



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 Ingeniero Bioquímico, otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos.

AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE LEVADURAS A PARTIR DE EFLUENTES DE CURTIEMBRES TUNGURAHUENSES Y CARACTERIZACIÓN EN FUNCIÓN A LA TOLERANCIA A CROMO (Cr) VI.

Autor: Pablo Andrés Salazar Jácome

Tutora: PhD. Gloria Serrano Bueno

Ambato – Ecuador

Marzo 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.



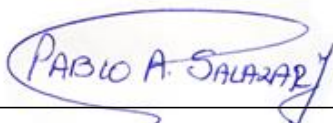
PhD. Gloria Serrano Bueno

C.I: 28827695R

TUTORA

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo, Pablo Andrés Salazar Jácome, manifiesto que los resultados obtenidos en el presente Proyecto de Investigación, previo la obtención del título de Ingeniero Bioquímico son absolutamente originales, auténticos y personales; a excepción de las citas.



Pablo Andrés Salazar Jácome

C.I. 0503485096

AUTOR

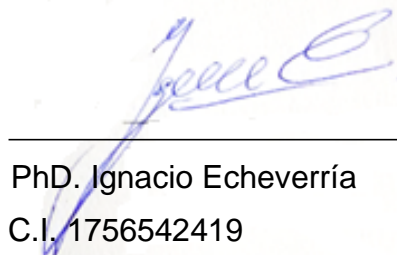
APROBACIÓN DE LOS MIEMBROS DE TRIBUNAL DE GRADO

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



PhD. Ignacio Echeverría
C.I. 1756542419



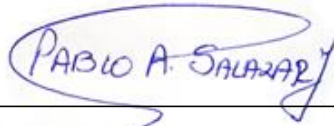
Lic. Mg. Danae Fernández Rivero
C.I. 175718120-9

Ambato, 17 de Diciembre de 2015

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.



Pablo Andrés Salazar Jácome

C.I. 0503485096

AUTOR

DEDICATORIA

Este trabajo está dedicado principalmente a Dios por haberme permitido el haber llegado hasta este momento tan importante en mi vida.

A mí madre que a pesar que no la tengo físicamente siempre esta con migo y desde el cielo ha sabido darme fuerza, valor y que gracias a su ejemplo y valores me ha enseñado a no desfallecer ni rendirme ante nada.

A mí padre por brindarme su apoyo incondicional durante todos estos años de estudio, y que supo ser mi pilar fundamental para nunca rendirme ante las circunstancias difíciles.

A mis hermanos por estar siempre presentes, acompañándome para poderme realizar.

A mis tíos Nuvita y Robert por abrirme las puertas de su casa y brindarme un hogar lleno de cariño, a mis primas Monse y Dome por permitirme compartir momentos de alegría y demostrarme siempre su cariño.

A mi abuelita, mis tías Lolita y Tita que estuvieron siempre pendientes de mí, gracias por su ayuda y cariño.

A mi directora de tesis Glo por toda la colaboración brindada durante este proyecto gracias por tu valiosa guía, conocimientos, paciencia y gran calidad humana demostrada.

Pablo Andrés Salazar Jácome

ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS

PÁGINAS PRELIMINARES

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

TEXTO

INTRODUCCIÓN

CAPÍTULO I

EL PROBLEMA

1.1. Tema de la investigación6
1.2. Justificación6
1.3. Objetivos7
1.3.1. Objetivo general7
1.3.2. Objetivos específicos7

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes Investigativos8
2.2. Hipótesis9
2.3. Señalamiento de variables de la hipótesis10

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Materiales	11
3.2. Métodos	11
3.2.1. Estudio del área y toma de muestras	11
3.2.2. Aislamiento y cultivo de levaduras	12
3.2.3. Extracción de ADN genómico	12
3.2.4. Amplificación del dominio D1/D2 mediante PCR	13
3.2.5. Electroforesis de ADN en geles de agarosa	14
3.2.6. Secuenciación del dominio D1/D2	14
3.2.7. Alineamiento y análisis filogenético	15
3.2.8. Tolerancia por estrés a Cr (VI)	15
3.3. Análisis estadístico	15

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Análisis y discusión de los resultados	16
4.1.1. Estudio del área y toma de muestras	16
4.1.2. Aislamiento y cultivo de levaduras	18
4.1.3. Aislamiento de ADN genómico	24
4.1.4. Amplificación de dominio D1/D2	27
4.1.5. Alineamiento y análisis filogenético	30
4.1.6. Tolerancia por estrés a Cr (VI)	31
4.2. Verificación de hipótesis	33
4.3 Análisis estadístico	34
4.3.1. Análisis de la resistencia a Cr (VI) de las levaduras aisladas	34

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones	38
5.2. Recomendaciones	49

BIBLIOGRAFÍA40
ANEXOS46

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Puntos de muestreo y parámetros fisicoquímicos de tenería Inca16
Tabla 2. Puntos de muestreo y parámetros fisicoquímicos de curtiembre Tungurahua17
Tabla 3. Parámetros para la caracterización macroscópica y microscópica18
Tabla 4. Parámetros macroscópicos de cepas aisladas21
Tabla 5. Parámetros microscópicos de levaduras aisladas22
Tabla 6. Concentración y pureza del ADN genómico extraído de levaduras aisladas de tenería Inca25
Tabla 7. Concentración y pureza del ADN genómico extraído de levaduras aisladas de curtiembre Tungurahua26
Tabla 8. Identificación género-especie de levaduras aisladas en Tenería Inca29
Tabla 9. Identificación género-especie de levaduras aisladas en Curtiembre Tungurahua29
Tabla 10. Levaduras aisladas de tenería Inca, que crecieron en presencia del metal30
Tabla 11. Análisis por frecuencias, de levaduras aisladas de tenería Inca tolerantes a Cr (VI)34
Tabla 12. Levaduras aisladas de curtiembre Tungurahua, que crecieron en presencia del metal35
Tabla 13. Análisis por frecuencias, de levaduras aisladas de curtiembre Tungurahua tolerantes a Cr (VI)35
Tabla 14. Frecuencia del crecimiento de las levaduras aisladas en ambas curtiembres36
Tabla 15. Análisis por frecuencias, de levaduras tolerantes a Cr (VI) aisladas en ambas curtiembres36

ÍNDICE DE FIGURAS

Esquema 1. Diagrama de flujo proceso del curtido de pieles	3
Figura 1. Dominio D1/D2 del ADN ribosómico de levaduras y posición de los oligonucleótidos utilizados para amplificarlas por PCR	14
Figura 2. Morfología macroscópica de cepas aisladas de tenería Inca	19
Figura 3. Morfología macroscópica de cepas aisladas de curtiembre Tungurahua	20
Figura 4. Morfología microscópica de levaduras aisladas de tenería Inca	23
Figura 5. Morfología microscópica de levaduras aisladas de curtiembre Tungurahua	24
Figura 6. Electroforesis en geles de agarosa del ADN genómico extraído de las levaduras aisladas	27
Figura 7. Electroforesis en geles de agarosa de los productos amplificados por PCR del dominio D1/D2	28
Figura 8. Análisis filogenético de las once especies aisladas	30
Figura 9. Crecimiento de once levaduras aisladas bajo tolerancia a estrés a Cr (VI)	32
Figura 10. Distribución de levaduras aisladas de tenería Inca, que toleran Cr (VI)	34
Figura 11. Distribución de levaduras aisladas de curtiembre Tungurahua, que toleran Cr(VI)	35
Figura 12. Distribución de levaduras aisladas en ambas curtiembres, que toleran Cr (VI)	36

RESUMEN

Tungurahua es una provincia ecuatoriana, considerada uno de los centros más importantes en la producción de cuero, la cual concentra en su territorio el 80% de curtiembres a nivel nacional. Esta industria supone un gran problema ambiental debido a la alta contaminación que genera. Las curtiembres utilizan sales de Cr en el proceso de curtido, lo que a su vez genera efluentes con alto contenido de este metal y que, al ser vertido al ambiente, genera efectos tóxicos en la biota.

En el presente trabajo se evalúa el potencial de levaduras nativas a tolerar Cr (VI). Para este propósito se aislaron levaduras de efluentes de dos curtiembres: una artesanal y una industrializada. Se establecieron de 1 – 9 puntos de muestreo según el caso, desde la recepción de las pieles hasta la obtención de producto terminado, aislando un total de veinticinco cepas de levaduras.

En cuanto a la metodología utilizada, destacamos el uso de herramientas moleculares en la identificación a nivel de género y especie de las levaduras aisladas, identificando así once especies diferentes. El análisis filogenético las clasifico dentro de tres órdenes y dos familias (Basidiomycota y Ascomycota). Con el fin de determinar la tolerancia a estrés por Cr (VI), se realizaron ensayos por triplicado utilizando el método de goteo en placa en presencia del metal.

Los resultados obtenidos manifestaron que *Candida parapsilosis*, *Candida zeylanoides*, *Rhodospodium diobovatum*, *Candida humilis*, *Trichosporon otae* y *Zygowilliopsis californica* fueron las cepas que mostraron crecimiento en presencia de Cr (VI), las cuales se proponen como una alternativa limpia y autóctona para ser utilizadas en procesos de biorremediación frente a este tipo de contaminación.

Palabras clave: Curtiembres, levaduras, tolerancia a Cr (VI).

ABSTRACT

Tungurahua is an Ecuadorian province, which is considered one of the most important in terms of leather production and which owns on its territory 80% of the tanneries of the country. Tanneries represent a significant environmental problem due to the contamination they generate. These industries use Cr salts in the tanning process, which in turns generate effluents with high content of this material and once these get in contact with the environment, toxic effects are generated in the biota.

This report evaluates the potential of native yeasts to tolerate Cr (VI). In order to achieve this, the yeasts of two tanneries effluents were isolated: a traditional and an industrialized one. There were established 1-9 test points depending on each case, starting from the reception phase until obtaining the final product, isolating in the process twenty five yeast strains.

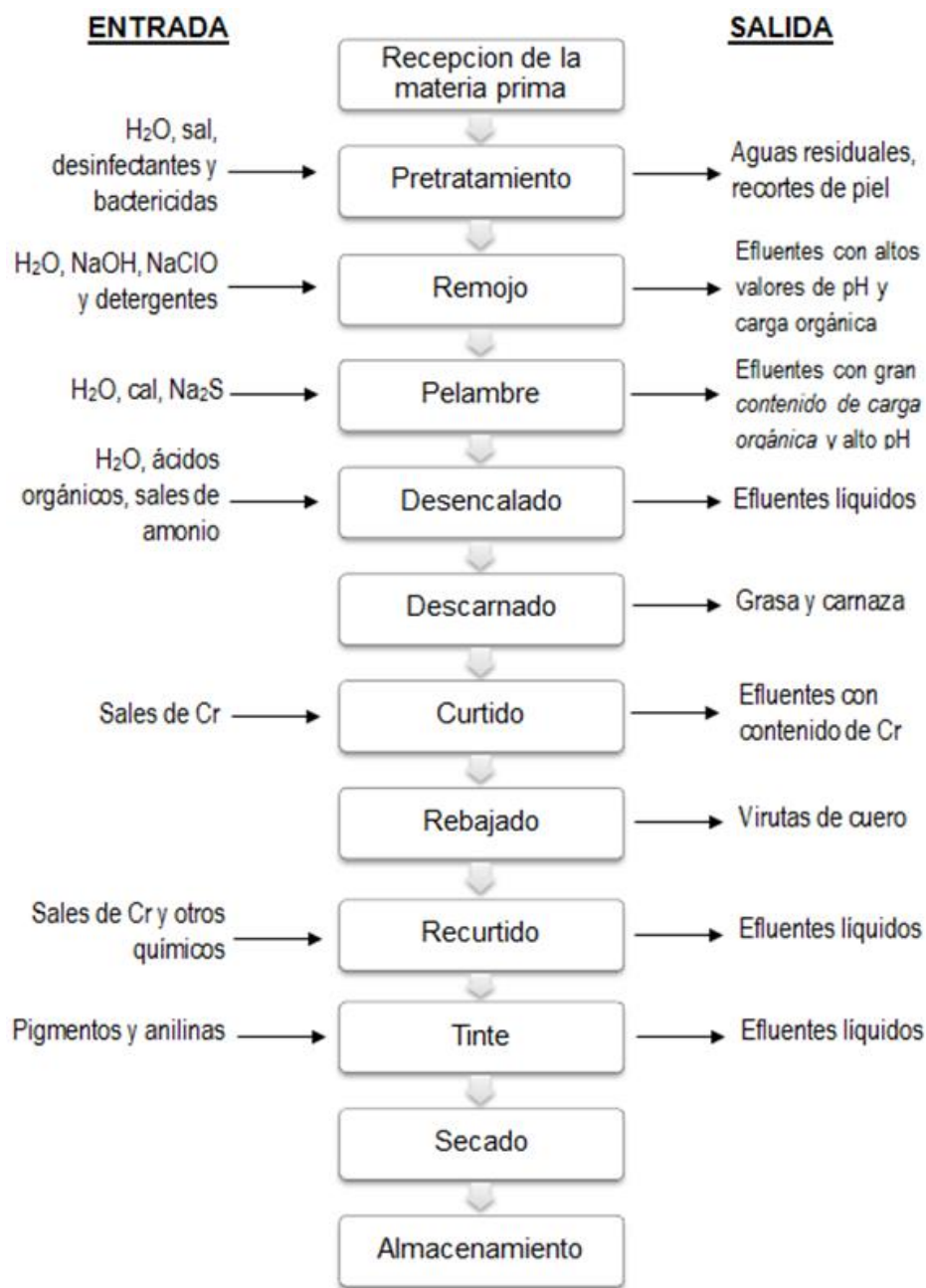
In terms of methodology, great emphasis was laid upon the molecular tools in order to identify the genera and specie of the isolated yeasts, which lead to identify eleven different species. The phylogenetic analysis classified them in three categories and in two families (Basidiomycota and Ascomycota). In order to determine stress tolerance to Cr (VI), triplicate assays were developed by using the drop plate method in presence of the metal.

This allowed to observe that *Candida parapsilosis*, *Candida zeylanoides*, *Rhodospiridium diobovatum*, *Candida humilis*, *Trichosporon otae* y *Zygowilliopsis californica* were strains showed growth in the presence of Cr (VI), which in turn are suggested as a clean and autochthonous alternative to be used in the bioremediation processes for this kind of contamination.

Keywords: Tanneries, yeasts, tolerance to Cr (VI).

INTRODUCCIÓN

El curtido es el proceso mediante el cual se transforman las pieles animales (bovinos, ovinos y porcinos) en cuero, obteniendo así un material estable, no degradable, durable y resistente (Ranganathan y kabadgi, 2010). Este proceso se realiza a través de diferentes etapas (Esquema I).



Esquema 1. Diagrama de flujo proceso del curtido de pieles.

La industria del curtido de pieles en Tungurahua es un sector importante en la economía, la cual, junto a la línea manufacturera, representa el 14.78% de la contratación de mano de obra nacional. Según la asociación nacional de curtidores, en Tungurahua, se registran alrededor de 50 curtiembres, divididas entre artesanales e industrializadas, y distribuidas en los diferentes cantones de esta provincia. En los últimos años este sector productivo ha presentado un incremento de inversiones del 8% al 55% y un incremento de producción del 87% **(Medina, 2010)**. Esta industria ha ganado una imagen negativa ante la sociedad debido al alto impacto ambiental que genera **(Bosnic et al., 2003)**. Este proceso requiere alrededor de 300 kg de productos químicos por tonelada de piel, los mismos que generan altos volúmenes de efluentes, en un rango de 34 a 56 m³ por tonelada de cuero procesado **(Mahbubul et al., 2012)**. Este proceso se lleva a cabo a base de sales de Cr, el cual permite estabilizar el colágeno de la piel mediante agentes curtientes, lo que, a su vez, transforma la piel en cuero, permitiendo así una estabilización de la materia orgánica **(Córdova et al., 2013)**.

Por todo lo anterior, los residuos líquidos de las curtiembres poseen una gran cantidad de contaminantes, entre ellos el Cr, puesto que entre 60 al 80% de este metal es tomado por la piel, y el resto es descargado como residuo **(Benejam y Pujol, 2000)**. Este metal puede presentarse principalmente en dos estados de oxidación, Cr (III) y Cr (VI), siendo este último de gran preocupación debido a su alta toxicidad y su capacidad mutagénica y, por tanto carcinogénica **(Tapia et al., 2002)**. Aunque existen nuevas alternativas para sustituir el uso de sales de Cr, en Tungurahua, este material sigue siendo irremplazable debido a la calidad de cuero que se obtiene **(Chávez, 2010)**.

La influencia del Cr en ambientes contaminados, ha sido consecuente en la aparición de poblaciones de microorganismos adaptados, o también denominados tolerantes **(Gutiérrez et al., 2010)**, entre los cuales destacan las levaduras. El uso de este tipo de microorganismos para la eliminación de la contaminación generada por metales pesados entre ellos el Cr (VI), ha recibido mucha atención en los últimos años **(Iram et al., 2012)**. Debido al alto nivel de aplicación, son considerados como los microorganismos más adecuados para este tipo de biorremediación. Esta

consideración se debe, a que poseen una alta tolerancia hacia este metal y son un grupo versátil que puede adaptarse y crecer en condiciones adversas. Esta alternativa biológica muestra considerables ventajas sobre los métodos tradicionales, como por ejemplo disminución de la contaminación secundaria, simplicidad de operación a bajas concentraciones de metales o aumento de la eficacia con respecto al coste **(Guevara, 2010)**.

CAPÍTULO I

EL PROBLEMA

1.1. TEMA:

AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE LEVADURAS A PARTIR DE EFLUENTES DE CURTIEMBRES TUNGURAHUENSES Y CARACTERIZACIÓN EN FUNCIÓN A LA TOLERANCIA A CROMO (Cr) VI.

1.2. JUSTIFICACIÓN.

La provincia de Tungurahua se destaca por su gran vocación productiva y manufacturera, lo que se traduce en un importante desarrollo industrial en los últimos años. Debido a este incremento, las fuentes de contaminación por metales pesados especialmente el Cr, han aumentado considerablemente. Una de las principales actividades que involucran la contaminación por Cr, es la industria del curtido de pieles. Según la asociación nacional de curtidores del Ecuador, en Tungurahua, se concentra el 80% de curtiembres a nivel nacional, dividiéndose entre grandes industrias y empresas artesanales. La industria del curtido de pieles está considerada como una fuente importante de contaminación, dada las características de los efluentes que se eliminan a los cursos de agua, lo cual genera un gran impacto ambiental (**Mwinyihija, 2010**). El proceso productivo genera importantes volúmenes de residuos sólidos y efluentes líquidos, mismos que presentan una compleja combinación de compuestos orgánicos, inorgánicos, considerable contenido de cal, elevadas concentraciones de Cr, cadmio (Cd), plomo (Pb), sulfatos, químicos fluorados, una elevada DBO, ciertos polímeros y detergentes, lo que convierten el sector en altamente contaminante (**Greenpeace, 2012**). La principal preocupación es la presencia de Cr (VI), se estima que entre el 60 y 80% de este metal puede fijarse en el cuero, el restante se pierde en los efluentes líquidos (**Mera, 2010**).

El Cr puede presentar dos estados de oxidación Cr (III) y Cr (VI), este último es altamente tóxico para todas las formas de vida, siendo mutagénico y carcinogénico en humanos y bacterias **(Chávez, 2010)**. Existen técnicas convencionales para eliminar el Cr (VI) de ambientes contaminados, sin embargo, debido al costo, elevado tiempo de operación y contaminación secundaria, surge la necesidad de desarrollar alternativas más eficientes. Con la presente propuesta se pretende aislar e identificar levaduras de curtiembres tungurahueses y caracterizarlas en función a su capacidad de tolerar el estrés por Cr (VI), ofreciendo así, una potencial alternativa biológica, autóctona y limpia, para la disminución de los niveles de Cr (VI) de sus propios residuos industriales.

1.3. OBJETIVOS.

1.3.1. Objetivo general.

- Aislar, identificar y caracterizar en función a la tolerancia a Cr (VI), levaduras aisladas a partir de efluentes de curtiembres tungurahueses.

1.3.2. Objetivos específicos.

- Aislar levaduras a partir de efluentes de curtiembres tungurahueses.
- Identificar a nivel molecular las levaduras previamente aisladas.
- Determinar la tolerancia a Cr (VI) de levaduras aisladas.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1. ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS.

Los usos fabriles que ha dado el hombre a los compuestos de Cr, han generado un aumento en la contaminación atmosférica, hídrica y alimentaria, especialmente aquellas industrias relacionadas con procesos textiles, metalúrgicos, galvanizados, vidrios, cerámicas, y curtido de pieles (**Tapia et al., 2002**).

Los efluentes provenientes de las curtiembres poseen una combinación compleja de compuestos orgánicos e inorgánicos, lo que ha provocado que se convierta en un importante nicho ecológico para especies biológicas con alta capacidad de resistir a cada tipo de contaminante. Entre estas se encuentran las levaduras, consideradas por diversos autores como uno de los microorganismos que muestran resistencia a metales pesados, entre ellos el Cr (VI). Las levaduras son capaces de adaptarse eficientemente a los efluentes de curtiembres, considerados ecosistemas extremos, puesto que son un grupo versátil, pueden adaptarse y crecer en condiciones adversas, además, poseen la ventaja de contar con una pared celular con excelentes propiedades de unión a metales (**Khan, 2001; Baldrian y Gabriel, 2002; Gavrilesu, 2004; Anand et al., 2006**).

Panigatti et al., 2012 considera a muchas levaduras como una herramienta biotecnológica para el tratamiento de efluentes de curtiembres con presencia de Cr (VI), debido a que presentan resistencia a ese metal. Este es un campo emergente, ya que en un principio se utilizaron para remediar las aguas contaminadas con metales e hidrocarburos, pero actualmente lo hacen como alternativa de tratamiento para efluentes de origen industrial, lo que incide en una evidente reducción de costos de los productos químicos y el consumo de energía en comparación con los procesos convencionales de tratamiento (**Reichenauer y Germida, 2008**).

De los estudios reportados en literatura acerca de la tolerancia a Cr (VI) por levaduras aisladas de efluentes de curtiembres, la información disponible es escasa, la mayoría de los microorganismos ensayados sólo son capaces de tolerar concentraciones bajas de Cr (VI), usualmente dentro del intervalo de 0.1 a 0.5 mM; esto último se ha atribuido a los efectos tóxicos y mutagénicos del metal. Entre las especies levaduriformicas estudiadas se encuentran *Saccharomyces cerevisiae*, aislada de los desecho de la industria de actividades fermentativas, *Candida sp.*, *Candida maltosa* y *Rhodospordium sp.* aisladas a partir de residuos industriales, *Schizosaccharomyces pombe*, tanto de tipo salvaje como diversos mutantes, y *Pichia guilliermondii*, aislada de aguas ácidas de la minera Yanacocha – Perú (Orbegozo et al., 2008; Ksheminska et al., 2003).

No se ha reportado ninguna investigación sobre la diversidad levaduras aisladas de efluentes de curtiembres en Ecuador, con tal razón el objetivo de la presente propuesta es el de aislar e identificar levaduras a partir de este ecosistema, y caracterizarlas en función a su capacidad de resistir el estrés por Cr (VI). Al término del estudio se obtendrá una colección de levaduras nativas con potencial para ser utilizadas en la biorremediación de ambientes contaminados por este metal.

2.2. HIPÓTESIS.

- **Hipótesis nula.**

Ho: No existen levaduras tolerantes a Cr (VI) asociadas a curtiembres tungurahueses.

- **Hipótesis alternativa.**

Ha: Si existen levaduras tolerantes a Cr (VI) asociadas a curtiembres tungurahueses.

2.3. SEÑALAMIENTO DE VARIABLES DE LA HIPÓTESIS.

- Aislamiento de levaduras presentes en efluentes de curtiembres.
- Caracterización macro y microscópica de levaduras aisladas.
- Extracción de ADN genómico.
- Cuantificación por espectrofotometría y electroforesis en gel de agarosa del ADN extraído.
- Secuenciación del dominio D1/D2 para la identificación de géneros y especies de levaduras.
- Crecimiento de levaduras empleando el método de goteo en placa en presencia de 0.5 mM de Cr (VI).

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. MATERIALES.

PDA (agar papa dextrosa), (DifcoTM, Francia), caldo YM (yeast and moulds); microesferas de vidrio (ϕ 0,4 μ m) (Sigma-Aldrich, USA), ARNasa (Sigma®, USA); tampón para PCR, MgCl₂ (Invitrogen, Brasil); dNTP mix, Taq polimerasa, oligonucleótidos (NL1 Y NL4), kit PureLink® PCR Purification, ladder de 100 pb y 1 kb plus, SyberSafe (Invitrogen, USA), Trióxido de Cromo (CrO₃) (Fisher Scientific).

3.2. MÉTODOS.

3.2.1. ESTUDIO DEL ÁREA Y TOMA DE MUESTRAS.

Se establecieron dos tipos de curtiembres: artesanal e industrializada, con el fin de realizar un análisis comparativo. Para obtener un muestreo representativo, se realizó una visita previa a las curtiembres con el propósito de observar el proceso productivo e identificar los puntos críticos. Se delimitaron entre 1 – 9 puntos según el caso, desde la recepción de la piel hasta la obtención del producto terminado, de los cuales se tomaron muestras por triplicado. Se incluyeron dos tipos de muestras: sólidas, a partir de sedimentos de cuero y cebo, y líquidas que fueron residuos de cada etapa del proceso. Tras la toma de muestras, éstas fueron inmediatamente trasladadas al laboratorio bajo refrigeración para iniciar el aislamiento de las levaduras.

3.2.2. AISLAMIENTO Y CULTIVO DE LEVADURAS.

A partir de las muestras de residuos líquidos se realizaron diluciones 1/10, se tomaron 100 µl de la muestra original y 100 µl de la dilución y, seguidamente se extendieron por triplicado, sobre medio PDA (gL-1: almidón de papa 4.0; dextrosa 20.0; agar 15.0) con sulfato de estreptomicina (SIGMA®, USA) a una concentración de 50 µl/ml, para evitar el desarrollo de bacterias. En el caso de las muestras sólidas, estas se diluyeron, en proporción 1:1, con agua destilada estéril y fueron sometidas a agitación (250 r.p.m.) durante treinta minutos, a temperatura ambiente mediante un agitador New Brunswick (USA) con el fin de liberar los microorganismos de los retazos de cuero y cebo.

Las cajas inoculadas se incubaron a 28 °C por el tiempo necesario hasta evidenciar crecimiento. De las colonias obtenidas se eligieron las más diversas en cuanto a sus características ópticas, se realizaron estrías simples en el mismo medio de aislamiento y se incubaron bajo las mismas condiciones.

Las colonias aisladas se observaron bajo el microscopio de contraste de fases (EVOS XL Imaging System - Life Technologies). Del total de colonias llevadas a estría simple, las identificadas como levaduras se purificaron en estría compuesta. Para la caracterización macroscópica y microscópica se siguieron los parámetros establecidos en la base de datos del Centro de biodiversidad Fúngica, **(CBS-KNAW, 2011)**.

3.2.3. EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO.

La extracción de ADN genómico de levaduras se realizó de acuerdo al protocolo seguido por **Serrano-Bueno et al., 2013**.

Las levaduras fueron crecidas en medio PDA. Se recogió con un palillo estéril una cantidad considerable de biomasa y se la colocó en tubos eppendorf de 1.5 ml con agua estéril. Seguidamente, estos fueron sometidos a centrifugación a 13 000 r.p.m durante dos minutos y se descartó el sobrenadante. El pellet obtenido se resuspendió en 200 µl de reactivo Hoffman (Tris-HCl 10 mM (pH 8), Tritón X-100

2%, SDS 1%, NaCl 100 mM y EDTA 1 mM). Para la lisis celular, se adicionó un volumen aproximado a 100 µl de perlas de vidrio con un diámetro de 0.4-0.6 mm (Sigma-Aldrich, USA) y se sometieron al vórtex por dos ocasiones durante un minuto. Para la extracción de ADN se añadieron 200 µl de fenol: cloroformo 1:1 (v/v) y una vez más se sometió al vórtex durante dos minutos. Seguidamente, se eliminó el sobrenadante y se adicionaron 200 µl de fenol: cloroformo 1:1 (v/v) y 200 µl del reactivo de Hoffman. Para precipitar el ADN, se centrifugó la mezcla a 13 000 r.p.m durante diez minutos, tomando la fase acuosa a la que se añadió 10µl de NaCl 3M y 500 µl de isopropanol, se eliminó el sobrenadante y se evaporó la fase líquida en un termobloque (Labnet, Taiwán) a 65 °C durante diez minutos. Finalmente, el ADN se resuspendió en 20 µl de agua desionizada ultrapura (Invitrogen, USA) con ARNasa 0,05% (p/v) (Sigma®, USA).

3.2.4. AMPLIFICACIÓN DEL DOMINIO D1/D2 MEDIANTE PCR.

Se amplificó la región del ADN ribosomal, correspondiente al dominio D1/D2, dicha secuencia es muy utilizada para la identificación molecular de levaduras, dada su elevada variabilidad nucleotídica entre especies (Figura 1). Este dominio se amplificó utilizando el oligonucleótido directo NL1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3') y reverso NL4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3') (El-Latif Hesham *et al.*, 2006).

La reacción en cadena de la polimerasa se realizó en un volumen de 50 µl formada por: 1 µg de ADN genómico, 40 µl de agua ultrapura, 5 µl de buffer 10x para PCR (Invitrogen, Brasil), 0.5 µl de los oligonucleótido directo y reverso, 1.5 µl de MgCl₂ 50 mM (Invitrogen, Brasil), 0.5 µl de Taq polimerasa (Invitrogen, USA), y 1 µl de dNTP mix 10 mM (Invitrogen, Brasil). Las amplificaciones se llevaron a cabo en un termociclador MultiGene (Labnet, USA). Una vez desnaturalizado el ADN (94 °C por 5 minutos) se sometió a 35 ciclos sucesivos de desnaturalización del ADN molde (94 °C, 30 segundos), seguida del alineamiento de los oligonucleótidos en los extremos correspondiente (55 °C, 30 segundos) y la elongación de la cadena (72 °C, 1 minuto) y, finalmente se incubó a 72 °C por diez minutos.

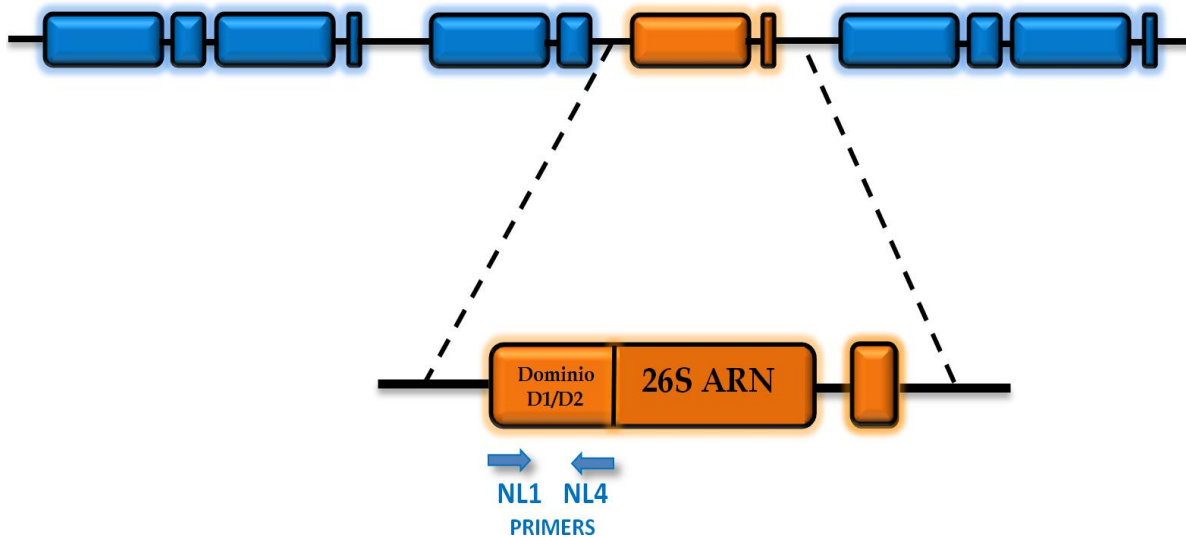


Figura 1. Dominio D1/D2 del ADN ribosómico de levaduras y posición de los oligonucleótidos utilizados para amplificarlos por PCR.

3.2.5. ELECTROFORESIS DE ADN EN GELES DE AGAROSA.

Los fragmentos amplificados fueron separados mediante electroforesis en geles de agarosa teñido con SyberSafe (Invitrogen, USA) para su visualización de ADN. El gel se preparó con tampón TBE (Tris- H_3BO_3 90 mM (pH 8) y EDTA 2 mM). Las muestras se prepararon con 5 μ l de ADN genómico o producto de PCR y 2 μ l de tampón de carga (Invitrogen) que fueron colocados en los pocillos del gel. Como marcador molecular se utilizó un ladder de 1 Kb (Invitrogen, USA), para las bandas de ADN genómico, mientras que, las bandas de los productos de PCR fueron comparadas con un ladder de 100 pb (Invitrogen, USA).

3.2.6. SECUENCIACIÓN DEL DOMINIO D1/D2.

Los productos de PCR, del dominio D1/D2, fueron purificados utilizando el kit PureLink® PCR Purification (Invitrogen, USA) y directamente enviados a secuenciar a través de la empresa Macrogen USA, la cual usa el equipo Applied Biosystems

3730xl DNA Analyzer. Para las reacciones de secuenciación se utilizaron los mismos oligonucleótidos usados en la amplificación por PCR, NL1-NL4.

3.2.7. ALINEAMIENTO Y ANÁLISIS FILOGENÉTICO.

Las secuencias obtenidas, se sometieron a un alineamiento utilizando la base de datos GenBank y el software de alineamiento local de secuencias BLAST. El análisis filogenético se realizó mediante la construcción de árboles filogenéticos utilizando el software MEGA versión 6.0.

3.2.8. TOLERANCIA POR ESTRÉS A Cr (VI).

Para evaluar el efecto del Cr (VI) sobre el crecimiento de las levaduras, estas se cultivaron previamente en caldo de cultivo YM (g L-1: glucosa 20.0; extracto de levadura 3.0; extracto de malta 3.0) trasladando biomasa desde placas de medio sólido a tubos de 10 ml con 3 ml de medio. Se dejaron crecer a 30°C con agitación (150 rpm) por veinticuatro horas.

Para desarrollar el método de goteo en placa, se realizaron diluciones seriadas en agua estéril de cada preinóculo (10^4 , 10^3 , 10^2 y 10 células/ml) a partir de cada lectura al espectrofotómetro (Abs.₆₀₀). Posteriormente, se inocularon 2.5 µl de cada una de ellas sobre placas en medio de cultivo PDA suplementado con CrO₃ a una concentración final de 0.5 mM. Como control positivo se utilizó medio PDA. Finalmente se evaluó el crecimiento al transcurrir el tiempo. Destacamos que este experimento se realizó por triplicado (**Serrano-Bueno *et al.*, 2013**).

3.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

El análisis estadístico se realizará mediante tablas de frecuencias acumuladas y relativas, además los resultados serán ilustrados mediante gráficos estadísticos.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS.

4.1.1. ESTUDIO DEL ÁREA Y TOMA DE MUESTRAS.

Con el fin de realizar un estudio comparativo, se establecieron dos tipos de curtiembres: artesanal (tenería Inca) e industrializada (curtiembre Tungurahua). Se tomaron entre 1 – 9 puntos de muestreo según el caso, desde la recepción de las pieles hasta la obtención del producto terminado. Además se incluyeron dos tipos de muestras: sólidas, a partir de sedimentos de cuero y cebo, y líquidas, residuos correspondientes de cada etapa del proceso.

Tabla 1. Puntos de muestreo y parámetros fisicoquímicos de tenería Inca.

Punto de muestreo	Fase del proceso de curtido	Tipo de muestra	pH	Numero de cepas aisladas
IN1	Agua de abastecimiento	Líquida	8,38±0,15	1
IN2	Pelambre	Líquida	12,77±0,01	0
IN3	Curtido	Líquida	4,45±0,04	1
IN4	Rebajado	Sólida	4,63±0,01	0
IN5	Recurtido	Líquida	4,91±0,01	5
IN6	Tinte	Líquida	5,31±0,01	2
IN7	Final	Líquida	5,80±0,03	8

Tabla 2. Puntos de muestreo y parámetros fisicoquímicos de curtiembre Tungurahua.

Punto de muestreo	Fase del proceso de curtido	Tipo de muestra	pH	Numero de cepas aisladas
CT1	Agua cruda	Liquida	8,05±0,02	0
CT2	Agua tratada	Liquida	8,41±0,02	0
CT3	Remojo	Liquida	7,59±0,03	2
CT4	Cebo	Solida	12,64±0,03	0
CT5	Pelambre	Liquida	10,95±0,21	0
CT6	Curtido	Liquida	4,43±0,27	0
CT7	Rebajado	Solida	3,41±0,17	0
CT8	Recurtido	Liquida	3,86±0,01	3
CT9	Tinte	Liquida	3,79±0,04	3

Se lograron aislar un total de veinticinco levaduras entre las dos curtimbres; diecisiete levaduras en tenería Inca y ocho en curtiembre Tungurahua. Con respecto a la distribución de levaduras, hubo variabilidad en los puntos de muestreo, ya que los valores de pH obtenidos en estos, fueron un factor influyente. A lo largo de todo el proceso de curtido de pieles, se presentaron valores de pH ácidos en las últimas fases del proceso, y pH básicos en las primeras etapas. Las levaduras suelen desarrollarse en un rango de pH comprendido entre 2.8 a 8.5 (**Uribe, 2007**), como era de esperarse no se aisló ninguna cepa de aquellos puntos de muestreo que esta fuera de este rango. Pese a que en el caso de la curtiembre industrializada se establecieron dos puntos de muestreo más, se aislaron muchas menos cepas fúngicas, mostrando así que la diversidad de levaduras es mucho más rica en el curtido artesanal de pieles.

4.1.2. AISLAMIENTO Y CULTIVO DE LEVADURAS.

Tras aislar las colonias de cada punto de muestreo de ambas industrias, según se describe en el apartado 3.2.2, se realizó la caracterización macro y microscópica con el fin de descartar microorganismos de origen bacteriano. Para tal fin, se utilizaron los parámetros establecidos por el Centro de Biodiversidad Fúngica (CBS-KNAW).

Tabla 3. Parámetros para la caracterización macroscópica (textura, apariencia, color y margen) y microscópica (forma celular).

TEXTURA		APARIENCIA		COLOR	MARGEN		FORMA CELULAR	
A	fluida	E	aracnooidea	blanco	K	entero	N	limón
B	mucoidea	F	harinosa	crema	L	erosionado	O	triangular
C	butirosa	G	suave	amarillo	M	otro	P	luna
D	membranosa	H	venosa	anaranjado			Q	alantoides
		I	verrugosa	rosado			R	redonda
		J	surcada	rojo			S	ovalada
				cuero			T	cilíndrica
				café oscuro-negro			U	fusiforme
							V	campana

Fuente: CBS-KNAW

Con respecto a la textura de la colonia, catorce presentaron una textura butirosa, y once de textura mucoide, no encontrándose colonias de texturas fluida y membranosa. En cuanto a la apariencia de las colonias, las veinticinco cepas aisladas presentaron una apariencia suave. El color de las colonias fue un parámetro diverso, puesto que dieciséis fueron blancas, cinco cremas, dos anaranjadas y dos de color rosa. Respecto al margen de las colonias, las veinticinco presentaron un margen entero. Como último parámetro macroscópico se analizó la difusión de pigmentos, en el cual no se obtuvieron resultados, puesto que ninguna de las cepas aisladas presento esta característica (Figura 2 y 3).

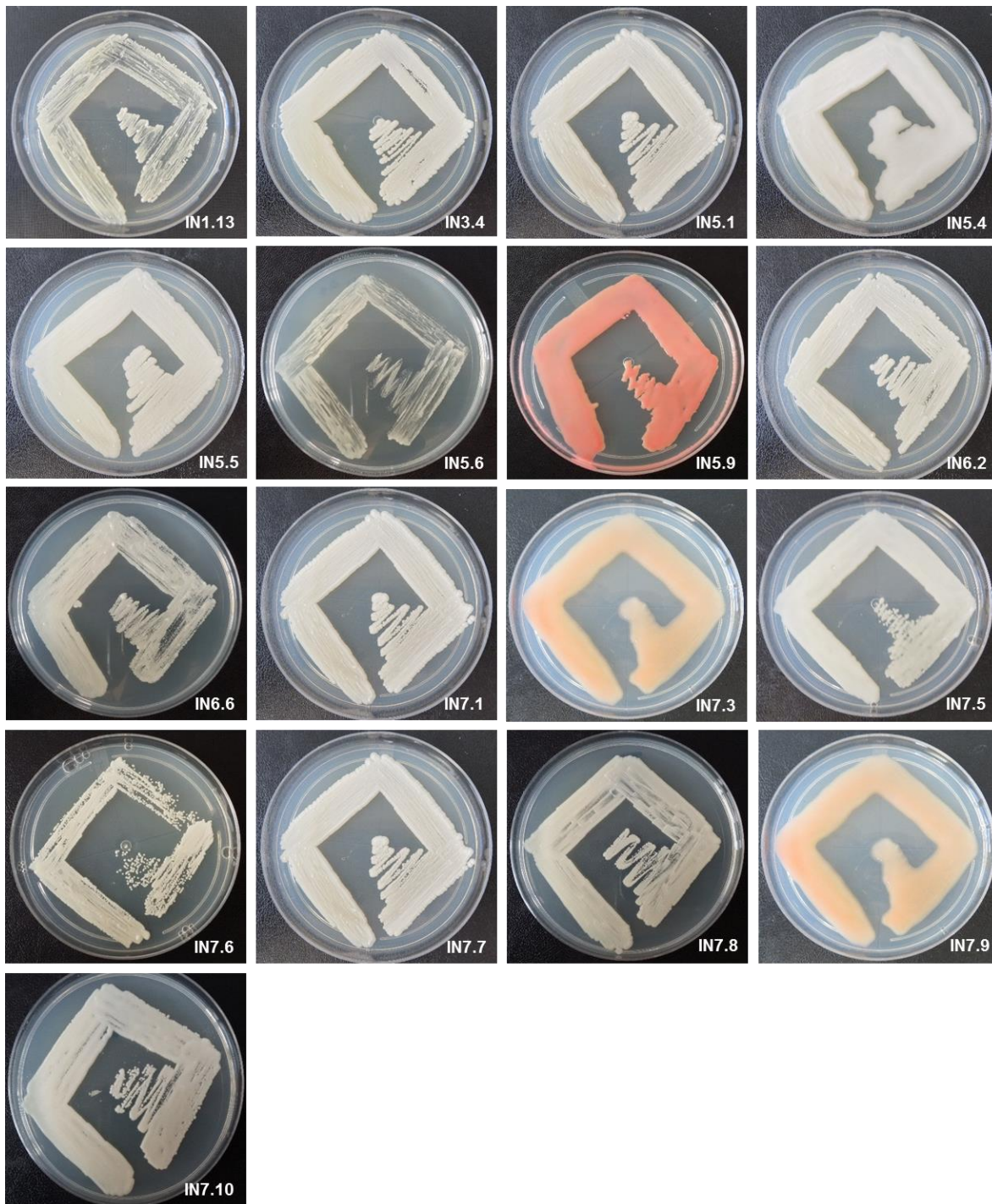


Figura 2. Morfología macroscópica de cepas aisladas de tenería Inca. Se muestran fotografías de estrías compuestas de cada una de ella.

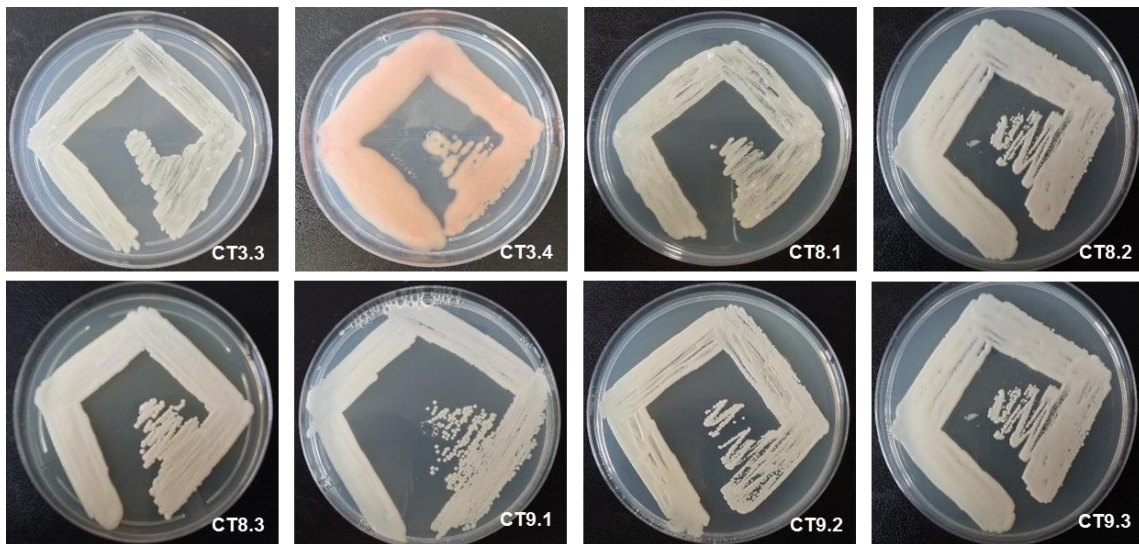


Figura 3. Morfología macroscópica de cepas aisladas de curtiembre Tungurahua. Se muestran fotografías de estrias compuestas de cada una de ella.

Tabla 4. Parámetros macroscópicos de cepas aisladas.

/YEAST COD	COLONY TEXTURE						COLONY APPEARANCE							COLONY COLOUR						COLONY MARGIN		
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J										K	L	M
IN1.3	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
IN3.4	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
IN5.1	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
IN5.4	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
IN5.5	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
IN5.6	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
IN5.9	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
IN6.2	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
IN6.6	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
IN7.1	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
IN7.3	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
IN7.5	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
IN7.6	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
IN7.7	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
IN7.8	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
IN7.9	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
IN7.10	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
CT3.3	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
CT3.4	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
CT8.1	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
CT8.2	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
CT8.3	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
CT9.1	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
CT9.2	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
CT9.3	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-

+: Presencia -: Ausencia

En cuanto a la caracterización microscópica se definió la forma celular de cada levadura. De las veinticinco levaduras aisladas se encontraron dieciocho con forma celular redonda lo que representaron un 72%, mientras las siete restantes, es decir, el 28% fueron ovaladas. Del resto de formas: limón, luna, triangular alantoides, campana, cilíndrica y fusiforme no se identificó ninguna cepa (Tabla 5), sin embargo se pueden evidenciar formas celulares que no coinciden con las anteriormente nombradas, dicha morfología corresponde a levaduras en plena división celular (Figura 4 y 5).

Tabla 5. Parámetros microscópicos de levaduras aisladas.

YEAST CODE	CELL SHAPE									
	N	O	P	Q	R	S	T	U	V	
IN 1.13	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
IN 3.4	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
IN 5.1	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
IN 5.4	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
IN 5.5	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
IN 5.6	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
IN 5.9	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
IN 6.2	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
IN 6.6	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
IN 7.1	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
IN 7.3	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
IN 7.5	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
IN 7.6	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
IN 7.7	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
IN 7.8	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
IN 7.9	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
IN 7.10	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
CT 3.3	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
CT 3.4	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
CT 8.1	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
CT 8.2	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
CT 8.3	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
CT 9.1	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
CT 9.2	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
CT 9.3	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-

+: Presencia -: Ausencia

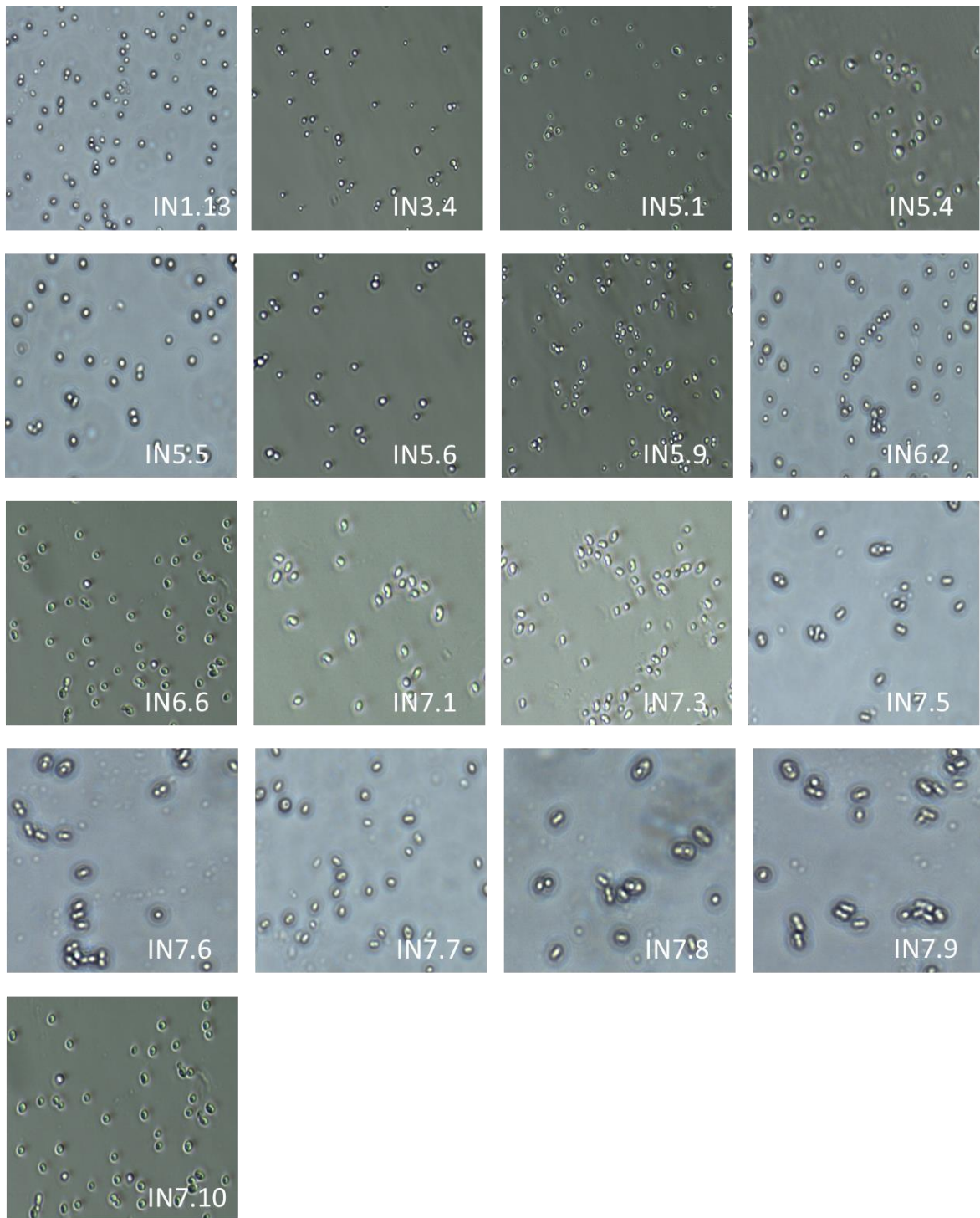


Figura 4. Morfología microscópica de levaduras aisladas de tenería Inca. Se observan fotografías bajo el microscopio de cada cepa de levadura aislada.

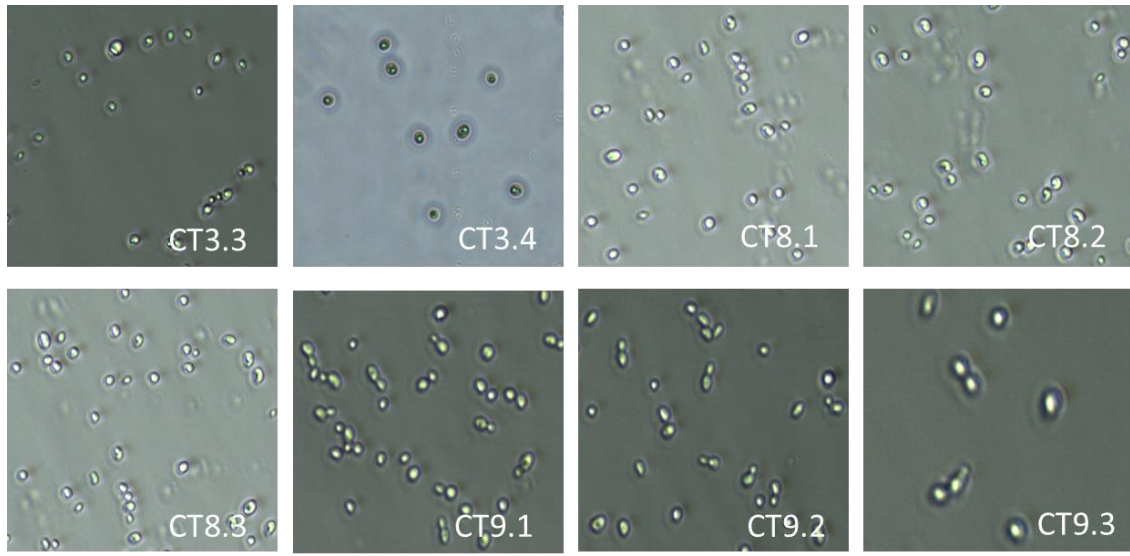


Figura 5. Morfología microscópica de levaduras aisladas de curtiembre Tungurahua. Se observan fotografías bajo el microscopio de cada cepa de levadura aislada.

4.1.3. AISLAMIENTO DE ADN GENÓMICO.

Se incluyó la identificación molecular como parte esencial del trabajo. Para lo cual se partió desde la extracción de ADN genómico de las veinticinco cepas aisladas. Mediante espectrofotometría se cuantificó la concentración ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) y pureza del ADN genómico extraído de las veinticinco levaduras (Tabla 6 y 7). La concentración de ácidos nucleicos se determinó a 260 nm, ya que los dobles anillos de las bases púricas y pirimídicas de las moléculas de ADN y ARN absorben luz ultravioleta en esta longitud de onda (**Martínez y Gragera, 2008**) y, en todos los casos fue mayor a 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

Tabla 6. Concentración y pureza del ADN genómico extraído de levaduras aisladas de tenería Inca.

Código	Concentración [µg/µl]	Pureza
IN 1.13	3.7	2.06
IN 3.4	2.7	1.77
IN 5.1	3.2	1.88
IN 5.4	2.8	1.91
IN 5.5	1.1	1.77
IN 5.6	4.2	2.01
IN 5.9	1.5	2.07
IN 6.2	3.6	1.98
IN 6.6	3.6	1.92
IN 7.1	1.9	1.87
IN 7.3	3.6	2.01
IN 7.5	3.6	1.92
IN 7.6	1.3	1.91
IN 7.7	1.4	1.77
IN 7.8	1.9	1.96
IN 7.9	1.8	1.93
IN 7.10	3.0	1.77

Tabla 7 Concentración y pureza del ADN genómico extraído de levaduras aisladas de curtiembre Tungurahua.

Código	Concentración [µg/µl]	Pureza
CT 3.3	2.1	1.98
CT 3.4	1.1	1.83
CT 8.1	11.3	1.74
CT 8.2	2.1	1.85
CT 8.3	4.2	1.89
CT 9.1	1.4	2.02
CT 9.2	1.2	1.82
CT 9.3	12.0	2.10

El cociente A_{260}/A_{280} proporciona un grado de pureza del ADN o ARN. Es considerado puro si está aproximadamente entre 1.8 y 2.0 (**Somma, s/f**). La mayoría de los valores de pureza correspondientes a ADN genómico extraído se encuentran dentro de tal rango, obteniéndose bandas visibles en los geles de agarosa (Figura 6).

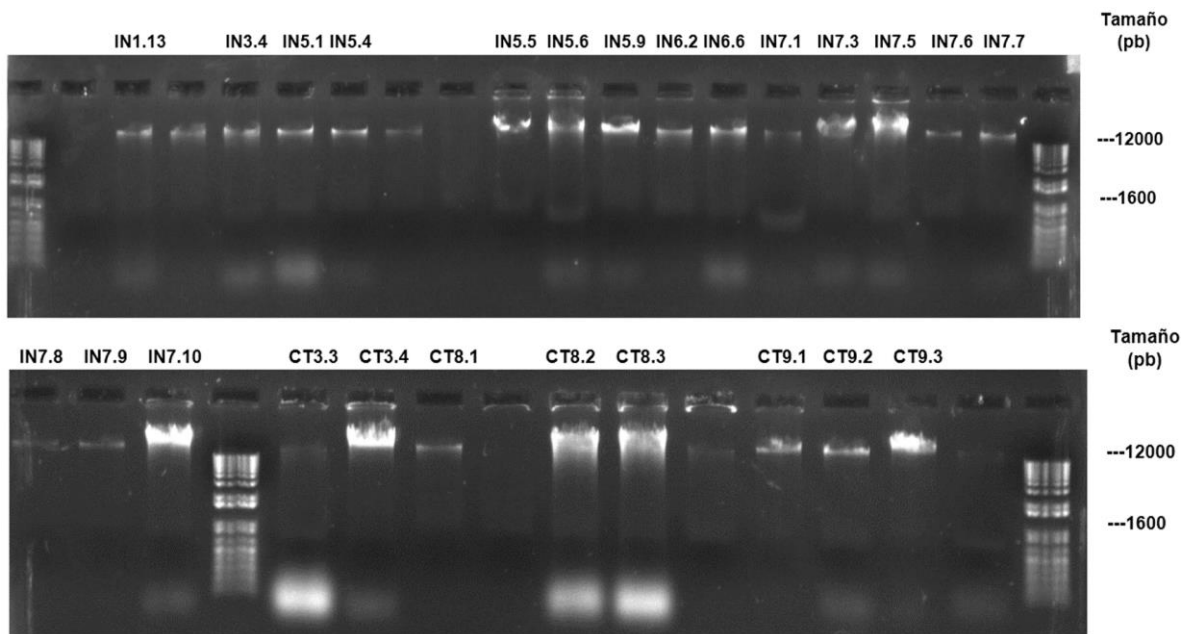


Figura 6. Electroforesis en geles de agarosa del ADN genómico extraído de las levaduras aisladas. Se utilizó un gel de agarosa al 0.9%. En la parte superior se muestra la codificación de cada cepa y a la derecha de la fotografía se indican los valores (pb) del ladder utilizado (1Kb).

Las bandas correspondientes a la extracción de ADN genómico se sitúan por encima de la primera banda de comparación (12 000 pb). El genoma de las levaduras comprende una cantidad de alrededor de doce millones de pares de bases, los tamaños obtenidos mediante electroforesis en geles de agarosa concuerdan con lo anteriormente dicho, mostrando que la extracción de ADN genómico ha resultado exitosa (**Pérez, 1997**).

4.1.4. AMPLIFICACIÓN DEL DOMINIO D1/D2.

Para la identificación de especies se realizó la amplificación del dominio D1/D2 del gen 26S rRNA, misma que está presente en todas las especies de levaduras pero con una elevada variabilidad, con diferencias entre especies de hasta una única base (**Orbera, 2004**). Esta región ha sido aplicada al estudio de la filogenia de diferentes grupos de levaduras, por lo cual es considerada como una herramienta importante en la identificación de estas especies (**González, 2014**).

Los productos amplificados por PCR del dominio D1/D2, visualizados en geles de agarosa, presentaron longitudes de bandas entre 600 y 650 pb. Veinticuatro de ellas se alinearon con el marcador molecular en 600 pb, y una de ellas IN 5.4 presentó una longitud alrededor de 650 pb (Figura 7). En cualquier caso, se pudo verificar el tamaño y pureza del ADN con el fin de su envío para secuenciación.

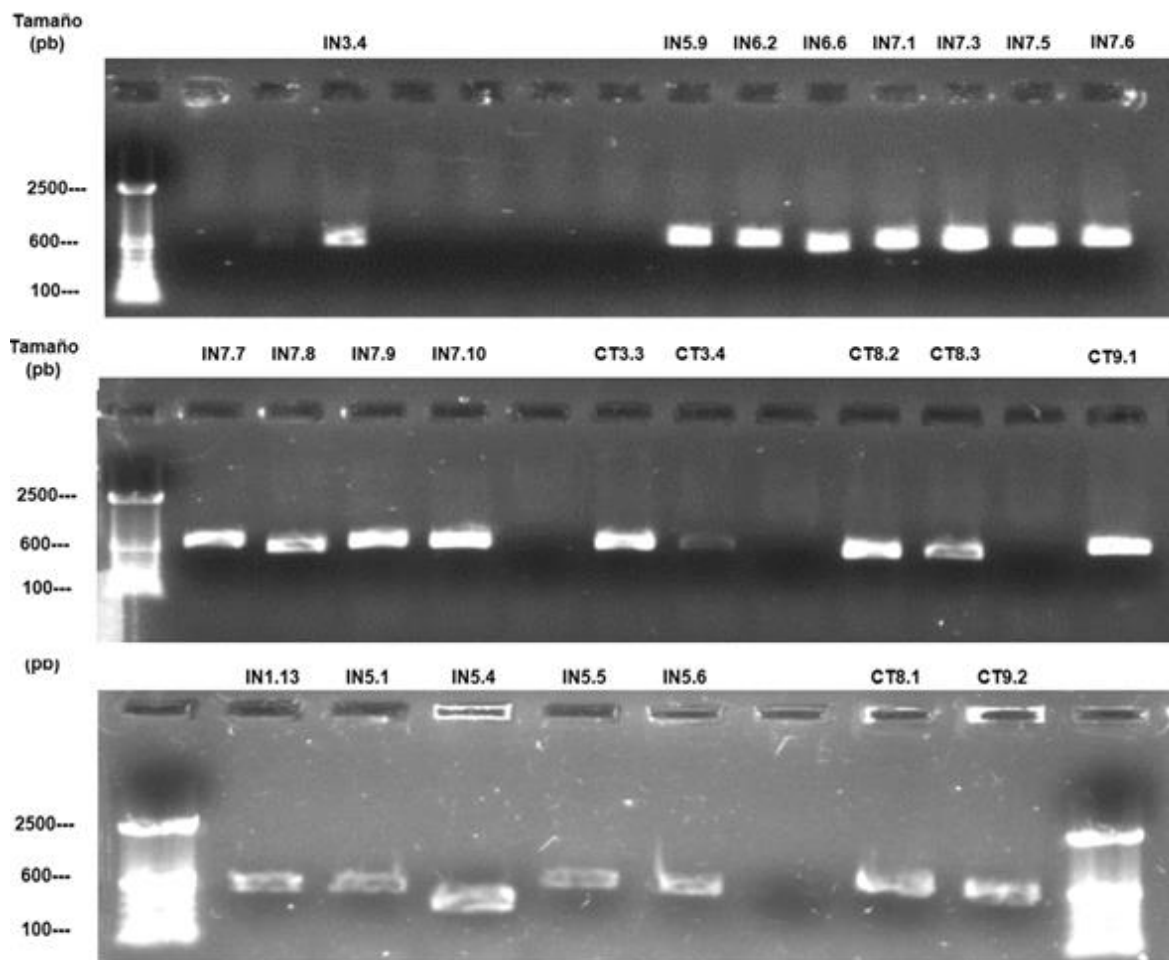


Figura 7. Electroforesis en geles de agarosa de los productos amplificados por PCR del dominio D1/D2. Codificación (arriba), ladder de comparación de 100 pb pares de bases (izquierda).

La secuenciación de los productos de PCR, del dominio D1/D2, permitió la identificación género-especie de las cepas aisladas. Mediante la comparación con otras secuencias registradas en la base de datos GenBank a través el software de alineamiento local, Blast (<http://ncbi.nlm.nih.gov>), del total de 25 cepas aisladas de ambas curtiembres, se identificaron 11 especies diferentes.

Tabla 8. Identificación género-especie de levaduras aisladas en tenería Inca.

Código	Especie según BLAST
IN 1.13	<i>Candida humilis</i>
IN 3.04	<i>Candida parapsilosis</i>
IN 5.1 – IN 7.1 – IN 7.7	<i>Candida maltosa</i>
IN 5.4 – IN 5.6 – IN 7.6 – IN 7.10	<i>Cryptococcus curvatus</i>
IN 5.5	<i>Candida palmioleophila</i>
IN 5.9	<i>Rhodospordium diobovatum</i>
IN 6.2	<i>Candida zeylanoides</i>
IN 6.6 – IN 7.8	<i>Yarrowia lipolytica</i>
IN 7.3 – IN 7.9	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>
IN 7.5	<i>Trichosporon otae</i>

Tabla 9. Identificación género-especie de levaduras aisladas en curtiembre Tungurahua.

Código	Especie según BLAST
CT 3.3	<i>Zygowillipsis californica</i>
CT 3.4	<i>Rhodospordium diobovatum</i>
CT 8.1 – CT 8.2 – CT 8.3	<i>Yarrowia lipolytica</i>
CT 9.1 – CT 9.2 – CT 9.3	<i>Cryptococcus curvatus</i>

En el caso de la tenería “El Inca”, la especie más frecuente fue *Cryptococcus curvatus*, de la que se aislaron 4 cepas (Tabla 8). Esta misma especie fue la más frecuente junto con *Yarrowia lipolytica* en el caso de la curtiembre Tungurahua, de las que se aislaron 3 cepas de cada una (Tabla 9).

4.1.5. ALINEAMIENTO Y ANÁLISIS FILOGENÉTICO.

El alineamiento (Anexo A) y análisis filogenético de las levaduras aisladas en ambas curtiembres, reveló una proporción mayor de especies pertenecientes al filo Ascomycota (64%) que al filo Basidiomycota (36%). En cuanto a órdenes filogenéticos, Basidiomycota se dividió en Sporidiobolales y Tremellales, con 2 especies cada uno. Respecto a Ascomycota, se divide exclusivamente en el orden Saccharomycetes (Figura 8).

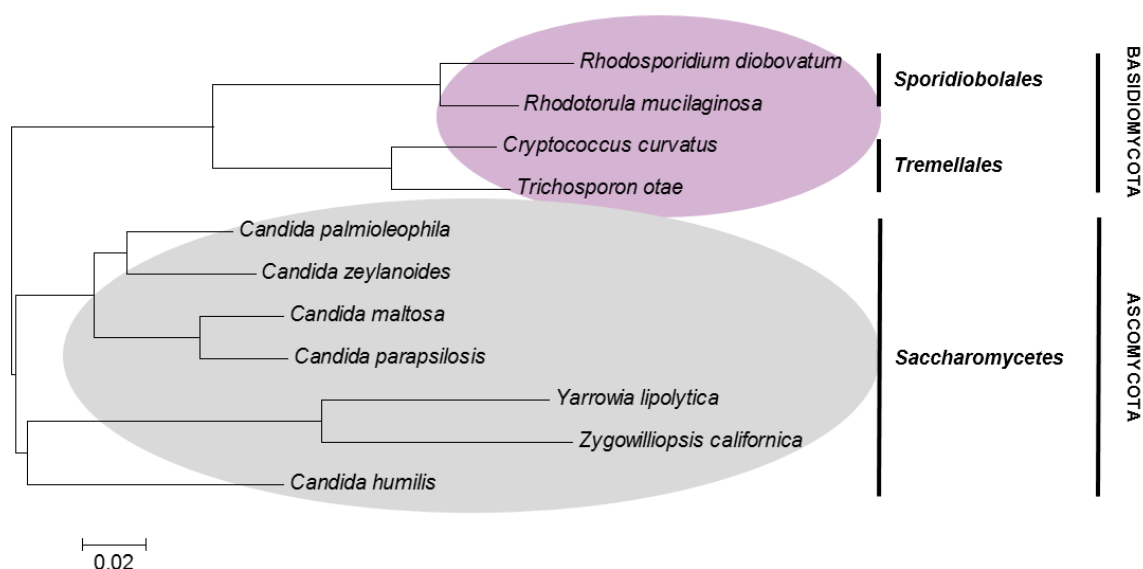


Figura 8. Análisis filogenético de las once especies aisladas. La barra de error corresponde a las sustituciones acumuladas cada 200 nucleótidos.

Las especies fúngicas aisladas de la curtiembre artesanal, se dividieron en 6 géneros, siendo el más representativo el género *Candida* con 5 especies: *Candida humilis*, *Candida parapsilosis*, *Candida maltosa*, *Candida palmioleophila* y *Candida*

zeylanoides. Respecto a las especies aisladas de la curtiembre industrializada, se dividieron en 4 géneros: Zygowilliopsis, Rhodosporidium, Yarrowia y Cryptococcus, con un representante cada uno. También se pudo apreciar que existen tres especies que fueron aisladas en las dos curtiembres *Rhodosporidium diobovatum*, *Cryptococcus curvatus* y *Yarrowia lipolytica*.

Sin embargo, si analizamos la diversidad de levaduras en cada curtiembre, pese a que en el caso de la artesanal, las proporciones de basidiomicetes y ascomicetes se mantiene con 40% y 60%, respectivamente, en el caso de la curtiembre industrializada, las proporciones se equiparan al 50%.

Además acotamos que los resultados obtenidos en este estudio en comparación con otras investigaciones, acerca de la biodiversidad de levaduras asociadas al proceso de curtido de pieles, prevalecen las especies pertenecientes al género *Cándida* (Villegas *et al.*, 2008; De Maria Guillen-Jimenez *et al.*, 2008).

4.1.6. TOLERANCIA POR ESTRÉS A Cr (VI).

Dada la utilización de sales cromadas a lo largo del proceso de curtido, tras la identificación y análisis filogenético de las especies fúngicas, se procedió a caracterizar a las mismas en función a la tolerancia al estrés generado por Cr (VI), cabe destacar que este experimento se realizó por triplicado (Figura 9).

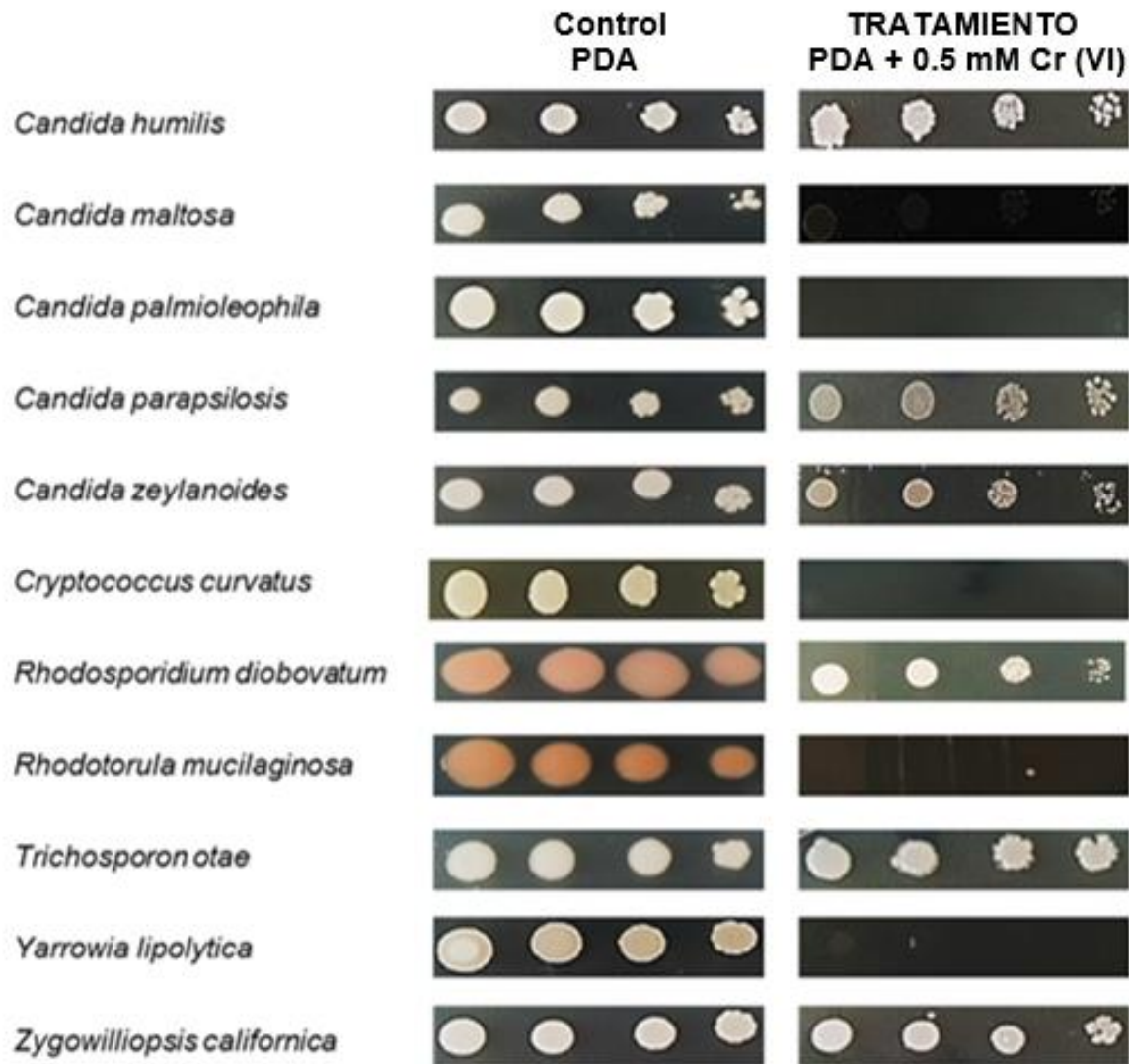


Figura 9. Crecimiento de once levaduras aisladas bajo tolerancia a estrés a Cr (VI). Cada cultivo fue sometido a diluciones seriadas, de las cuales se sembraron alícuotas de 2.5 μ l (10^4 , 10^3 , 10^2 y 10 células) en medio PDA (control) y en medio PDA suplementado con 0.5 mM de CrO_3 .

Atendiendo a los resultados obtenidos, podemos concluir que el 54% de las levaduras evaluadas presentan crecimiento en presencia del metal, mismas que están identificadas como *Candida parapsilosis*, *Candida zeylanoides*, *Rhodospiridium diobovatum*, *Candida humilis*, *Trichosporon otae* y *Zygowilliopsis californica*, acotamos que las tres últimas presentan mayor crecimiento en comparación con el testigo. Dichas levaduras se proponen como una alternativa

biológica, autóctona y limpia para la disminución de los niveles de Cr (VI) en ambientes con esta problemática.

Ksheminska et al., en 2005 reportaron a *Candida parapsilosis* como una especie de levadura capaz de crecer en presencia de Cr (VI), sin embargo, no existen estudios previos para *Candida zeylanoides*, *Rhodospordium diobovatum*, *Candida humilis*, *Trichosporon otae* y *Zygowilliopsis californica* por lo cual este supone el primer estudio que las relaciona con la tolerancia a este metal.

A pesar que en este experimento no se evidencio crecimiento por parte de las cepas *Candida maltosa* y *Yarrowia lipolytica* en presencia de Cr (VI), (**Fakuda et al., en 2008 y Ksheminska et al., en 2008**), aseveran que estas especies de levaduras toleran y reducen Cr (VI), poniendo de manifiesto el hecho de que distintas cepas de la misma especie pueden comportarse de manera diferente frente a la presencia de algún estrés.

4.2. VERIFICACIÓN DE HIPÓTESIS.

- **Hipótesis nula.**

Ho: No existen levaduras tolerantes a Cr (VI) asociadas a curtiembres tungurahuales.

- **Hipótesis alternativa.**

Ha: Si existen levaduras tolerantes a Cr (VI) asociadas a curtiembres tungurahuales.

Después de haber realizado el estudio del aislamiento e identificación de levaduras a partir de efluentes de curtiembres tungurahuales y su caracterización en función a la tolerancia a Cr (VI), se acepta la hipótesis alternativa, debido a que a través de los diferentes experimentos realizados, se demuestra que seis de las once levaduras evaluadas, es decir, el 54 % de estas presentan tolerancia al estrés por Cr (VI).

4.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

4.3.1. ANÁLISIS DE LA RESISTENCIA A Cr (VI) DE LAS LEVADURAS AISLADAS.

Tabla 10. Levaduras aisladas de tenería Inca, que crecieron en presencia del metal.

Especies	Control (PDA)	Tratamiento (PDA + Cr (VI) 0,5Mm)
<i>Candida humilis</i>	1	1
<i>Candida maltosa</i>	1	0
<i>Candida palmiophila</i>	1	0
<i>Candida parapsilosis</i>	1	1
<i>Candida zeylanoides</i>	1	1
<i>Cryptococcus curvatus</i>	1	0
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	1	0
<i>Trichosporon otae</i>	1	1
<i>Yarrowia lipolytica</i>	1	0

1: Crecimiento 0: Ausencia de crecimiento

Tabla 11. Análisis por frecuencias, de levaduras aisladas de tenería Inca tolerantes a Cr (VI).

Variable	Clase	MC	FA	FR
Ausencia de crecimiento	1	0	5	0,56
Presencia de crecimiento	2	1	4	0,44

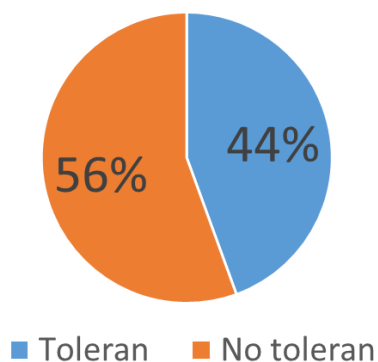


Figura 10. Distribución de levaduras aisladas de tenería Inca, que toleran Cr (VI).

El análisis por frecuencias de las levaduras aisladas de tenería Inca demuestra que la tolerancia a Cr (VI) por las mismas no es homogénea, debido a que 44% de estas presentan crecimiento en medio suplementado por el metal, por el contrario el 56% no demuestra crecimiento.

Tabla 12. Levaduras aisladas de curtiembre Tungurahua, que crecieron en presencia del metal.

Especies	Control (PDA)	Tratamiento (PDA + Cr (VI) 0,5Mm)
<i>Rhodosporidium diobovatum</i>	1	1
<i>Zygowilliopsis californica</i>	1	1

1: Crecimiento 0: Ausencia de crecimiento

Tabla 13. Análisis por frecuencias, de levaduras aisladas de curtiembre Tungurahua tolerantes a Cr (VI).

Variable	Clase	MC	FA	FR
Ausencia de crecimiento	1	0	0	0
Presencia de crecimiento	2	1	2	1

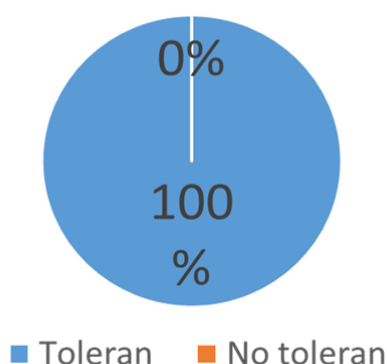


Figura 11. Distribución de levaduras aisladas de curtiembre Tungurahua, que toleran Cr (VI).

El análisis realizado en base al crecimiento de dos levaduras aisladas en curtiembre Tungurahua, demuestra que las dos crecen en presencia de Cr (VI).

Tabla 14. Frecuencia del crecimiento de las levaduras aisladas en ambas curtiembres.

Especies	Control (PDA)	Tratamiento (PDA + Cr (VI) 0,5Mm)
<i>Candida humilis</i>	1	1
<i>Candida maltosa</i>	1	0
<i>Candida palmiophila</i>	1	0
<i>Candida parapsilosis</i>	1	1
<i>Candida zeylanoides</i>	1	1
<i>Cryptococcus curvatus</i>	1	0
<i>Rhodospiridium diobovatum</i>	1	1
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	1	0
<i>Trichosporon otae</i>	1	1
<i>Yarrowia lipolytica</i>	1	0
<i>Zygowilliopsis californica</i>	1	1

1: crecimiento; 0: ausencia de crecimiento.

Tabla 15. Análisis por frecuencias, de levaduras tolerantes a Cr (VI) aisladas en ambas curtiembres.

Variable	Clase	MC	FA	FR
Ausencia de crecimiento	1	0	5	0,45
Presencia de crecimiento	2	1	6	0,55

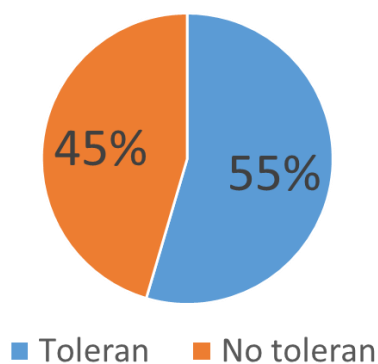


Figura 12. Distribución de levaduras aisladas en ambas curtiembres, que toleran Cr (VI).

El análisis estadístico, muestra las frecuencias acumuladas para las especies tolerantes y no tolerantes a la presencia de Cr (VI). Se determina que seis de las especies muestran tolerancia a este metal, debido a que observó crecimiento, estas especies representan un 55% del total de especies evaluadas en este experimento para ambas curtiembres. Además acotamos que existe una proporción mayor de especies tolerantes aisladas de la curtiembre artesanal.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. CONCLUSIONES.

- Mediante el aislamiento de levaduras asociadas a los efluentes de curtiembres, se determina que existe mayor diversidad de estos microorganismos, así como una mayor tolerancia a Cr (VI) en la curtiembre artesanal en comparación con la curtiembre industrializada. Además existe variabilidad en cuanto a la distribución de levaduras en los puntos de muestreo en ambas industrias, debido a que los valores de pH obtenidos, fue un factor influyente para este fin.
- Gracias a la identificación a nivel molecular de las levaduras aisladas, se establece que la biodiversidad de estas no fue homogénea. Además se destaca el dominio del género *Cándida*, lo que concuerda con otros estudios que demuestran mayor número de especies pertenecientes a este género, asociados al curtido de pieles.
- En la tolerancia a Cr (VI) de las levaduras aisladas, se evidencio que seis de las especies identificadas como *Candida parapsilosis*, *Candida zeylanoides*, *Rhodospordium diobovatum*, *Candida humilis*, *Trichosporon otae* y *Zygowilliopsis californica*, presentan crecimiento en presencia del metal, por lo que se proponen como cepas potencialmente aplicables en la industria biotecnológica.

5.2. RECOMENDACIONES.

- Ampliar el estudio sobre la remoción de Cr (VI) en ambientes contaminados, con el uso de las especies que presentan tolerancia al metal.
- Potenciar la aplicación biotecnológica de las levaduras aisladas.

BIBLIOGRAFÍA

Anand, P.; Isar, J.; Saran, S.; Saxena, R. (2006). Bioaccumulation of copper by *Trichoderma viride*. *Bioresource Technology*. 97(8), 1018-1025.

Baldrian, P.; Gabriel, J. (2002). Intraspecific variability in growth response to cadmium of the wood-rotting fungus *Piptoporus betulinus*. *Mycologia*. 94(3), 428-436.

Benejam, M.; Pujol, R. (2000). Reducción de la contaminación en la curtición al Cromo”, *Revista Ingeniería Química*, no. 365. 172-181

Bosnic, M.; Buljan, J.; Daniels, P.; Rajamani, S. (2003). Pollutants in tannery effluent. UNITED NATIONS INDUSTRIAL DEVELOPMENT ORGANIZATION (UNIDO); Technical Information on Industrial Processes. Viena.

Cordova, H.; Vargas, R.; Tellez, L.; Cesare, M.; Becker, R.; Figueroa, L. (2013). Influencia del uso de acomplejantes en el baño de curtido sobre la calidad final del cuero. *Scielo. Rev. Soc. Quím. Perú* vol.79 no.4 Lima

Chávez, A. (2010). Description of chrome toxicity from the tannery industry and possible ways of removing it. *Rev. ing. univ. Medellín* vol.9 no.17

CBS-KNAW (Fungal Biodiversity Center). (2015). Yeast species. Recuperado de: <http://www.cbs.knaw.nl/collections/BioLoMICS.aspx?Table=Yeasts%20species&Name=Candida%20sake&ExactMatch=T>

El-Latif Hesham, A.; Khan, S.; Liu, X.; Zhang, Y.; Wang, Z.; & Yang, M. (2006). Application of PCR-DGGE to analyse the yeast population dynamics in slurry reactors during degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in weathered oil. *Yeast* 23(12,) pp 879-887.

Fakuda, T.; Ishino, Y.; Ogawa, A.; Tsutsumi, K.; Morita, H. (2008). Cr (VI) reduction from contaminated soils by *Aspergillus* sp. N2 and *Penicillium* sp. N3 isolated from chromium deposits. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 54, 295-303

Gavrilescu, M. (2004). Removal of heavy metals from the by environment Biosorption. *Eng. Life Sci.* 4, 219-232.

Gonzales, A. (2014). Identificación molecular y métodos de conservación de levaduras y hongos filamentosos de muestras provenientes de Antártida. Universidad de la Republica. Departamento de Biociencias.

Guevara, D. (2010). Biorremoción de cromo (cromo total y cromo VI) en agua sintética por dos inóculos bacterianos nativos compuestos, a escala de laboratorio. Escuela Politécnica del Ejército. Departamento de Ciencias de la Vida. Ingeniería en Biotecnología.

Gutiérrez, F.; Espino, A.; Coreño, A.; Acevedo F.; Reyna G.; Fernández, F.; Tomasini A.; Wrobel, K. (2010). Mecanismos de interacción con cromo y aplicaciones biotecnológicas en hongos. *Rev latinoam Biotecnol Amb Algal* 1(1):47-63

Greenpeace. (2012). Cueros tóxicos; nuevas evidencias de contaminación de curtiembres en la Cuenca Matanza-Riachuelo. Greenpeace Argentina; Pp 27

Iram, S.; Zaman, A.; Iqbal, Z.; Shabbir, R. (2012). Heavy metal tolerance of fungus isolated from soil contaminated with sewage and industrial wastewater. Pol. J. Environ. Stud. Vol 22, N°3. 691-697

Khan, A. (2001). Relationships between chromium biomagnification ratio, accumulation factor, and mycorrhizae in plants growing on tannery effluent-polluted soil. Environment International. 26(5), 417-423

Ksheminska H.; Fedorovych D.; Honchar, T.; Ivash M.; Gonchar, M. Yeast Tolerance to Chromium Depends on Extracellular Chromate Reduction and Cr (III) Chelation. Food Technol. Biotechnol. 46 (4) 419–426

Ksheminska, H.; Fedorovych, D.; Babyak, L.; Yanovych, D.; Kaszycki, P.; Koloczek, H. (2005). Chromium (III) and (VI) tolerance and bioaccumulation in yeast: a survey of cellular chromium content in selected strains of representative genera. Process Biochemistry, 40(5), 1565-1572.

Ksheminska H.; Jaglarz A.; Fedorovych, D.; Babyak, D.; Yanovych, D.; Kaszycki P.; Koloczek, H. (2003). Bioremediation of chromium by the yeast *Pichia guilliermondii*: toxicity and accumulation of Cr (III) and Cr (VI) and the influence of riboflavin on Cr tolerance. Microbiol. Res. 158, 59–67

Mahbubul, S.; Saiful, I.; Majibur, R. (2012). Assessment of pollution caused by tannery-waste and its impact on aquatic bacterial community in Hajaribag, Dhaka. Stamford Journal of Microbiology. ISSN: 2074-5346

Martínez, R., & Gragera, R. (2008). Fundamentos teóricos y prácticos de la histoquímica. Recuperado de: https://books.google.com.ec/books?id=q5piMcoVEr4C&pg=PA527&lpg=PA527&dq=longitud+de+onda+a+la+que+absorb+en+los+%C3%A1cidos+nucleicos&source=bl&ots=gV_kLoP-QG&sig=3s8eq_IUJ67kjwhMVfqK-IrWPys&hl=es-419&sa=X&ved=0CD8Q6AEwBWoVChMI9uKx7bT5xglVi5INCh1JMgb9#v=onepage&q=longitud%20de%20onda%20a%20la%20que%20absorben%20los%20%C3%A1cidos%20nucleicos&f=false.

Medina, M. (2010). Determinación de Cr hexavalente en descargas de agua residuales de una curtiembre, ubicada en el sector de Izamba-Ambato en la provincia de Tungurahua, mediante espectrofotometría de absorción atómica. Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Facultad de Ciencia Exactas y Naturales. Escuela de Ciencias Químicas

Mera, R. 2010. Gestión Ambiental para minimizar la contaminación generada por la industria de curtiembre en el distrito de El Porvenir. Tesis, Universidad Nacional de Trujillo, Facultad de Ingeniería Agro Industrial. 120p.

Mwinyihija, M. (2010). Ecotoxicological diagnosis in the tanning industry. Springer Science & Business Media.

Orbera, T. (2004). Métodos moleculares de identificación de levaduras de interés biotecnológico. Rev Iberoam Micol 21: 15-19

Orbegozo, J.; Abanto, M.; García, R.; y Ramírez P. (2008). Identificación molecular de *Pichia guilliermondii* aislada de aguas ácidas de minas en el Perú y su resistencia a metales pesados. *Rev. peru biol.* v.15 n.2. ISSN 1727-9933

Panigatti, M.; Griffa, C.; Boglione, R.; Gentinetta F.; Cassina D. (2012). Uso de *Escherichia coli* para biorremediación de efluentes contaminados por cromo (VI). *Avances en Ciencias e Ingeniería* - ISSN: 0718-8706

Pérez, J. (1997). Organización Molecular del Genoma de Levadura. Universitat de Valencia e Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos, C.S.I.C. pp 100.

Ranganathan, k.; Kabadgi, S. (2010). Studies on Feasibility of Reverse Osmosis (Membrane) Technology for Treatment of Tannery Wastewater. *Journal of Environmental Protection*, 2, 37-46

Reichenauer, T.; Germida, J. (2008). Phytoremediation of organic contaminants in soil and groundwater. *ChemSusChem*. 1(8-9), 708-717.

Russo, G.; Libkind, D.; Sampaio, J.; VanBrock, M. (2008). Yeast diversity in the acidic Río Agrio-Lake Caviahue volcanic environment (Patagonia, Argentina). *FEMS Microbiol. Ecol* 65: 415–424.

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), pp 82-92.

Somma, M. (s/f). Análisis de la Presencia de Organismos Genéticamente Modificados en Muestras de Alimentos: Extracción y purificación de ADN. World
rtiduria

Tapia, J.; Freer, J.; Mansilla, H.; Villaseñor, J.; Bruhn, C.; Basualto, S. (2002). Estudio de reducción fotocatalizada de Cromo hexavalente. Bol. Soc. Chil. Quím. v.47 n.4. Bol. ISSN 0366-1644

Uribe, L. (2007). Caracterización fisiológica de levaduras aisladas de la filósfera de mora. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Microbiología Industrial. Bogota, D.C.

Villegas, L. B., P. M. Fernandez, et al. (2008). "Chromate removal by yeasts isolated from sediments of a tanning factory and a mine site in Argentina." Biometals 21(5): 591-600.

ANEXOS

Anexo A: Alineamiento filogenético de las once especies identificadas, asociadas a los efluentes de curtiembres tungurahueses.

CLUSTAL multiple sequence alignment by MUSCLE (3.8)

```

Yarrowia_lipolytica -----
Candida_humilis -----
Zygowilliopsis_californica -----
Candida_maltosa -----
Candida_parapsilosis -----
Candida_palmiophila -----
Candida_zeilanoidea -----
Rhodosporidium_diobovatum -----
Rhodotorula_mucilaginosa -----
Cryptococcus_curvatus -----
Trichosporon_otae GTGATTGCCATCTTGGCTTAAACTATATCCCATCAACACCTGTGAACCTGCTGATTGAAT

```

```

Yarrowia_lipolytica -----
Candida_humilis -----
Zygowilliopsis_californica -----
Candida_maltosa -----
Candida_parapsilosis -----
Candida_palmiophila -----
Candida_zeilanoidea -----
Rhodosporidium_diobovatum -----
Rhodotorula_mucilaginosa -----
Cryptococcus_curvatus -----
Trichosporon_otae CTTTATTGATTGATTTTACAAACATTGTGTAATGAACGTCATAACATTATAATAAAAAA

```

```

Yarrowia_lipolytica -----
Candida_humilis -----
Zygowilliopsis_californica -----
Candida_maltosa -----
Candida_parapsilosis -----
Candida_palmiophila -----
Candida_zeilanoidea -----
Rhodosporidium_diobovatum -----
Rhodotorula_mucilaginosa -----
Cryptococcus_curvatus -----
Trichosporon_otae AAACCTTTTAAACACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCGAAATGCGAT

```

```

Yarrowia_lipolytica -----
Candida_humilis -----
Zygowilliopsis_californica -----
Candida_maltosa -----
Candida_parapsilosis -----
Candida_palmiophila -----
Candida_zeilanoidea -----
Rhodosporidium_diobovatum -----
Rhodotorula_mucilaginosa -----
Cryptococcus_curvatus -----
Trichosporon_otae AAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCAACTTGCGCTCT

```

```

Yarrowia_lipolytica -----
Candida_humilis -----
Zygowilliopsis_californica -----
Candida_maltosa -----
Candida_parapsilosis -----
Candida_palmiophila -----
Candida_zeilanoidea -----
Rhodosporidium_diobovatum -----
Rhodotorula_mucilaginosa -----
Cryptococcus_curvatus -----
Trichosporon_otae CTGGTATTCGGAGAGCATGCCTGTTTGTGATGTCATGAAATCTCAACCATTAGGGTTTCT

```

```

Yarrowia_lipolytica -----
Candida_humilis -----
Zygowilliopsis_californica -----
Candida_maltosa -----
Candida_parapsilosis -----
Candida_palmiophila -----
Candida_zeilanoidea -----
Rhodosporidium_diobovatum -----
Rhodotorula_mucilaginosa -----

```



```

Cryptococcus_curvatus -----
Trichosporon_otae TAATGGCTTGGATTTGGACGTTGGCAGTTTACTGCCTCGTCTTAAAAAGAGTTAGCAAGTT

Yarrowia_lipolytica -----
Candida_humilis -----
Zygosporium_californica -----
Candida_maltosa -----
Candida_parapsilosis -----
Candida_palmiophila -----
Candida_zeilanoidea -----
Rhodosporidium_diobovatum -----
Rhodotorula_mucilaginosa -----
Cryptococcus_curvatus -----
Trichosporon_otae AACTATTGCTGCTGGCGTAATAAGTTTCGCTGGAAAGGCATTGTGAAGCGTCTCTAA

Yarrowia_lipolytica -----
Candida_humilis -----
Zygosporium_californica -----
Candida_maltosa -----
Candida_parapsilosis -----
Candida_palmiophila -----
Candida_zeilanoidea -----
Rhodosporidium_diobovatum -----
Rhodotorula_mucilaginosa -----
Cryptococcus_curvatus -----
Trichosporon_otae TCGTCTTCGGACAATTACTTTTGACTCTGGCCTCAAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAAC

Yarrowia_lipolytica --TGCATATCCAAAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATT---GCCTCAGTAACGG
Candida_humilis -----GCTCAGTA-CGG
Zygosporium_californica -----AAACCAACAGGGATT---GCCTCAGTAACGG
Candida_maltosa ---TGCATATCAATAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATT---GCCTTAGTAGCGG
Candida_parapsilosis -----GCCTTAGTAGCGG
Candida_palmiophila -----AGCGGAGGAAAAGGAAACCAACAGGGATT---GCCTTAGTAACGG
Candida_zeilanoidea -----GGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATT---GCCTCAGTAACGG
Rhodosporidium_diobovatum -----TAAGGGGTTTTCCCGCTAGTAGCGG
Rhodotorula_mucilaginosa ----GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATT---CCCTAGTAGCGG
Cryptococcus_curvatus -----GGATT---CCCTAGTAACGG
Trichosporon_otae TTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATT---CCNTAGTAACGG
* * * * *

Yarrowia_lipolytica CGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAACC-----CTCGGGATTG
Candida_humilis CGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGTA-C--CTTCGGT-GCCCGAGTTG
Zygosporium_californica CGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGCTGCTTTTTTAGTAGTCCGAGTTG
Candida_maltosa CGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGTA-C--TTTCAGT-GCCCGAGTTG
Candida_parapsilosis CGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGCA-C--TTTCAGT-GTCCGAGTTG
Candida_palmiophila CGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGCA-C--CTTCGGT-GTCCGAGTTG
Candida_zeilanoidea CGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAATCTAGCA-C--TTTCAGT-GTCCGAGTTG
Rhodosporidium_diobovatum CGAGCGAAGCGGAAAGAGCTCAAATTTATAATCTGGCA-C--CTTCGGT-GTCCGAGTTG
Rhodotorula_mucilaginosa CGAGCGAAGCGGAAAGAGCTCAAATTTATAATCTGGCA-C--CTTCGGT-GTCCGAGTTG
Cryptococcus_curvatus CGAGTGAAGCGGAAAGAGCTCAAATTTGAAATCTGGCAGT--CTTCGATTGTCGAGTTG
Trichosporon_otae CGAGTGAACCGGAAAGAGCTCAAATTTGAAATCTGGCTGT--CTTCGATAGTCCGAGTTG
* * * * *

Yarrowia_lipolytica TAATTTGAAGA-----TTTGGCATTGGAGAAGCTAACCCAAGTTGCTTGGAAATAGTA
Candida_humilis TAATTTGTAGAGGGCGAATTTGGGGCGG---TCCTTGTCTATGTTCTTGGAAACAGGA
Zygosporium_californica TAATTTGAAGAATAGATCCTTGGAGAGGC---GCCTTGTCTATGTTCTTGGAAACAGGA
Candida_maltosa TAATTTGAAGAAGGTATCTTTGGGCTGCG---CGCTTGTCTATGTTCTTGGAAACAGGA
Candida_parapsilosis TAATTTGAAGAAGGTATCTTTGGGCTGCG---CTCTTGTCTATGTTCTTGGAAACAGGA
Candida_palmiophila TAATTTGAAGAAGGTAACTTTGGGTTTGG---CTCTTGTCTATGTTCTTGGAAACAGGA
Candida_zeilanoidea TAATTTGAAGAAGGTAACTTTGGGTTTGG---CTCTTGTCTATGTTCTTGGAAACAGGA
Rhodosporidium_diobovatum TAATCTCTAGAA-GTGTTTTCCGCGTTGG---ACCGCACACAAGTCTGTTGGAATACAG
Rhodotorula_mucilaginosa TAATCTCTAGAA-ATGTTTCCGCGTTGG---ACCGCACACAAGTCTGTTGGAATACAG
Cryptococcus_curvatus TAATCTATAGAA-GTGTTTTCCGTCGCG---ACCATGTCTAAGTCCCTTGGAAATAGGG
Trichosporon_otae TAATCTATAGAA-GCGTTTCCGTCGCTGA---ACTGTGCTAAGTCCCTTGGAAACAGGG
* * * * *

Yarrowia_lipolytica CGTCATAGAGGGTGACAACCCCGTC--TGGCTAA---CCGTTCTCCATGTATTGCCCTTA
Candida_humilis CGTCATAGAGGGTGAGAATCCCGTC--TGGCGAGGAG-TGCGGTTCCGTTGTAAGCGCTC
Zygosporium_californica CGTCAGAGGGGTGAGAATCCCGTT--TGGCGAGGAG-TGCTGATCCCGTTAAGGGCTGT
Candida_maltosa CGTCACAGAGGGTGAGAATCCCGTC--CGATGAGATGATCCAGACCTATGTAAGTTCTCT
Candida_parapsilosis CGTCACAGAGGGTGAGAATCCCGTC--CGATGAGATGATCCAGACCTATGTAAGTTCTCT
Candida_palmiophila CGTCACAGAGGGTGAGAATCCCGTC--CGATGAGATG-CCCAATTTCTATGTAAGTTCTCT
Candida_zeilanoidea CGTCACAGAGGGTGAGAATCCCGTC--CGATGAGATG-CCCAATTTCTATGTAAGTTCTCT
Rhodosporidium_diobovatum CGGCATAG-TGGTGAACCCCGTATATGGTGGGACGCCAGCGCTTTGTGATACACTT

```



```

Rhodosporidium_diobovatum      GTG-T--TATAGCTTTCGGTTGGATACGCCCTGGGGGACTGAGGAACGCAGCGTGCCTT-
Rhodotorula_mucilaginosa       GTG-T--TATAGCTCTCTGCTGGATACATCTTGGGGGACTGAGGAACGCAGTGTGCCTT-
Cryptococcus_curvatus          GTG-T--TATAGCCTTTTATTGCATACATTGGGTGAGACTGAGGACTGCAGCTCGCCTTT
Trichosporon_otae              GTG-T--TATAGCCTAGTATCACATACACTGGGGGAGACTGAGGACTGCAGCTCGCCTTT
                                ** * * * * *
                                * *

Yarrowia_lipolytica            -----CGACGACATAATCCACCCATTTACCC
Candida_humilis                -----TCGTCAAGGATGCTGGCATAATGGTTATATGCCGCC
Zygowilliopsis_californica    -----ATTTTGCCTAGGATGCTGGCGTAATGATCTAATATCGCCC
Candida_maltosa                -----TTTATTACCTAGGATGTTGGCATAATGATCTTAAGTCGCC
Candida_parapsilosis          -----TTCGGCCTAGGATGTTGGCATAATGATCTTAAGTCGCC
Candida_palmioloephila        -----TTT---GACTAGGATGCTGGCATAATGATCTTATACGCC
Candida_zeilanoideis          -----TTT---GACTAGGATGCTGGCGTAATGATCTTAAGCCGCC
Rhodosporidium_diobovatum     -TTGCGAAAGACTCGTCTTTTTTACGCTTAGGATGCTGGTGGAAATGGCTTTAAACGACCC
Rhodotorula_mucilaginosa      -TGGCGGGGTTTCGACCTCTTCACACTTAGGATGCTGGTGGAAATGGCTTTAAACGACCC
Cryptococcus_curvatus         ATGGCCGGGTTTCGCCACGTTTCGAGCTTAGGATGTTGACATAATGGCTTTAAACGACCC
Trichosporon_otae            -TGGCCGGGTTTCGCCACGTTTCGAGCTTAGGATGTTGACATAATGGCTTTAAACGACCC
                                * * * * *

Yarrowia_lipolytica            GTCTTGAAACCACGGAC-CA-----
Candida_humilis                GTCTTGAAACCACGGAC-CA-----
Zygowilliopsis_californica    GTCTTGAAA-CACGGAC-CAAG-----
Candida_maltosa                GTCTTGAAA-CACGGAC-CA-----
Candida_parapsilosis          GTCTTGAAA-CACGGAC-CA-----
Candida_palmioloephila        GTCTTGAAA-CACGGAC-CA-----
Candida_zeilanoideis          GTCTTGAAA-CACGGAC-CA-----
Rhodosporidium_diobovatum     GTCTTGAAACAACGGACACA-----
Rhodotorula_mucilaginosa      GTCTTGAAA-CACGGAC-CA-----
Cryptococcus_curvatus         GTCTTGAAA-CACGGAC-CTCCTGTGTGAAGTGATCCGCTA
Trichosporon_otae            GTCTTGAAA-CACG-----
                                ***** **

```