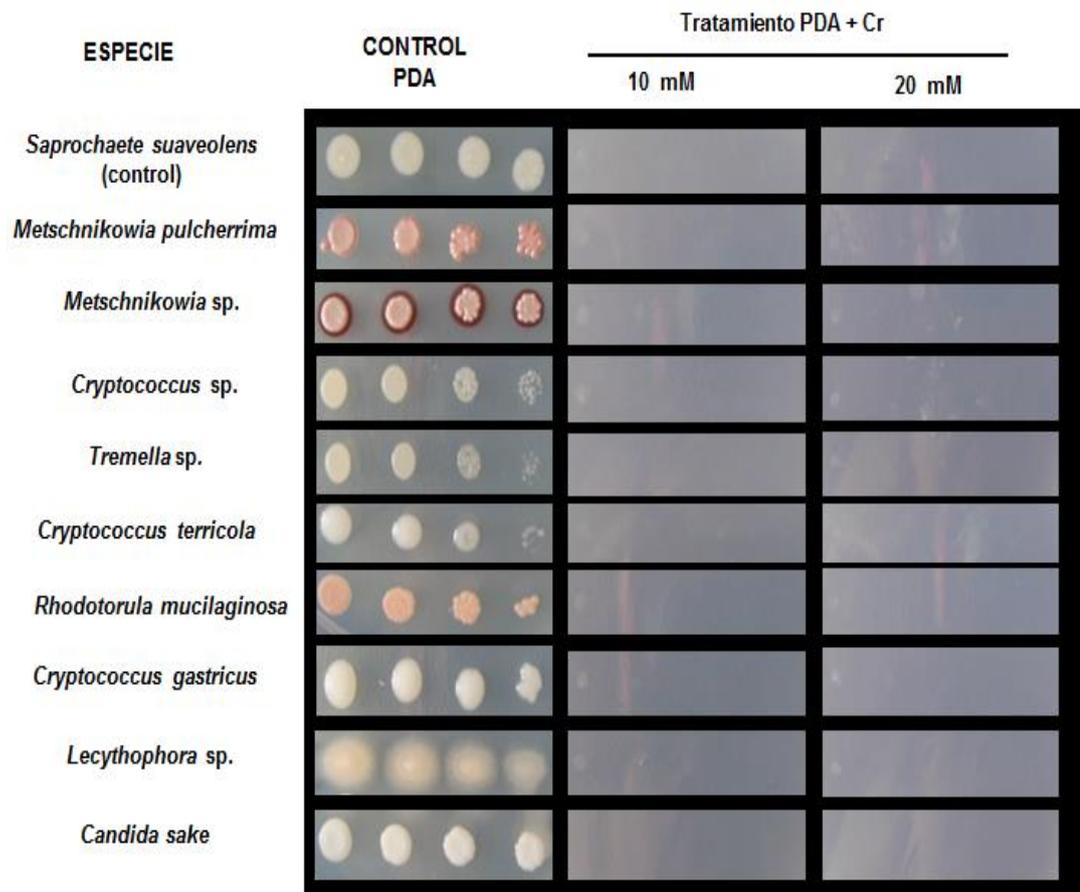


Figura 4. Crecimiento de las cepas de levaduras aisladas del volcán TNG frente a estrés por Cr. Se realizaron diluciones seriadas de cada cultivo, de las cuales se sembraron alícuotas de 2,5 μ l (10^4 , 10^3 , 10^2 y 10 células) en medio PDA (control) y en medio PDA suplementado con las distintas concentraciones de MP. Las fotografías se tomaron después de 72 horas de incubación a 20°C.

4.1.1.2.3 Crecimiento de levaduras en presencia de concentraciones crecientes de Pb

El Pb es un MP que no se encuentra en su estado elemental muy fácilmente. Normalmente, se encuentra formando minerales como: la galeana, cerusita y anglesita **(Cargua, 2010)**. También se encuentra Pb, en forma de sulfuros y sulfatos, en ecosistemas volcánicos tanto en la ceniza la volcánica como en los suelos subyacentes **(Hepp, 2008; Narváez, O. 2004)**. Las fuentes de origen antropogénico para el ingreso de Pb al ambiente son la combustión del petróleo, procesos industriales, combustión de residuos sólidos, instalaciones domésticas y en aleaciones metálicas, o químicas como tuberías, fabricación de pinturas, masillas y pesticidas **(Bautista, 1999)**.

En estudios realizados anteriormente, se ha encontrado resistencia a estrés provocado por Pb, en cepas de *Saccaromyces cerevisiae*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, *Candida robusta*, *Candida utilis*, *Candida laurentii*, *Pichia farinosa*, *Cryptococcus albidus* y *Candida neoformans*, aisladas de fuentes de contaminación antropogénica **(Vullo, 2003; Navarro et al., 2007; Sala et al., 2010, Salvadori et al., 2014)**.

Las nueve cepas de levaduras del volcán TNG que presentaron resistencia a una concentración de 2mM de Pb, fueron sometidas a un segundo ensayo de goteo en placa a concentraciones crecientes (10 y 20mM) (Figura 5). La resistencia que presentaron todas las especies frente a estas concentraciones, fue nula, ya que no se observó crecimiento microbiano en ninguno de los casos. La capacidad de resistencia frente a MP, por parte de las cepas de levaduras, se ve influencia por el medio de origen, así por ejemplo, se encontró que *Candida albicans*, aislada de aguas residuales galvánicas, presentó resistencia frente a una concentración de 10 mM de Pb **(Calderón, 2014)**. Mientras que otra cepa de la misma especie, aislada de aguas subterráneas contaminadas, presenta resistencia a concentraciones más bajas 0.5 mM de Pb **(Ezzouhr et al., 2010; Cárdenas et al., 2013)**. Se

asume que como consecuencia del bajo contenido de Pb en la ceniza volcánica, estas especies solo resistieron a una concentración de 2mM de Pb.

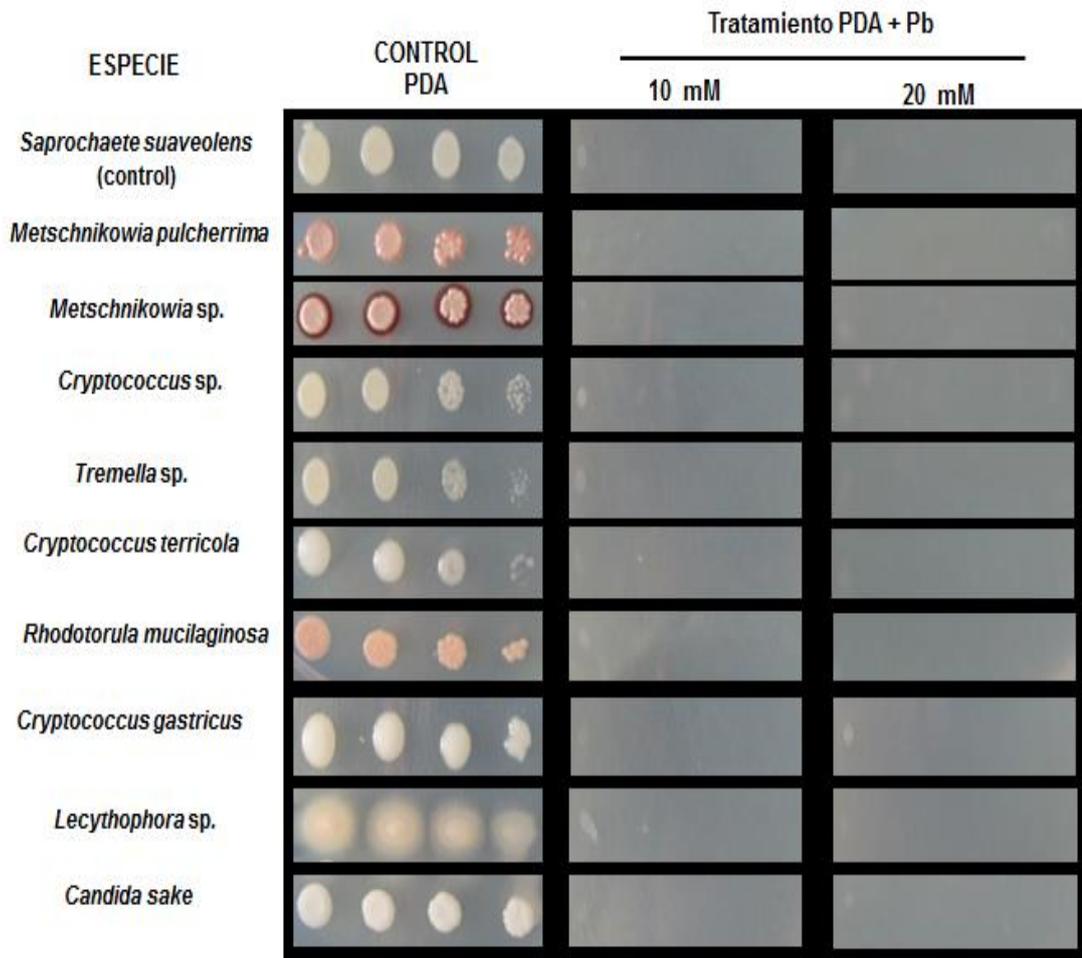


Figura 5. Crecimiento de las cepas de levaduras aisladas del volcán TNG frente a estrés por Pb. Se realizaron diluciones seriadas de cada cultivo, de las cuales se sembraron alícuotas de 2,5 μ l (10^4 , 10^3 , 10^2 y 10^1 células) en medio PDA (control) y en medio PDA suplementado con las distintas concentraciones de MP. Las fotografías se tomaron después de 72 horas de incubación a 20°C.

4.1.1.2.4 Crecimiento de levaduras en presencia de concentraciones crecientes de Ni

A concentraciones pequeñas, el Ni es esencial para el cuerpo humano para la producción de glóbulos rojos, sin embargo, a altas concentraciones llega a ser tóxico. Este metal está presente, de forma natural, en minerales importantes como sulfuros de hierro y níquel, pentlandita y pirrotita o garnierita. Pero las fuentes de contaminación más significativas resultan como consecuencia de la actividad industrial como minería, aleaciones, bronce y latón, galvanización, baterías, pintura, productos agrícolas, cosméticos y medicinales (**Brown et al., 1999; Cargua, 2010**).

Se ha demostrado que la biomasa fúngica de *Aspergillus aculeatus*, *Sporobolomyces* sp, *Saccharomyces cerevisiae* y *Candida utilis*, sometidas a estrés por Ni, presentan tolerancia hacia este metal (**Ross, 1994; Shine et al., 2015**).

Las cepas sometidas a concentraciones crecientes de Ni fueron *Metschnikowia pulcherrima*, *Metschnikowia* sp., *Rhodotorula mucilaginosa* y *Candida sake*, pero además se incluyó a *Cryptococcus* sp., como control negativo para afirmar la inhibición de crecimiento por la sal de Ni (Figura 5), Mediante los resultados obtenidos se pudo determinar que ninguna cepa es resistente a altas concentraciones de este MP. Esto se debe a que la mayoría de las especies fúngicas presentan un rango de sensibilidad de 2.5 mM para cepas tolerantes y 3.5 mM para cepas resistentes a Ni (**Yu et al., 2012; Ruotolo, Marchini & Ottonello, 2008**). Por lo que se estableció que las levaduras aisladas del volcán TNG, no son resistentes a estrés generado por altas concentraciones de este MP. Además se confirmó la inhibición de crecimiento microbiano de *Cryptococcus* sp., por la presencia de Ni en el medio. En el caso *Metschnikowia pulcherrima* y *Metschnikowia* sp. no se han registrado estudios acerca de la resistencia frente a este MP de estas cepas, por lo cual, la presente investigación se constituye como el primer estudio acerca de la resistencia que presentan estas dos especies frente a estrés por Ni.

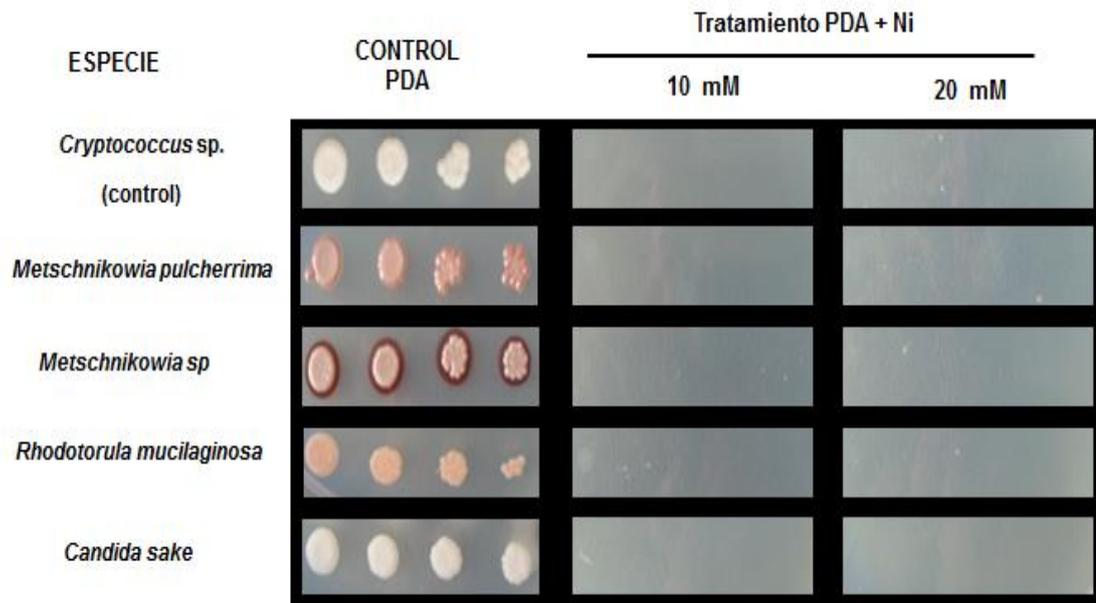


Figura 6. Crecimiento de las cepas de levaduras aisladas del volcán TNG frente a estrés por Ni. Se realizaron diluciones seriadas de cada cultivo, de las cuales se sembraron alícuotas de 2,5 μ l (10^4 , 10^3 , 10^2 y 10 células) en medio PDA (control) y en medio PDA suplementado con las distintas concentraciones de MP. Las fotografías se tomaron después de 72 horas de incubación a 20°C.

4.1.1.2.5 Crecimiento de levaduras en presencia de concentraciones crecientes de Cd

El Cd es un metal pesado muy tóxico, que en concentraciones altas resulta cancerígeno. Se encuentra, de forma natural, formando parte de minerales como blenda de cadmio (CdS), otavita (CdCO₃) o monteponita (CdO). Las emisiones de ceniza volcánica son la fuente natural más significativa de Cd en la atmósfera (Cargua., 2010; Narváez & Cano, 2014). Las industrias de galvanotecnia, fabricación de esmaltes, fotografía y tintorería, son algunos ejemplos de fuentes de origen antrópico para la contaminación por Cd (Cargua, 2010).

Algunas especies fúngicas como *Gliocladium roseum*, *Talaromyces helicus*, *Aspergillus terreus*, *Cladosporium cladosporioides*, *Fusarium oxysporum*, *Penicillium* sp., y *Trichoderma koningii*, aisladas de fuentes contaminadas con Cd, han demostrado ser resistentes a concentraciones entre 0.25 y 0.5 mM de Cd (Massaccesi et al., 2002).

Cuatro especies de las levaduras sometidas a análisis; *Metschnikowia pulcherrima*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Cryptococcus gastricus* y

Lecythophora sp., que presentaron resistencia a una concentración de 0.2 mM de Cd, fueron sometidas a concentraciones crecientes de este elemento metálico. También se incluyó a la cepa de *Cryptococcus* sp., como control negativo para verificar la inhibición del crecimiento microbiano por parte de las sal de Cd (Figura 7).

Los resultados obtenidos mostraron dos levaduras resistentes a una concentración de 1mM de Cd, estas cepas fueron *Rhodotorula mucilaginosa* y *Cryptococcus gastricus*, con un gran crecimiento microbiano en ambos casos.

Una cepa del genero *Rhodotorula*, aislada de suelos mineros, resultó resistente a concentraciones de 0.2 mM de Cd (Li & Yuan, 2006). Mientras la cepa de *Rhodotorula mucilaginosa* aislada del volcán TNG, presentó resistencia a una concentración de 1mM, es decir, especies de un mismo género pueden presentar diferentes comportamientos frente al estrés provocado por este elemento tóxico, por lo que se asume que la respuesta de resistencia puede ser favorable o desfavorable según el origen de la cepa.

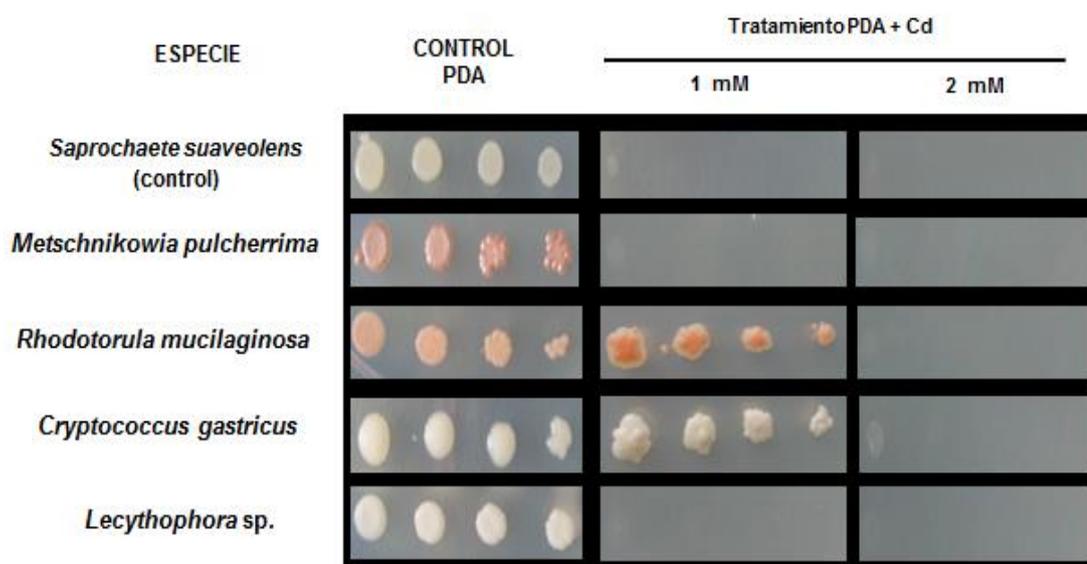


Figura 7. Crecimiento de las cepas de levaduras aisladas del volcán TNG frente a estrés por Cd. Se realizaron diluciones seriadas de cada cultivo, de las cuales se sembraron alícuotas de 2,5 µl (10^4 , 10^3 , 10^2 y 10^0 células) en medio PDA (control) y en medio PDA suplementado con las distintas concentraciones de MP. Las fotografías se tomaron después de 72 horas de incubación a 20°C.

4.1.1.2.6 Crecimiento de levaduras en presencia de concentraciones crecientes de Cu

A pesar de ser un metal esencial, concentraciones altas de Cu resultan tóxicas para los seres vivos. (TULAS, 2010). Las emisiones de este elemento se han incrementado debido a las metalurgias de Cu, la quema de basura urbana y la producción de energía, entre otras, que expiden gases tóxicos como monóxido de carbono, sustancias orgánicas volátiles, óxidos nitrosos, óxidos de azufre, y clorhidratos y fluoruros que contiene Cu (Cargua, 2010).

Las cepas de levaduras que presentaron resistencia frente a una concentración de 0.2 mM de Cu, fueron sometidas a un segundo ensayo de concentraciones crecientes (Figura 8). Los resultados obtenidos a partir de este ensayo, mostraron una alta resistencia de las levaduras frente a las concentraciones de 1 y 2 mM de Cu, con la excepción de *Saprochaete suaveolens* que fue la única especie inhibida por altas concentraciones de este MP.

Se ha reportado resistencia frente a una concentración de 0.5 mM de Cu por parte de una cepa de *Rhodotorula mucilaginosa*, aislada de aguas residuales (Salvadori et al., 2014; Deligios 2015; Garza, 2005). La cepa de *Rhodotorula mucilaginosa* de origen autóctono Ecuatoriano, específicamente del volcán TNG, presentó resistencia a una concentración más elevada: 2mM de Cu, lo cual indica que en nuestro país existen especies con gran potencial para ser aplicadas en procesos de biorremediación. En cuanto a las 8 especies restantes *Metschnikowia pulcherrima*, *Metschnikowia* sp., *Cryptococcus* sp., *Tremella* sp., *Tremella* sp., *Cryptococcus terricola*, *Cryptococcus gastricus*, *Lecythophora* sp., y *Candida sake*, no se encontraron referencias bibliográficas acerca de la resistencia de estas especies frente a Cu. Por lo tanto, se asume el presente trabajo como el primer estudio de la resistencia de dichas especies frente a estrés provocado por este MP. Obteniendo como resultado que las 8 especies son resistentes a concentraciones altas, de hasta 2 mM, de Cu.

En cuanto a las particularidades físicas del crecimiento de las colonias de levaduras, se observó un cambio de color en la mayoría de las cepas, por ejemplo, las levaduras que crecían normalmente de color rosa, en presencia de Cu tomaron una tonalidad marrón-rojizo. Esto se puede deber a que a

concentraciones mayor de 1mg/L, el color natural del cobre predomina sobre el medio en el que se encuentra (Jiménez, 2001). Con esta característica cualitativa, que presentaron las cepas resistentes a Cu, se prevé que el mecanismo de resistencia de las levaduras frente a este MP fue la bioacumulación en la maquinaria celular.

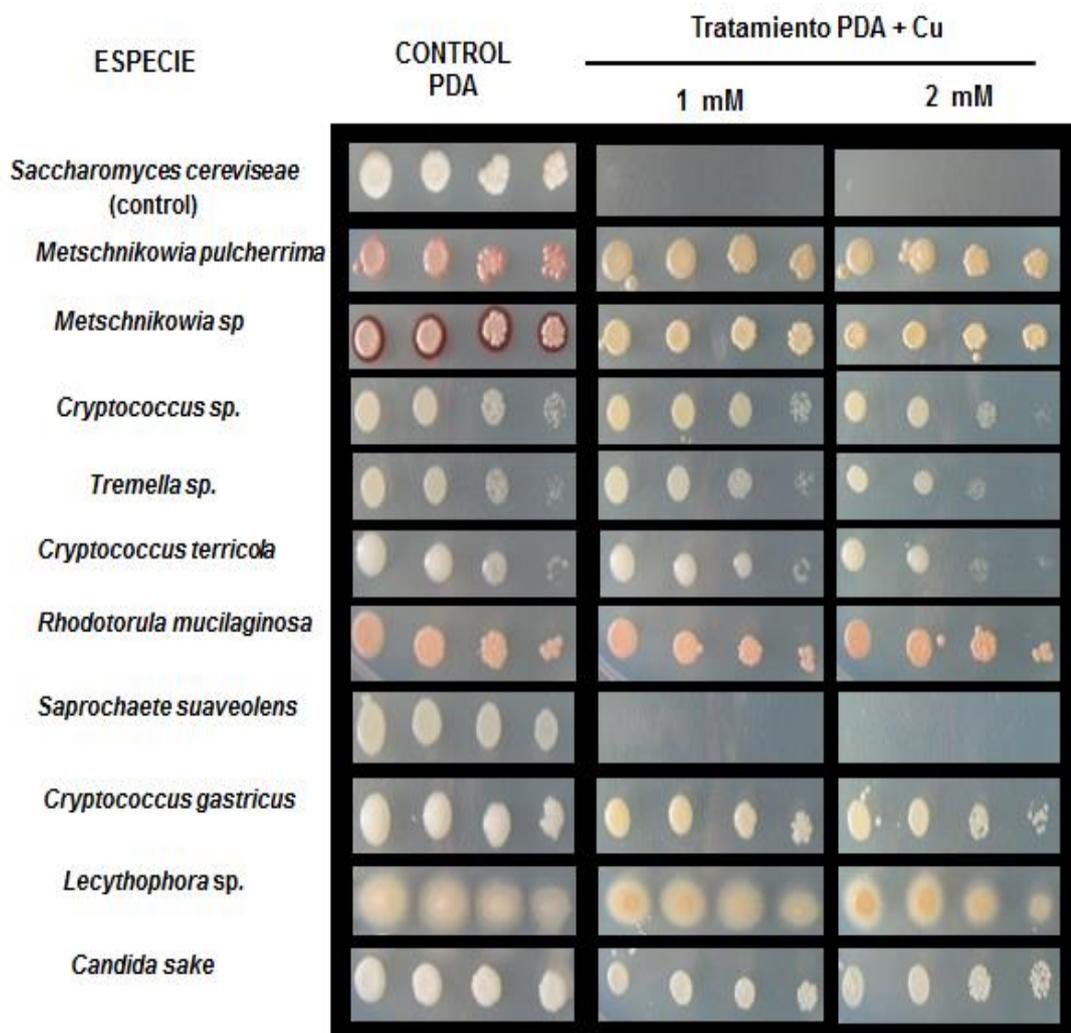


Figura 8. Crecimiento de las cepas de levaduras aisladas del volcán TNG frente a estrés por Cu. Se realizaron diluciones seriadas de cada cultivo, de las cuales se sembraron alícuotas de 2,5 µl (10^4 , 10^3 , 10^2 y 10 células) en medio PDA (control) y en medio PDA suplementado con las distintas concentraciones de MP. Las fotografías se tomaron después de 72 horas de incubación a 20°C.

4.1.2. Viabilidad celular de las especies de levaduras después de un tratamiento con MP

4.1.2.1 Viabilidad celular de las especies de levaduras después de un tratamiento con Zn

Debido a que tres cepas de levaduras aisladas del volcán TNG; *Metschnikowia pulcherrima*, *Metschnikowia sp* y *Candida sake*, presentaron resistencia a concentraciones altas, de hasta 10mM de Zn, se procedió a determinar la viabilidad celular de estas especies tras un tiempo de exposición de 24 horas al estrés provocado por 10mM de Zn.

Mediante los datos obtenidos, se pudo determinar que la cepa de *Candida sake* presentó la mayor supervivencia con un 64.4% de células viables después de 24 horas de exposición a estrés causado por una concentración de 10 mM de Zn, seguidamente *Metschnikowia pulcherrima* con un 47.2% de supervivencia y por último *Metschnikowia sp* con un 18.2% de supervivencia (Figura 9). El decremento de viabilidad celular se puede deber a los diferentes mecanismos de acción que han sido desarrollados por cada especie frente al estrés metálico.

A nivel celular, se ha demostrado que el gran potencial del género *Candida* hacia este MP, se debe a la capacidad de adaptabilidad metabólica que esta genero tiene frente al estrés (**Brown, 2014; Che et al, 2014; Zhang et al., 2012**). En ciertas especies, a partir de una concentración 2 mM de Zn, las células comienzan a almacenar el metal en el interior de la vacuola, y lo utiliza en reacciones redox del metabolismo celular (**Böttcher et al., 2015; Taff et al., 2013**), lo cual les permite resistir concentraciones más altas, de hasta 10Mm. Como se puede observar visualmente en la Figura 10, las especies que crecieron en el medio suplementado con Zn, presentaron un cambio de coloración en sus colonias, dicho cambio fue proporcional a la concentración del metal, lo que sugiere este mecanismo de resistencia de las especies hacia este elemento metálico, lo cual también sucedió anteriormente con Cu. Debido a que no se pudo encontrar estudios relacionados específicamente con la resistencia de estas tres cepas de levaduras frente a Zn, se asume este trabajo como el primer estudio de la resistencia de *Metschnikowia pulcherrima*, *Metschnikowia sp*. y *Candida sake* frente a estrés

provocado por Zn, donde se obtuvo una gran resistencia a altas concentraciones de este metal de hasta 10mM.

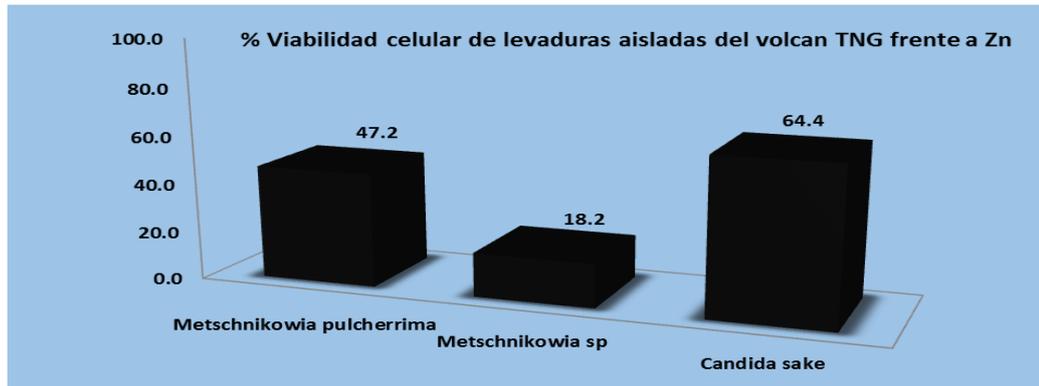


Figura 9. Capacidad de supervivencia de *Metschnikowia pulcherrima*, *Metschnikowia sp* y *Candida sake* a la mayor concentración de Zn (10mM). Se determinó la viabilidad celular como la capacidad para formar colonias a partir de células individuales (unidades formadoras de colonias, CFUs) tras 24h. de exposición al estrés correspondiente. El experimento se realizó por duplicado.

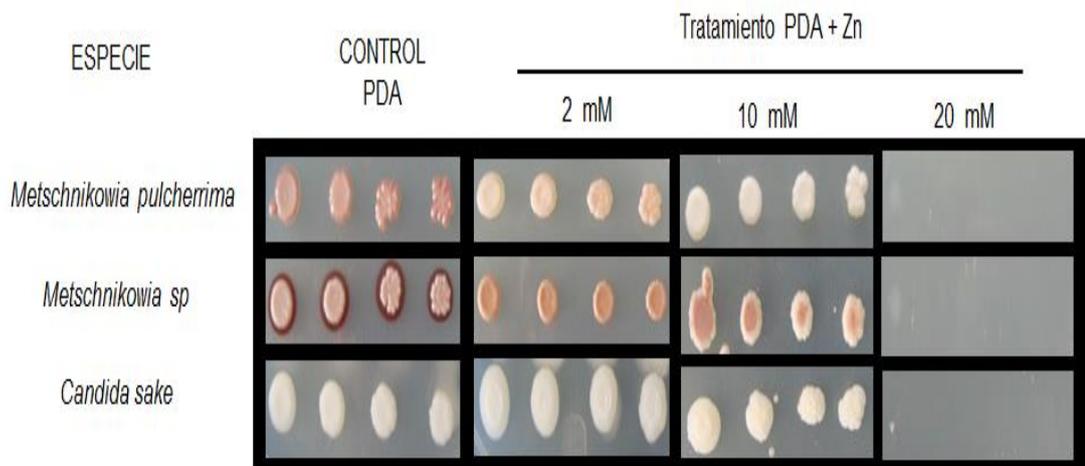


Figura 10. Crecimiento de las cepas de levaduras aisladas del volcán TNG resistentes a estrés por Zn en un rango de 2 a 20 mM.

4.1.2.2 Viabilidad celular de las especies de levaduras después de un tratamiento con Cd.

Se encontraron dos cepas de levaduras resistentes a una concentración de Cd 2mM, las cuales fueron *Rhodotorula mucilaginosa* y *Cryptococcus gastricus*, por lo cual, se procedió a determinar la viabilidad celular de estas especies tras un tiempo de exposición de 24 horas al estrés provocado por esta concentración del metal. A partir de lo cual se obtuvo que el 31.5% de células de *Cryptococcus gastricus* fueron viables a pesar de haber sido sometidas a estrés por Cd y un 24.2% de células de *Rhodotorula mucilaginosa* resultaron ser viables (Figura 11). Lo que indica que las especies tienen una alta capacidad de resistencia frente a concentraciones altas de Cd, pero baja viabilidad celular después de un tratamiento de 1mM de este metal.

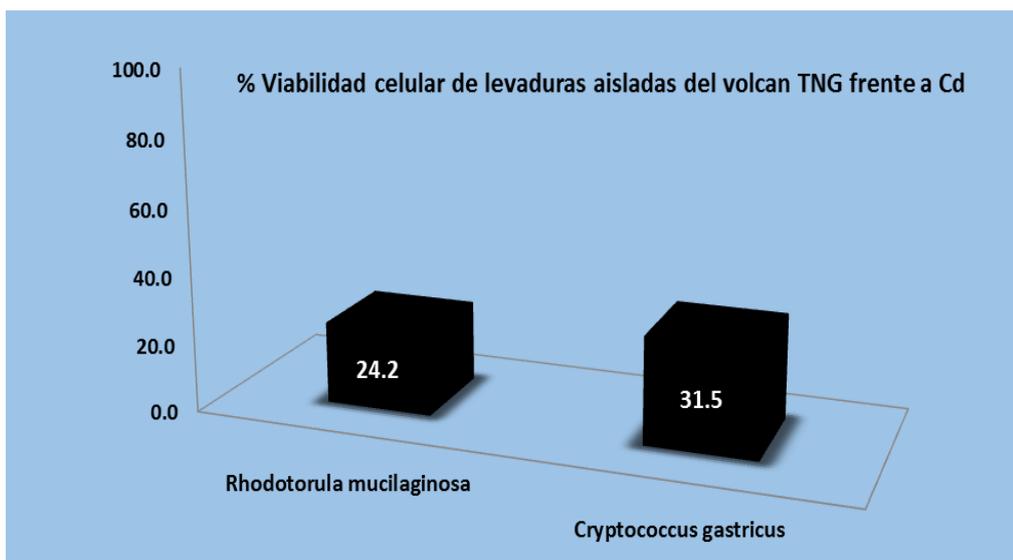


Figura 11. Capacidad de supervivencia de *Rhodotorula mucilaginosa* y *Cryptococcus gastricus* a la mayor concentración de Cd (1mM). Se determinó la viabilidad celular como la capacidad para formar colonias a partir de células individuales (unidades formadoras de colonias, CFUs) tras 24h. de exposición al estrés correspondiente. El experimento se realizó por duplicado.

4.1.2.3 Viabilidad celular de las especies de levaduras después de un tratamiento con Cu

Las células de ciertas levaduras tiene la capacidad de asimilar el Cu en diferentes estados de valencia, incluyéndolo en reacciones redox de varios de sus procesos celulares y así moderando su toxicidad (**Quaranta et al., 2011**). Este hecho unido a que el medio de origen de las cepas estudiadas, contiene cantidades importantes de este elemento metálico (**Narváez, 2004**), determinaron el gran potencial de supervivencia que presentaron las células de la mayoría de las especies aisladas del volcán TNG, después de haber sido expuestas a estrés por Cu por un lapso de 24 horas (Figura 13). Se consiguieron porcentajes altos de viabilidad celular 87.1% por parte de *Metschnikowia* sp. y 86% de *Candida sake*, por lo cual se identificó a estas especies como las más resistentes y viables frente a concentraciones altas de Cu. Las cepas de *Cryptococcus terricola*, *Tremella* sp., *Rhodotorula mucilaginosa* y *Cryptococcus* sp., presentaron una viabilidad celular similar en un rango del 70% y 77%, aproximadamente. Seguido se encuentran las cepas de *Cryptococcus gastricus* y *Lecythophora* sp., que revelaron viabilidad celular del 55 y 57% respectivamente. Y por último esta *Metschnikowia pulcherrima* con un 30.9% de viabilidad celular, que a comparación de las otras especies sometidas al análisis, fue la menos viable. A partir de los resultados obtenidos, se pudo determinar que la mayor parte de biodiversidad de levaduras aisladas del volcán TNG presentaron un alto potencial de viabilidad celular (Figura 13) frente a concentraciones altas de Cu, convirtiéndolas en especies aptas para ser aplicadas en procesos de remoción de este MP.

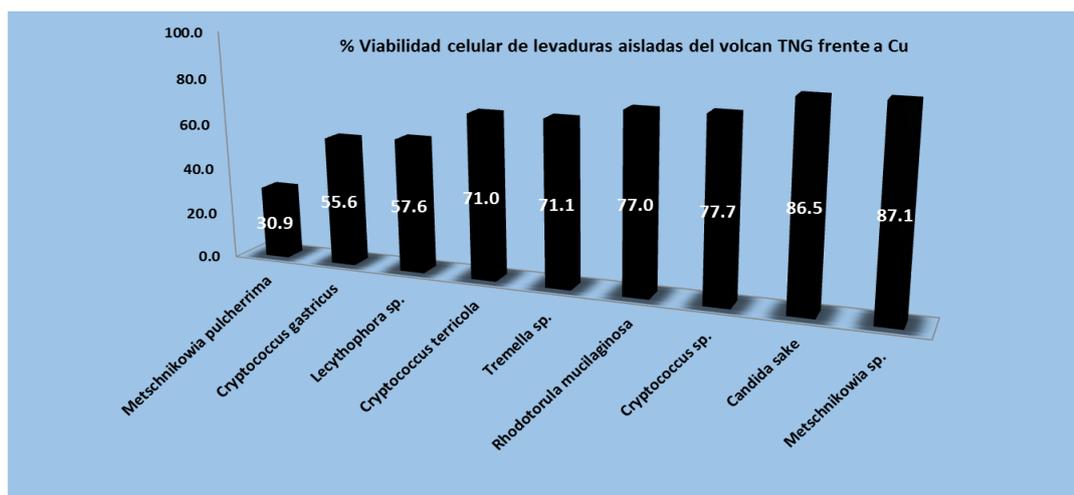


Figura 12. Capacidad de supervivencia de las 9 especies de levaduras aisladas del volcán TNG frente a altas concentraciones de Cu (2 mM). Se determinó la viabilidad celular como la capacidad para formar colonias a partir de células individuales (unidades formadoras de colonias, CFUs) tras 24h. de exposición al estrés correspondiente. El experimento se realizó por duplicado.

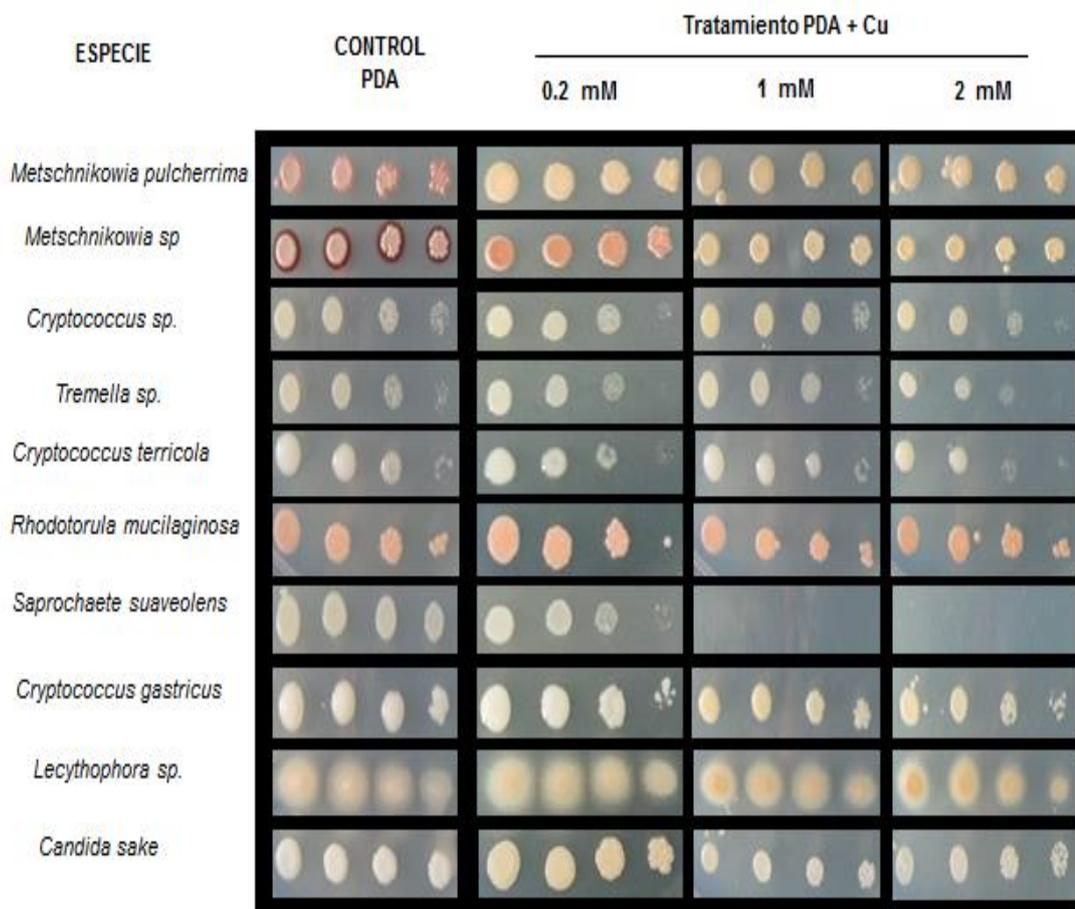


Figura 13. Capacidad de supervivencia de las 9 especies de levaduras aisladas del volcán TNG frente a altas concentraciones de Cu (2 mM).

4.2. Verificación de hipótesis

4.2.1 Resistencia a estrés por MP de las levaduras aisladas del volcán TNG.

Hipótesis nula

Las levaduras aisladas del volcán TNG no presentan resistencia frente a estrés provocado por MP.

Hipótesis alternativa

Las levaduras del volcán TNG si presentan resistencia hacia el estrés provocado por MP

Tabla II. Frecuencias obtenidas del crecimiento de las levaduras aisladas del volcán TNG en presencia de diferentes MP.

Especie	Zn	Cr	Pb	Ni	Cd	Cr
	2 mM	2 mM	2 mM	2 mM	0.2 mM	0.2
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	1	1	1	1	1	1
<i>Metschnikowia</i> sp.	1	1	1	1	0	1
<i>Cryptococcus</i> sp.	1	1	1	0	0	1
<i>Tremella</i> sp.	1	1	1	0	0	1
<i>Cryptococcus terricola</i>	1	1	1	0	0	1
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	1	1	1	1	1	1
<i>Saprochaete suaveolens</i>	0	0	0	0	0	1
<i>Cryptococcus gastricus</i>	1	1	1	0	1	1
<i>Lecythophora</i> sp.	1	1	1	0	1	1
<i>Candida sake</i>	1	1	1	1	0	1

1: crecimiento de la especie; 0: ausencia de la especie

Tabla III. Valor calculado para la prueba X2 y valor p

Estadístico	Valor	gl	p
Chi Cuadrado Pearson	27.77	1	<0.0001
Chi Cuadrado MV-G2	31.00	1	<0.0001

Mediante la prueba de Chi-cuadrado (X2), aplicada en los resultados de crecimiento obtenidos de levaduras aisladas del volcán TNG frente a estrés por Zn, Cr, Pb, Ni, Cd y Zn, se calculó de X2 < 0.0001, siendo este un valor

menor tabulado, se acepta la hipótesis alternativa. Es decir que las levaduras aisladas del volcán TNG si presentan resistencia frente al estrés provocado por los MP sometidos a estudio.

4.2.2 Supervivencia celular de levaduras aisladas del volcán TNG después un tratamiento con MP.

Hipótesis nula

Las levaduras aisladas del volcán TNG no sobreviven tras un tratamiento con MP.

Hipótesis alternativa

Las levaduras aisladas del volcán TNG si sobreviven tras un tratamiento con MP.

Debido a que se obtuvo supervivencia en tres MP por parte de diferentes cepas de las levaduras aisladas del volcán TNG, se realizó el análisis de varianza para Zn y Cu, y una prueba T para Cd.

Tabla IV. Análisis de varianza de la supervivencia de las especies de levaduras aisladas del volcán TNG frente a Zn.

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	2178.46	2	1089.23	62.94	0.0036
ESPECIE	2178.46	2	1089.23	62.94	0.0036
Error	51.92	3	17.31		
Total	2230.38	5			

Se obtuvo un valor de " 0.0036 $p_{calculado} < 9.61 p_{tabulado}$ ", por lo cual se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alternativa.

Tabla V. Análisis de varianza de la supervivencia de las especies de levaduras aisladas del volcán TNG frente a Cu.

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	5063.01	8	632.88	39.81	<0.0001
ESPECIE	5063.01	8	632.88	39.81	<0.0001
Error	143.08	9	15.90		
Total	5206.09	17			

Mediante el análisis de varianza aplicado para la supervivencia frente a Cu, se obtuvo un valor de " $0.0001 p_{\text{calculado}} < 5.84 p_{\text{tabulado}}$ ", por lo cual se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alternativa.

Tabla VI. Prueba t para la supervivencia de las especies de levaduras aisladas del volcán TNG frente a Cd.

	Variable 1	Variable 2
Media	24.2391304	31.509434
Varianza	1.15784499	37.6646493
Grados de libertad	1	
Estadístico t	-1.65015912	
P(T<=t) una cola	0.17342197	
Valor crítico de t (una cola)	6.31375151	
P(T<=t) dos colas	0.34684393	
Valor crítico de t (dos colas)	12.7062047	

Mediante la aplicación de la prueba t Student se obtuvo un valor de " $t_{\text{calculado}} 12.706 > t_{\text{tabulado}} -1.65$ ", por lo cual se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alternativa.

Por medio del análisis realizado, se acepta la hipótesis alternativa, confirmando que las levaduras aisladas del volcán TNG si sobreviven después de un tratamiento con MP.

4.2.3 Resistencia frente al estrés provocado por cada uno de los MP sometidos a estudio, de al menos una cepa de levadura aislada del volcán TNG.

Hipótesis nula

No existe ninguna cepa de levadura, aislada del volcán TNG, resistente al estrés provocado por cada uno de los MP sometidos a estudio.

Hipótesis alternativa

Existe por lo menos una cepa de levadura, aislada del volcán TNG, resistente al estrés provocado por cada uno de los MP sometidos a estudio.

Tabla VII. Valor calculado para la prueba X2 y valor p para *Rhodotorula mucilaginosa*

Estadístico	Valor	gl	p
Chi Cuadrado Pearson	6.00	1	0.0143
Chi Cuadrado MV-G2	8.32	1	0.0039
Coef.Conting.Cramer	1.00		
Coef.Conting.Pearson	0.71		

En el análisis de crecimiento de la cepa de *Rhodotorula mucilaginosa* aislada del volcán TNG en presencia de Cd, Cr, Ni, Pb, Cu y Zn, para la prueba Chi-cuadrado (X2), se determinó un valor de X2 calculado menor al tabulado, por lo tanto se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alternativa.

Tabla VIII. Valor calculado para la prueba X2 y valor p para *Metschnikowia pulcherrima*

Estadístico	Valor	gl	p
Chi Cuadrado Pearson	2.67	1	0.1025
Chi Cuadrado MV-G2	2.91	1	0.0880
Coef.Conting.Cramer	0.67		
Coef.Conting.Pearson	0.55		

En el análisis de crecimiento de la cepa de *Metschnikowia pulcherrima* aislada del volcán TNG en presencia de Cd, Cr, Ni, Pb, Cu y Zn, para la prueba Chi-cuadrado (X2), se determinó el valor de X2 calculado menor al tabulado, por lo tanto se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alternativa.

Por lo tanto se acepta la hipótesis alternativa, demostrando que en la biodiversidad de levaduras aisladas del volcán TNG, se encontraron dos cepas *Metschnikowia pulcherrima* y *Rhodotorula mucilaginosa* con la capacidad de resistir estrés por todos los MP sometidos a estudio.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

- La diversidad de levaduras aisladas del volcán TNG presenta una gran tolerancia hacia el Cu. El 100% de las especies presentaron resistencia a 0.2 mM de Cu y el 90% mostraron resistencia a 2 mM. Además en la supervivencia frente a estrés metálico, se alcanzó un máximo de 87.1% de células viables de *Metschnikowia pulcherrima*, después de estar expuestas a 24 horas de estrés provocado por este elemento metálico.
- Mediante el análisis realizado, se lograron identificar dos cepas de levaduras altamente resistentes a estrés por lo diferentes MP sometidos a estudio *Metschnikowia pulcherrima* y *Rhodotorula mucilaginosa*. Estas especies mostraron la capacidad de crecer en medios suplementados con 2mM de Zn, Pb, Ni y Cr, y 0.2mM de Cd, y Cu, respectivamente.
- A partir de los datos obtenidos, se afirma que las fuentes de contaminación que contienen cantidades importantes de MP, como el volcán TNG con sus emisiones de ceniza, ofrecen la oportunidad de encontrar nuevas especies de levaduras con gran capacidad de resistencia hacia MP.

5.2. Recomendaciones

- Someter a estudios de remoción de Cd a las cepas de *Rhodotorula mucilaginosa* y *Cryptococcus gastricus*, que demostraron ser altamente resistentes frente a concentraciones altas de este MP.
- Someter a estudios de remoción de Zn a las cepas de *Metschnikowia pulcherrima*, *Metschnikowia* sp. y *Candida sake*, que demostraron ser altamente resistentes y viables frente a concentraciones altas de este MP.
- Utilizar las cepas de levaduras aisladas del volcán TNG, para la obtención de nuevos procesos de biorremediación de ambientes contaminados con MP.

MATERIALES DE REFERENCIA

Referencias Bibliográficas

- Aguilera A. (2013). Eukaryotic Organisms in Extreme Acidic Environments, the Río Tinto Case. *Life* 3(3): 363–374.
- Ali E. & Hashem M. (2007). Removal Efficiency of the Heavy Metals Zn (II), Pb(II) and Cd(II) by *Saprolegnia delica* and *Trichoderma viride* at Different pH Values and Temperature Degrees. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3763141/>. Pág. 14-16
- Baldi F., Vaughan A. & Olson G. (1990). Chromium (VI)-Resistant Yeast Isolated from a Sewage Treatment Plant Receiving Tannery Wastes. *Applied and Environmental Microbiology* 56(4): 913–918.
- Bautista F. (1999). Introducción al Estudio de la Contaminación del Suelo por Metales Pesados. México-Yucatán. Primera edición. Editorial Lib-AUDY
- Binbin W., Wang G., Wu J., Fu Q. & Liu Ch. (2014). Sources of Heavy Metals in Surface Sediments and an Ecological Risk Assessment from Two Adjacent Plateau Reservoirs. *Revista PLoS One* 9(7): e102101.
- Borchardt A., Haas N., & Hunt R. (2004). Vulnerability of Drinking-Water Wells in La Crosse, Wisconsin to Enteric-Virus Contamination from Surface Water Contributions. *Applied and Environmental Microbiology* 70(10): 5937.
- Böttcher B., Palige K., Jacobsen I., Hube B., & Brunke S. (2015). Csr1/Zap1 Maintains Zinc Homeostasis and Influences Virulence in *Candida dubliniensis* but Is Not Coupled to Morphogenesis. *Eukaryot Cell* 14(7): 661–670.
- Brady D., Stoll A. & Duncan J. (2008). Biosorption of Heavy Metal Cations by Nonviable Yeast Biomass. *Environmental Technology* 15: 429-438.
- Brown A. (2014). Stress Adaptation in a Pathogenic Fungus. *Journal Experimental Biology* 217(1): 144–155.

- Brown G., Foster A., Looper M. & Ostergren J. (1999). Mineral Surfaces and Bioavailability of heavy metals: A molecular-scale perspective. *National Academy of Sciences* 96:3388–3395
- Calabrese S. & D'Alessandro W. (2015). Characterization of The Etna Volcanic Emissions Through an Active Biomonitoring Technique (Moss-Bags): Part 2--Morphological and Mineralogical Features. *Chemosphere* 119: 1456-1464.
- Calderón Z. (2014). Eficacia de Diferentes Agentes Desinfectantes en la Remoción de *Candida Albicans*, *Streptococcus Mutans* Y *Enterococcus Faecalis* Adheridos a Resina Acrílica De Termocurado. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Recuperado de: http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/cybertesis/3576/1/Calderon_vm.pdf.
- Cárdenas J., Moctezuma G., Acosta I., & Martínez V. (2013). Biosorción de Plomo (Pb) en Solución por Diferentes Biomasas Fúngicas. *Rev Latin Rec Natu* 9 (1): 57-61.
- Cargua J. (2010). Determinación de las Formas de Cr, Cd, Ni, Pb y Zn y su Biodisponibilidad en Suelos Agrícolas del Litoral Ecuatoriano. Ecuador.
- Cervantes C. (2001). Interactions of Chromium with Microorganisms and Plants. *FEMS Microbiology Reviews* 25(3): 335-347
- Che Y., Stoll A. & Duncan J. (2014). Calcineurin Controls Hyphal Growth, Virulence, and Drug Tolerance of *Candida tropicalis*. *Eukaryot Cell* 13(7): 844–854.
- Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas de Argentina, CONICET. (2013). Levaduras Capaces de ser utilizadas en Procesos de Biorremediación. Recuperado de: <http://www.conicet.gov.ar/descubren-levaduras-capaces-de-ser-utilizadas-en-procesos-de-biorremediacion/>

- Cyert M. & Philpott C. (2015). Regulation of Cation Balance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 193(3): 677–713.
- Deligios M. (2015), Draft Genome Sequence of *Rhodotorula mucilaginosa*, an Emergent Opportunistic Pathogen. *Genome Announc* 3(2): e00201-15.
- Esam H. & Mohamed H. (2007). Removal Efficiency of the Heavy Metals Zn(II), Pb(II) and Cd(II) by *Saprolegnia delica* and *Trichoderma viride* at Different pH Values and Temperature Degrees. *Mycobiology* 35(3):135–144.
- Ezzouhr L., Rous L., Loret G., Kepguar K. & Killer O. (2010). Mechanisms of Lead Uptake by Fungal Biomass Isolated from Heavy Metals Habitats. *Afinidad* 67(545):39-43.
- Garza T. (2005). Aislamiento de Microorganismos con Alta Capacidad de Tolerar y Remover Pb (ii), Cr(vi), Cd(ii), Cu(ii), Zn(ii) y Ni(ii). Universidad de la habana. Recuperado de: <http://www.bibliociencias.cu/gsd/collect/tesis/index/assoc/HASH1146.dir/doc.pdf>.
- Hepp C. (2008). Los Efectos De Cenizas Volcánicas Sobre Los Ecosistemas Agropecuarios. INIA Tierra adentro PP 52-52. Recuperado de: <http://www2.inia.cl/medios/biblioteca/ta/NR35018.pdf>
- Hidalgo K. (2015). Primer estudio sobre la diversidad de levaduras asociada a un volcán: Tungurahua, Ecuador. Recuperado de: <http://repositorio.uta.edu.ec/jspui/bitstream/123456789/12946/1/BQ.%2075.pdf>
- Jiménez B. (2001). Contaminación ambiental en México: causas, efectos y tecnología apropiada. Editorial Limusa. Segunda edición. Pag; 56-57
- Jin Y., Dunlap P., McBride J., Al-Refai H., Bushel PR. & Freedman JH (2008). Global Transcriptome and Deletome Profiles of Yeast Exposed to Transition Metals. *PLoS Genet* 4(4): e1000053.

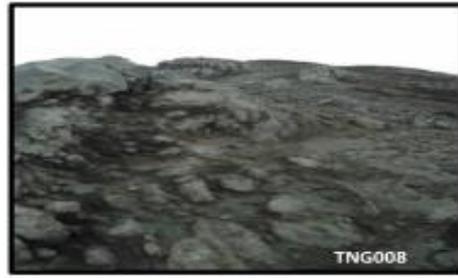
- Li Z. & Yuan H. (2006). Characterization of Cadmium Removal by *Rhodotorula* sp. Y11. *Appl Microbiol Biotechnol.* 73(2): 458-63
- Massaccesi G., Gaglarz A., Fedorovych D., Babyak D., Yanovych D., Kaszycki P. & Koloczek H. (2002) Cadmium Removal Capacities of Filamentous Soil Fungi Isolated from Industrially Polluted Sediments, in La Plata (Argentina). *World J Microbiol Biotechnol* 18: 817 – 20.
- Manahan E. (2007). *Introducción a la Química Ambiental.* México-DF. Primera edición. Editorial Reverte S.A. Pág. 148-149.
- Narváez, O. & Cano, F. (2014). Cenizas Volcánicas- Contaminación Ambiental. *Revista Del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias* 17(3): 232-238
- Navarro B., Moctezuma M. & Acosta I. Remoción de Cromo (vi) por la Biomasa celular de la levadura capsulada *Cryptococcus neoformans*. Centro de Investigación y de Estudios de Posgrado. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Autónoma de San Luis Potosí.
- Ollivier P., Abanto M., García R. & Ramírez P. (2011). Aeration Controls the Reduction and Methylation of Tellurium by the Aerobic, Tellurite-Resistant Marine Yeast *Rhodotorula mucilaginosa*. *Applied and Environmental Microbiology* 77(13): 4610–4617.
- Quaranta D., Acosta F., Lopez G. & Garcia M. (2011). Mechanisms of Contact-Mediated Killing of Yeast Cells on Dry Metallic Copper Surfaces. *Applied Environmental Microbiology* 77(2): 416–426.
- Park D., Yun Y. & Park J. (2010). The Past, Present, and Future Trends of Biosorption. Department of Biotechnology and Bioprocess Engineering. Pohang University of Science and Technology, Korea 15(3); 86-102.
- Ross I. (1994). Reduced Uptake of Nickel by a Nickel Resistant Strain of *Candida Utilis*. *Microbios*, 83(337): 261-270

- Ruotolo R., Marchini G. & Ottonello S. 2008. Membrane Transporters and Protein Traffic Networks Differentially Affecting Metal Tolerance: a Genomic Phenotyping Study in Yeast. *Genome Biology*; 9(4): 25-26
- Sala L., García S., González J. & Frascaroli M. (2010). Biosorción para la Eliminación de Metales Pesados en Aguas de Desecho. *QUIR-CONICET. Anales de la Real Sociedad Española de Química* 106(2). Pág. 114–12.
- Salvadori M., Libkind D., Sampaio J. & Brock M. (2014). Intracellular Biosynthesis and Removal of Copper Nanoparticles by Dead Biomass of Yeast Isolated from the Wastewater of a Mine in the Brazilian Amazonia. *PLoS One* 9(1): e87968.
- Serrano-Bueno G., Hernández A., López-Lluch G., Pérez-Castiñeira J., Navas P. & Serrano A. (2013). Inorganic Pyrophosphatase Defects Lead to Cell Cycle Arrest and Autophagic Cell Death Through Nad⁺ Depletion in Fermenting Yeast. *J Biol Chem* 288(18): 82-92.
- Shine A., Shakya V. & Idnurm A. (2015). Phytochelatin Synthase is Required for Tolerating Metal Toxicity in a Basidiomycete Yeast and is a Conserved Factor Involved in Metal Homeostasis in Fungi. *Fungal Biol Biotechnol* 28(2): 3.
- Sun X. (2014). A Heavy Metal-Associated Protein (AChMA1) from the Halophyte, *Atriplex canescens* (Pursh) Nutt. Confers Tolerance to Iron and Other Abiotic Stresses When Expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. *International Journal of Molecular Science* 15(8): 14891–14906.
- Taff H., Mitchell K., Edward J. & Andes D. (2013). Mechanisms of *Candida* biofilm Drug Resistance. *Future Microbiol* 8(10)
- Tulas (Texto Unificado de Legislación Ambiental Secundaria), Libro VI. (2010). Norma de Calidad Ambiental y Descarga de Efluentes: Recurso Agua.

- Vadkertiova R. & Slavikova, E. (2006). Metal Tolerance of Yeasts Isolated From Water, Soil and Plant Environments. *J Basic Microbiol* 46(2): 145-
- Verghese J. (2012). Biology of the Heat Shock Response and Protein Chaperones: Budding Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) as a Model System. *Microbiology and Molecular Biology Rev* 76(2): 115–158.
- Volesky B. (2001). Detoxification of Metal-Bearing Effluents: Biosorption for the Next Century. Canadá. Elsevier-Hydrometallurgy 59: 203–216.
- Vullo D. (2003). Microorganismos y Metales Pesados: Una Interacción en Beneficio del Medio Ambiente. *Química viva* 2(3): 93-104.
- Yu D., Danku J., Baxter I., Kim S., Vatamaniuk OK., Vitek O., Ouzzani M. & Salt DE. (2012). High-Resolution Genome-Wide Scan of Genes, Gene-Networks and Cellular Systems Impacting the Yeast Ionome. *BMC Genomics* 3: 623.
- Zhang J., Silao F., Bigol U., Bungay A., Nicolas M., Heitman J. & Chen YL. (2012). Calcineurin Is Required for Pseudohyphal Growth, Virulence, and Drug Resistance in *Candida lusitanae*. *PLoS One* 7(8): e44192.

ANEXOS

Anexo A: Fotografías de los 7 puntos de origen de las cepas de levaduras aisladas del volcán Tungurahua, Ecuador



--

Anexo B: Características macroscópicas de levaduras aisladas del volcán TNG.



Metschnikowia pulcherrima

TNG001.1



Metschnikowia sp.

TNG001.3



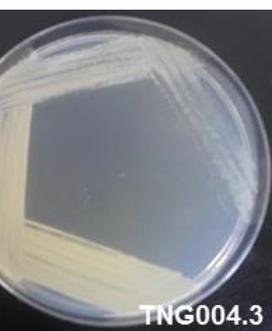
TNG003.6



TNG004.2

Cryptococcus sp.

Tremella sp.

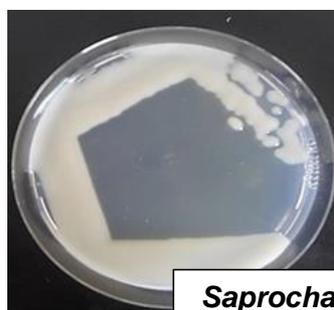


TNG004.3

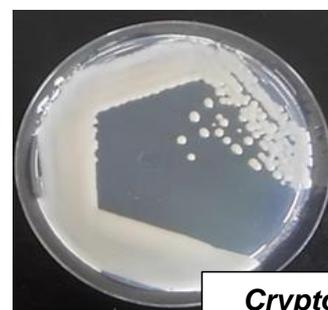
Cryptococcus terricola



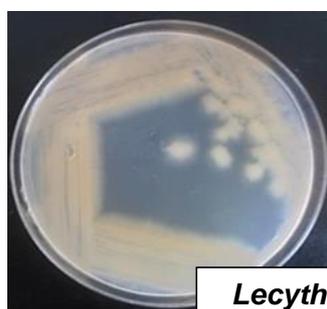
Rhodotorula mucilaginosa



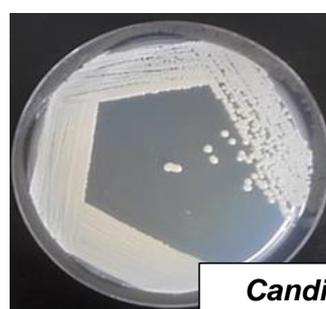
Saprochaete suaveolens



Cryptococcus gastricus



Lecythophora sp.



Candida sake