



**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 canal de riego Latacunga - Salcedo - Ambato.**

---

**Autora:** Nancy Elizabeth Quinaluisa Calvopiña

**Tutora:** Ph.D. Gloria Serrano Bueno

Ambato – Ecuador

Marzo 2016

**PhD. Gloria Serrano Bueno**

**CERTIFICA:**

Que el presente trabajo de titulación ha sido prolijamente revisado. Por lo tanto autorizo la presentación de este Trabajo de Titulación modalidad 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, Nancy Elizabeth Quinaluisa Calvopiña, 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.



---

Srta. Nancy Elizabeth Quinaluisa Calvopiña  
C.I. 050293190-0  
**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



---

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

Ambato, 12 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.



---

Nancy Elizabeth Quinaluisa Calvopiña  
C.I. 050293190-0  
**AUTORA**

## AGRADECIMIENTO

Mi más sincero agradecimiento a Gloria Serrano por su apoyo incondicional, paciencia, constancia y amistad. Gracias por todo lo aprendido en el transcurso de esta investigación.

## ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS

### PÁGINAS PRELIMINARES

Portada.....	I
Aprobación por el tutor.....	II
Declaración de Autenticidad.....	III
Aprobación de los miembros de tribunal de grado .....	IV
Derechos de Autor.....	V
Agradecimiento.....	VI

### TEXTO

#### CAPÍTULO I

##### EL PROBLEMA

1.1. Tema de la investigación .....	5
1.2. Justificación .....	5
1.3. Objetivos.....	6
1.3.1. Objetivo general .....	6
1.3.2. Objetivos específicos .....	6

#### CAPÍTULO II

##### MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes investigativos.....	7
2.2. Hipótesis .....	9
2.2.1 Resistencia de levaduras aisladas del CRLSA al estrés por metales pesados. ....	9
2.2.2 Supervivencia de levaduras aisladas del CRLSA tras un tratamiento con metales pesados. ....	9
2.3. Señalamiento de variables de la hipótesis.....	9

## **CAPÍTULO III**

### **MATERIALES Y MÉTODOS**

3.1. Materiales .....	11
3.2. Métodos .....	11
3.2.1. Cultivo de levaduras en medio sólido.....	11
3.2.2. Cultivo de levaduras en medio líquido.....	11
3.2.3. Tratamiento con metales pesados.....	12
3.2.4. Resistencia al estrés por metales pesados de las levaduras.....	12
3.3. Diseño experimental.....	13

## **CAPÍTULO IV**

### **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

4.1. Análisis y discusión de los resultados.....	14
4.1.1. Análisis de la resistencia a estrés por metal pesado de levaduras aisladas del CRLSA.....	14
4.1.2. Viabilidad celular de levaduras tras un tratamiento con metales pesados.....	23
4.1.3. Influencia de la concentración de cadmio en el CRLSA frente a la diversidad y tolerancia a este metal de levaduras .....	25
4.2. Verificación de hipótesis .....	27
4.2.1. Resistencia de levaduras aisladas del CRLSA al estrés por metales pesados .....	27
4.2.2. Supervivencia de levaduras aisladas del CRLSA tras un tratamiento con metales pesados.....	28

## **CAPÍTULO V**

### **CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

5.1. Conclusiones .....	32
5.2. Recomendaciones .....	33



## **MATERIALES DE REFERENCIA**

Referencias bibliográficas.....	34
Anexos.....	41

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I. Concentraciones de sales de metal pesado.....	12
Tabla II. Parámetros bioquímicos del canal de riego LSA.....	26
Tabla III. Crecimiento en presencia de metales pesados de levaduras aisladas del CRLSA.....	27
Tabla IV. Valor calculado para la prueba X <sup>2</sup> y valor <i>p</i> .....	28
Tabla V. Cuadro de análisis de varianza para la supervivencia a Cd de <i>Cryptococcus faraegula</i> .....	28
Tabla VI. Prueba de Tukey para la supervivencia a Cd de <i>Cryptococcus faraegula</i> .....	29
Tabla VII. Cuadro de análisis de varianza para la supervivencia a Cd de <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> .....	30
Tabla VIII. Prueba de Tukey para la supervivencia a Cd de <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> .....	30

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Árbol filogenético obtenido mediante análisis “Neighbour-joining” del dominio D1/D2 del gen 26S RNA.....	4
Figura 2. Crecimiento de las especies de levaduras aisladas del CR LSA en presencia de diferentes metales pesados (Cd, Cr, Ni, Pb, Zn).....	15
Figura 3. Crecimiento de las especies de levaduras aisladas del CRLSA en presencia de Cadmio.....	17
Figura 4. Crecimiento de las especies de levaduras aisladas del CRLSA en presencia de Cromo.....	19
Figura 5. Crecimiento de las especies de levaduras aisladas del CRLSA en presencia de Níquel.....	20
Figura 6. Crecimiento de las especies de levaduras aisladas del CRLSA en presencia de Plomo.....	21
Figura 7. Crecimiento de las especies de levaduras aisladas del CRLSA en presencia de Zinc.....	23
Figura 8. Capacidad de supervivencia de <i>Cryptococcus faraegula</i> a diferentes concentraciones de Cd en función del tiempo.....	24
Figura 9. Capacidad de supervivencia de <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> a diferentes concentraciones de Cd en función del tiempo.....	25
Figura 10. Porcentaje de supervivencia de <i>Cryptococcus faraegula</i> a diferentes concentraciones de Cd.....	29
Figura 11. Porcentaje de supervivencia de <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> a diferentes concentraciones de Cd.....	30

## RESUMEN EJECUTIVO

El canal de riego Latacunga – Salcedo – Ambato (CRLSA) abastece importantes áreas agropecuarias de las provincias de Cotopaxi y Tungurahua, cuyos productos son distribuidos a lo largo de todo el Ecuador. La proximidad de los volcanes Tungurahua y Cotopaxi, unido a los vertidos al canal de curtiembres, industrias textiles, aguas servidas, mataderos, fábricas, hospitales y producto de actividades agrícolas, hacen de este ecosistema, un espacio susceptible a la contaminación por metales pesados.

El análisis de resistencia de levaduras autóctonas de este canal al estrés por metales pesados usando una concentración preliminar de 0.2 y 2 mM mostró una elevada resistencia a Zn (100% de las especies) y a Pb (76.92%). Por el contrario, el Cd fue el metal pesado menos tolerado, ya que solo el 53,85 % de las especies fúngicas mostraron crecimiento en presencia de 0.2mM del metal. En cuanto a las cepas de levadura, cinco de ellas mostraron tolerancia a todos los metales pesados sometidos a estudio, *Pichia kluyveri*, *Candida oleophila*, *Pichia fermentans*, *Cystofilobasidium infirmominiatum* y *Metschnikowia pulcherrima*. A pesar de que solo siete cepas de levaduras fueron resistentes a 0.2mM de Cd, dos de ellas (*Cryptococcus faraegula* y *Rhodotorula mucilaginosa*) resistieron concentraciones elevadas de hasta 2 mM de este metal en un segundo experimento de crecimiento en gota.

El análisis de la contaminación por Cd del CRLSA demostró que este ecosistema extremo, actúa como nicho perfecto para organismos caracterizados por su capacidad de adaptación a condiciones limitantes.

**Palabras clave:** Resistencia, metales pesados, canal de riego, levaduras.

## ABSTRACT

The Latacunga – Salcedo – Ambato irrigation channel (LSAIC) supplies important agricultural areas in the Cotopaxi and Tungurahua provinces, in which products are distributed all throughout Ecuador. The proximity of the Tungurahua and Cotopaxi volcanoes jointed to the discharges of the canal for tanneries, textile industries, wastewaters, slaughterhouses, factories, hospitals, and agricultural products, make this ecosystem susceptible space for contamination by heavy metals.

The resistance analysis of native yeasts of this channel to heavy metal stress using a preliminary concentration of 0.2 and 2 mM showed a high resistance to Zn (100% of the species) and Pb (76.92%). On the contrary, Cd was the most tolerated heavy metal, since only 53.85% of fungal species showed growth in the presence of 0.2mM of the metal. Five of yeast strains showed tolerance to all heavy metals under study, *Pichia kluyveri*, *Candida oleophila*, *Pichia fermentans*, *Cystofilobasidium infirmominiatum* and *Metschnikowia pulcherrima*. Although, only seven yeast strains were resistant to 0.2mM of Cd (*Cryptococcus faraegula* and *Rhodotorula mucilaginosa*), two of them resisted high concentrations of 2 mM of this metal in a second drop growth experiment.

The analysis of contamination by Cd, in the LSAIC, showed that this extreme ecosystem acts as perfect niche for organisms characterized by their ability to adapt limiting conditions.

## INTRODUCCIÓN

Una de las principales características de la sociedad actual es el elevado grado de desarrollo tecnológico e industrial que presenta. Los aspectos positivos derivados de este importante nivel de desarrollo son claros, sin embargo, no se deben dejar de lado las evidentes consecuencias negativas coligadas. Una de las más significativas es la contaminación, tanto por compuestos orgánicos como por contaminantes de naturaleza inorgánica, entre estos últimos, los más destacados debido a su resistencia a la biodegradación son los metales pesados (**Sarma et al., 2011**).

La contaminación de entornos naturales por metales pesados es actualmente una de las preocupaciones ambientales más importantes, ya que representan una amenaza para el medio ambiente y la salud pública debido, principalmente, a su toxicidad, acumulación en la cadena alimentaria y persistencia en la naturaleza. En cierta medida, la presencia de este tipo de elementos tiene un origen natural: procesos de meteorización, incendios, erupciones volcánicas, transporte aéreo de partículas, etc., contribuyendo al incremento de metales pesados en diferentes nichos ecológicos (**MacKenzie y Canil, 2008, Shcherbov et al., 2008, Balabanova et al., 2011**). No obstante, son las actividades antropogénicas tales como la agricultura, la minería, la eliminación de residuos o vertidos por parte de diferentes industrias, las principales responsables de la acumulación en cantidades no deseables de una gran variedad de metales (**Cordero et al., 2005**). Debido a la cercanía de dos volcanes activos como Tungurahua y Cotopaxi, además de las intensas actividades industriales y agropecuarias, el CRLSA se convierte en un ecosistema muy susceptible a la contaminación por metales pesados, por lo cual se hace imprescindible la búsqueda de alternativas encaminadas a la remoción de esta contaminación (**CESA, 2003**).

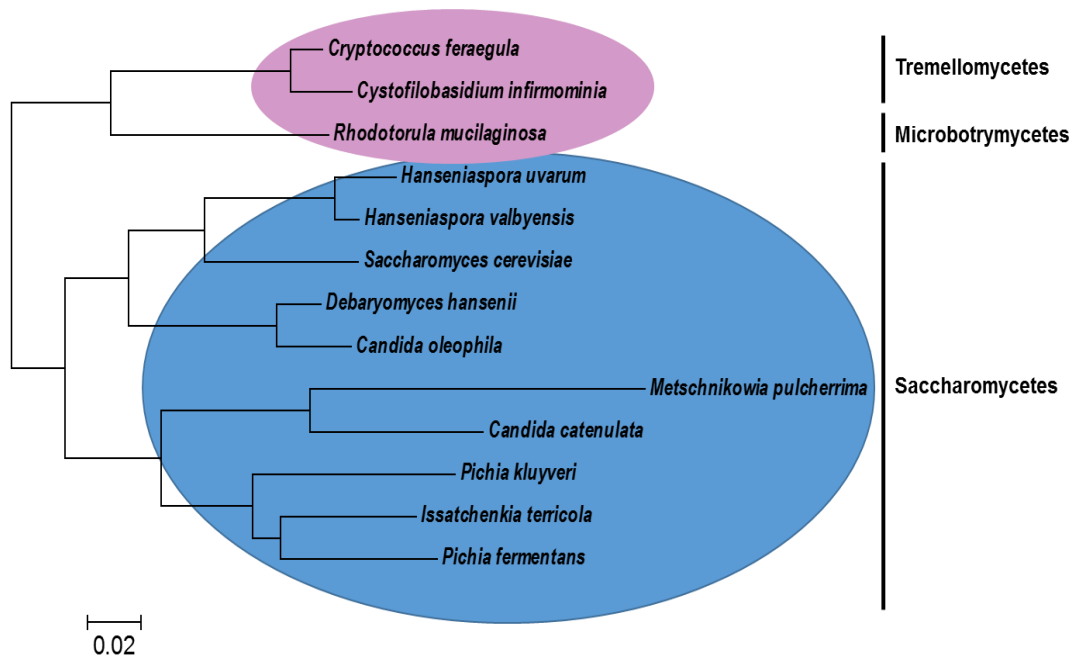
Desde que se han reconocido los serios problemas de la acumulación de metales en ambientes naturales, son diversos los métodos aplicados encaminados a disminuir esta contaminación. Diferentes técnicas de

separación, tales como la precipitación diferencial o el intercambio iónico, se han descrito en detalle, pero la mayoría de ellos no son viables a escala industrial, debido a que requieren un estricto control de los parámetros fisicoquímicos de las soluciones a tratar, o simplemente por su alta relación costo-efectividad (**Gavrilescu, 2004, Wang y Chen, 2009**). El descubrimiento de que muchos sistemas biológicos no son víctimas de la toxicidad por metales pesados, sino agentes activos de la movilización de metal, cambió radicalmente esta imagen y abrió la oportunidad de explorar la importancia y su potencial en el campo biotecnológico. Los metales no son sólo la fuente de energía para un importante número de microorganismos, sino también un requisito absoluto para muchas actividades enzimáticas que utilizan metales como cofactores, es así que se han desarrollado nuevas tecnologías para la remoción de contaminantes como la biorremediación, la misma que representa una alternativa sustentable y de bajo costo para la rehabilitación de ambientes afectados por contaminantes naturales y antropogénicos (**Singh y Jain, 2003, Reichenauer y Germida, 2008**). Las técnicas biológicas muestran considerables ventajas sobre los métodos tradicionales como: disminución de la contaminación secundaria, simplicidad de operación a bajas concentraciones de metales y aumento de la eficacia con respecto al costo (**Croteau et al., 2005, Lone et al., 2008**). Entre los microorganismos más utilizados en este tipo de procesos se incluyen bacterias, cianobacterias, hongos filamentosos, levaduras y microalgas (**Malik, 2004, Massaccesi et al., 2002, Perez-Rama et al., 2002**). Los hongos filamentosos y levaduras están considerados por diversos autores, como los microorganismos más adecuados para este tipo de biorremediación. Esta consideración se debe, entre otros, a que poseen una elevada tolerancia hacia los metales, son un grupo versátil que puede adaptarse y crecer en condiciones adversas de pH, temperatura, salinidad y escasa disponibilidad de nutrientes; adicionalmente, poseen la ventaja de contar con una pared celular con excelentes propiedades de unión a metales (**Khan, 2001, Baldrian y Gabriel, 2002, Gavrilescu, 2004, Anand et al., 2006**). El uso de la biorremediación para el tratamiento de ecosistemas contaminados es una tecnología relativamente nueva, aún en desarrollo, por

lo cual, la información acerca de microorganismos capaces de degradar metales pesados es escasa, por esta razón es necesario realizar un estudio previo acerca de la capacidad de resistencia a estos contaminantes que poseen las cepas de interés.

El desarrollo de técnicas de biorremediación para aguas contaminadas con metales pesados es una prioridad en Ecuador, debido a las industrias en crecimiento con las que cuenta el país de las cuales se descargan este tipo de contaminantes en sus aguas residuales, dado que no han recibido un tratamiento adecuado. Se hace necesario entonces, buscar soluciones eficientes utilizando levaduras propias de Ecuador, adecuadas al contexto socio-económico y ambiental de países en desarrollo aprovechando la amplia biodiversidad existente en el país (**Howard, 2000**). La biodiversidad de levaduras asociadas al CRLSA se determinó molecularmente en una investigación previa. Tras el análisis filogenético, las especies se dividieron en los filos Basidiomycota con 3 representantes, y Ascomycota con 10 representantes (Figura 1). Cabe destacar que las 10 especies incluidas en el filo Ascomycota corresponden a un único orden filogenético: Saccharomycetes. Respecto a las especies del filo Basidiomycota, *Cryptococcus fereaegula* y *Cystofilobasidium infimominia* pertenecen al orden Tremellomycetes, mientras que *Rhodotorula mucilaginosa* pertenece al orden Microbotrymycetes.





**Figura 1. Árbol filogenético obtenido mediante análisis “Neighbour-joining” del dominio D1/D2 del gen 26S RNA.** La barra de error corresponde a las sustituciones acumuladas cada 200 nucleótidos. Los grupos sombreados corresponden a los filos Basidiomiceta (rosa) y Ascomiceta (azul).

Con la presente investigación se pretende analizar la resistencia al estrés por metales pesados de levaduras previamente aisladas del CRLSA, con el fin de obtener una colección de cepas con potencial para ser utilizadas en biorremediación de ambientes contaminados con metales pesados.

# **CAPÍTULO I**

## **EL PROBLEMA**

### **1.1. Tema de la investigación**

**Análisis de la resistencia a estrés por metales pesados de levaduras aisladas del canal de riego Latacunga – Salcedo - Ambato.**

### **1.2. Justificación**

El CRLSA abastece importantes áreas agropecuarias de las provincias de Cotopaxi y Tungurahua, cuyos productos son distribuidos a lo largo de todo el Ecuador. La proximidad de los volcanes Tungurahua y Cotopaxi, unido a los vertidos al canal de curtiembres, industrias textiles, aguas servidas, mataderos, fábricas, hospitales y producto de actividades agrícolas, hacen de este ecosistema, un espacio susceptible a la contaminación por metales pesados.

Los ecosistemas contaminados normalmente se convierten en importantes nichos ecológicos para especies biológicas con alta capacidad de resistencia al estrés generado por cada tipo de contaminación. Entre estas especies destacan los microorganismos como hongos filamentosos y levaduras los cuales se adaptan eficientemente a ecosistemas extremos, dado que son un grupo versátil que puede adaptarse y crecer en condiciones adversas de pH, temperatura, salinidad, escasa disponibilidad de nutrientes o contaminación química, como presencia de metales pesados.

Las importaciones de material biológico para tratamientos de biorremediación en el país, principalmente en actividades petroleras, es consecuencia de las escasas investigaciones de cepas autóctonas, capaces de reducir la contaminación en el ecosistema. No puede haber un cambio de

la matriz productiva en el Ecuador si no se explota adecuadamente la biodiversidad del país en beneficio del mismo. Surge entonces la necesidad de buscar soluciones eficientes y económicas para reducir la contaminación por metales pesados, empleando material biológico propio de Ecuador.

### **1.3. Objetivos**

#### **1.3.1. Objetivo general**

Determinar la capacidad de resistencia a estrés por metales pesados de levaduras aisladas del CRLSA.

#### **1.3.2. Objetivos específicos**

1. Evaluar la tolerancia a estrés por Cadmio (Cd) de levaduras aisladas del CRLSA.
2. Evaluar la tolerancia a estrés por Cromo (Cr) de levaduras aisladas del CRLSA.
3. Evaluar la tolerancia a estrés por Níquel (Ni) de levaduras aisladas del CRLSA.
4. Evaluar la tolerancia a estrés por Plomo (Pb) de levaduras aisladas del CRLSA.
5. Evaluar la tolerancia a estrés por Zinc (Zn) de levaduras aisladas del CRLSA.
6. Evaluar la supervivencia de levaduras aisladas del CRLSA tras el tratamiento con metales pesados.

## CAPÍTULO II MARCO TEÓRICO

### 2.1. Antecedentes investigativos

Se denominan microorganismos extremófilos a aquellos que se adaptan a la vida en condiciones extremas como aguas termales (termófilos), ecosistemas polares (psicrófilos), lagos alcalinos (alcalófilos), lagos de sal naturales o artificiales (halófilas), y aguas de mina ácidas o manantiales sulfurosos (acidófilos) **(Rothschild & Mancinelli, 2001)**. La investigación de ambientes extremos es de interés, tanto desde el punto de vista académico, como biotecnológico. Desde el punto de vista académico, estos estudios están contribuyendo a ampliar la evaluación de la diversidad microbiana en el planeta, mientras que, en el campo biotecnológico, son importantes para la búsqueda de nuevos biocatalizadores tales como extremoenzimas o nuevas estrategias de biorremediación **(Brierley et al., 1989; Gupta et al., 2000; Herbert, 1992; Sharp & Munster, 1986; Watanabe, 2002)**. La mayoría de microorganismos extremófilos son procariontes, sin embargo, los recientes avances en técnicas moleculares y su posterior aplicación en el campo de la microbiología, han revelado la diversidad de microorganismos eucariotas asociados a numerosos entornos, incluyendo ecosistemas extremos **(Caron et al., 2004)**.

Entre los eucariotas extremófilos autótrofos destacan las algas fotosintéticas como las algas verdes acidófilas correspondientes a los géneros *Chlamydomonas* y *Dunaliella* **(Zettler, 2003)** además de las algas rojas *Galdieria maxima* y *Cyanidium caldarium* **(Doemel, 1971; Moreira, 1994)**. Aunque en menor medida, existen estudios que identifican eucariotas heterótrofos ligados a ecosistemas extremos. Entre estos últimos destacan las levaduras y hongos filamentosos debido a las propiedades estructurales y fisiológicas propias de estos microorganismos que les permiten soportar condiciones limitantes **(Boguslawska-Was et al., 2001)**. Un Ejemplo de levadura extremófila halófila es *Debaryomyces spp*, que puede crecer en medios que contienen concentraciones hasta de 4 M de NaCl **(Onishi,**

**1963**). Así mismo se han aislado levaduras de ecosistemas acidófilos como del Lago Caviahue (Argentina) y de las minas de Río Tinto (España) (**Gadanho et al., 2006, Russo et al., 2008**).

El fuerte aumento del nivel de contaminación del medio ambiente por metales pesados causó gran interés al estudio de microorganismos resistentes a estos contaminantes, es así que se han realizado diversos estudios poniendo especial interés en levaduras. Entre otros, **Norris y Kelley** en **1979** estudiaron el grado y selectividad de captación de metal por especies vivas de varias levaduras. *Rhodotorula mucilaginosa* acumuló un nivel relativamente alto de Cobre (Cu) (0,225 mmol Cu/g células) e incluso *Candida utilis* acumuló (0,18 mmol Cu/g células), mientras que tres especies de *Saccharomyces* acumularon cobre en el mismo rango que *S. crevisiae* (0,163 mmol Cu/g células).

El cadmio ha sido reportado como uno de los tres metales más tóxicos, razón por la cual es de particular interés conocer aquellos microorganismos resistentes al mismo. *S. uvarium* y *C. utilis* se reportaron (**Norris & Kelley, 1979**) para acumular aproximadamente 0,13 mmol Cd/g. *S. cerevisiae* ha sido examinado recientemente para absorción de cadmio, acumulando 0,16 mmol Cd/g (**Volesky et al., 1993**), sin embargo, fue menor que la observada para el hongo *Rhizopus arrhizus* (**Tobin et al. 1984**).

Las investigaciones acerca de levaduras con potencial de tolerancia y remoción de metales pesados, son aún escasas, por lo que no se pueden aplicar técnicas de biorremediación, se hace necesario entonces un estudio previo de la resistencia a estrés por metales pesados de levaduras encaminadas a la remoción de estos contaminantes.

## **2.2. Hipótesis**

### **2.2.1 Resistencia de levaduras aisladas del CRLSA al estrés por metales pesados.**

#### **Hipótesis Nula**

No existen levaduras resistentes al estrés por metales pesados en el CRLSA.

#### **Hipótesis Alternativa**

Existen levaduras resistentes al estrés por metales pesados en el CRLSA.

### **2.2.2 Supervivencia de levaduras aisladas del CRLSA tras un tratamiento con metales pesados.**

#### **Hipótesis Nula**

Las levaduras existentes en el CRLSA no son viables tras un tratamiento con metales pesados.

#### **Hipótesis Alternativa**

Las levaduras existentes en el CRLSA son viables tras un tratamiento con metales pesados.

## **2.3. Señalamiento de variables de la hipótesis**

### **Evaluación de la resistencia a estrés por metales pesados de levaduras aisladas del CRLSA**

- Crecimiento de levaduras en medio de cultivo sólido.
- Crecimiento de levaduras en medio de cultivo líquido.
- Evaluación por espectrofotometría según las estimaciones mediante O.D.<sub>600</sub>.

- Crecimiento de levaduras empleando el método de goteo en placa en presencia de concentraciones crecientes de metales pesados.
- Evaluación del crecimiento de levaduras en presencia de metales pesados.

### **Análisis de la supervivencia de levaduras aislada del CRLSA tras el tratamiento con metales pesados**

- Crecimiento de levaduras en medio de cultivo sólido.
- Crecimiento de levaduras en medio de cultivo líquido
- Crecimiento de levaduras en medio de cultivo líquido suplementado con metales pesados.
- Cultivo de 300 células de levaduras en medio de cultivo sólido previa evaluación por espectrofotometría según las estimaciones mediante O.D.<sub>600</sub>.
- Evaluación 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); nitrato de cadmio tetrahidratado ( $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ), (Merck, Alemania), acetato de plomo trihidratado ( $\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Pb} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ), (Baker Analyzed®, USA); cloruro de níquel hexahidratado ( $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ), (May & Baker, Inglaterra), 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).

#### **3.2. Métodos**

##### **3.2.1. Cultivo de levaduras en medio sólido**

Las levaduras previamente aisladas del CRLSA se dejaron crecer en medio de cultivo sólido PDA ( $\text{g L}^{-1}$ : almidón de papa 4.0; dextrosa 20.0; agar 15.0) en estría compuesta en un incubador (Mettler, Alemania) por un período de 48 horas a 20 °C ( $\pm 2$  °C).

##### **3.2.2. Cultivo de levaduras en medio líquido**

El cultivo de levaduras en medio líquido se realizó en caldo YM ( $\text{g L}^{-1}$ : glucosa 20.0; extracto de levadura 3.0; extracto de malta 3.0) trasladando su biomasa desde un cultivo en medio sólido a tubos microbiológicos con 3 ml de caldo, se dejaron crecer por un período de 24 horas a 20 °C ( $\pm 2$  °C) con agitación constante de 150 r.p.m. en un incubador shaker (New Brunswick, USA).



### 3.2.3. Tratamiento con metales pesados

Los medios de cultivo se suplementaron con sales de Cadmio (Cd), Cromo (Cr), Níquel (Ni), Plomo (Pb) y Zinc (Zn) a concentraciones entre 0.2 y 20mM como se resume a continuación:

Tabla I. Concentraciones de sales de metal pesado

Metal pesado	Sal de metal pesado	Concentración (mM)		
<b>Cd</b>	Cd(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	0.2	1	2
<b>Cr</b>	CrCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	2	10	20
<b>Ni</b>	NiCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	2	10	20
<b>Pb</b>	CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> Pb.3H <sub>2</sub> O	2	10	20
<b>Zn</b>	ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	2	10	20

### 3.2.4. Resistencia al estrés por metales pesados de las levaduras

#### 3.2.4.1. Método de goteo en placa

Para evaluar la resistencia de levaduras previamente aisladas del CRLSA al estrés por metales pesados, se empleó el método de goteo en placa (**Serrano-Bueno et al., 2013**). Se realizó un ensayo previo de goteo a una concentración de 0.2 mM para todos los metales a excepción del Cd para el cuál se partió con una concentración de 0.2mM. Se crecieron las levaduras en medio de cultivo YM en un incubador shaker a 150 r.p.m. durante 24 horas a 20 °C (± 2 °C). A continuación se estimó la concentración de células presentes mediante espectrofotometría (Hach, USA) a una O.D.<sub>600</sub>, se realizaron diluciones seriadas en agua estéril a 10, 10<sup>2</sup>, 10<sup>3</sup> y 10<sup>4</sup> células/ml con el fin de alcanzar una Abs<sub>600</sub> de 0.0004, 0.004, 0.04 y 0.4 respectivamente. Finalmente, se sembraron 2,5 µl de cada una de las diluciones sobre placas Petri con medio PDA suplementado con las distintas sales de metal pesado y se incubaron a 20 °C (± 2 °C), tomando como control positivo placas Petri con medio PDA.

Para las levaduras resistentes en este ensayo preliminar de metal pesado, se realizó el mismo experimento sometiénolas a concentraciones crecientes de metal como se muestra en el apartado anterior.

#### **3.2.4.2. Determinación de la viabilidad celular**

La supervivencia celular se determinó como la capacidad de formar colonias a partir de células individuales (unidades formadoras de colonias, UFCs) tras el tratamiento con Cd en función del tiempo (**Serrano-Bueno et al., 2013**). Inicialmente se crecieron las levaduras en medio de cultivo YM en un incubador shaker a 150 r.p.m. durante 24 horas a 20 °C ( $\pm 2$  °C), seguidamente se suplementó el medio con nitrato de cadmio hasta alcanzar concentraciones de 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 y 1mM; y se dejó crecer por un período de 24 horas a las mismas condiciones. Finalmente, se sembraron aproximadamente 300 células de levadura tomadas del medio líquido suplementado con el metal pesado según las estimaciones mediante O.D.<sub>600</sub>, en placas con medio sólido PDA y se incubaron a 20 °C por un período de 48 horas. Se usó como control levaduras que no fueron sometidas al tratamiento con Cd. La supervivencia se calculó como el porcentaje de colonias formadas a partir del número de células inoculadas inicialmente.

#### **3.3. Diseño experimental**

Todos los experimentos planteados en este proyecto de trabajo de titulación se realizaron por triplicado. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba no paramétrica Chi-cuadrado ( $X^2$ ) con  $p \leq 0.05$ , además de un diseño experimental de un solo factor.

## CAPÍTULO IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. Análisis y discusión de los resultados

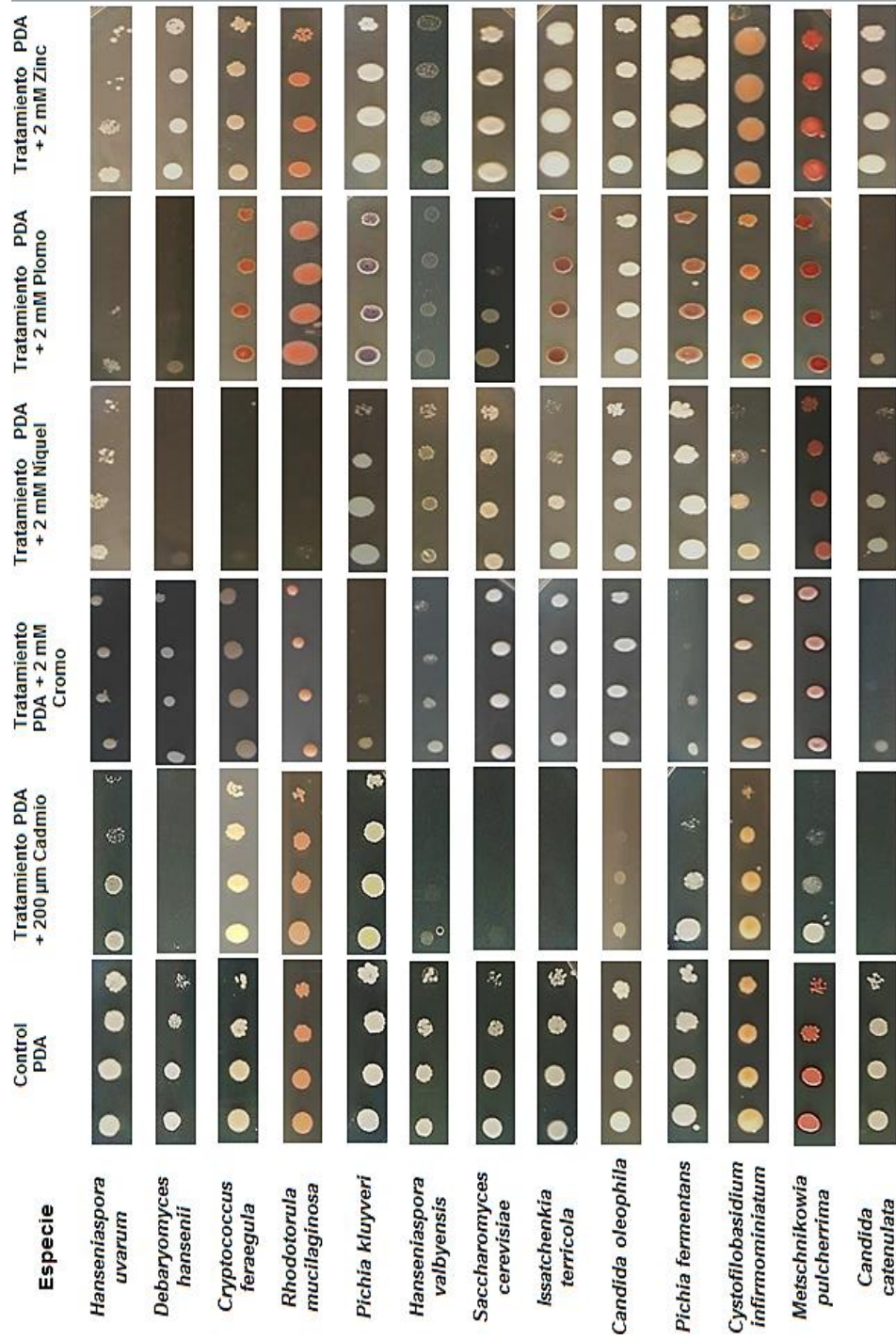
#### 4.1.1. Análisis de la resistencia a estrés por metal pesado de levaduras aisladas del CRLSA

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

Con el fin de reconocer las cepas resistentes al estrés por Cd, Cr, Ni, Pb y Zn se realizó un ensayo preliminar de crecimiento en gota en presencia de dichos metales para las levaduras aisladas previamente del CRLSA (Figura 2).

Como se muestra en los diferentes goteos existe una amplia tolerancia a estrés por los metales pesados sometidos a análisis, por parte de las levaduras aisladas del CRLSA. Esta situación era esperada dada la alta susceptibilidad de este canal a la contaminación por metales pesados, unida al hecho de que los ecosistemas extremos actúan como nichos perfectos para organismos caracterizados por su capacidad de adaptación a condiciones limitantes (**Mueller et al., 2005, Sittenfeld et al., 2002**).

Respecto al tipo de metal pesado, se comprobó una alta tolerancia por parte de las levaduras autóctonas de este canal al estrés generado por Zn (100% de la especies) y Pb (76.92 %). Por el contrario, el Cd fue el metal pesado menos tolerado, ya que solo el 53,85 % de las especies fúngicas mostraron crecimiento en presencia de 200  $\mu$ M del metal.



**Figura 2. Crecimiento de las especies de levaduras aisladas del CR LSA en presencia de diferentes metales pesados (Cd, Cr, Ni, Pb, Zn).** Cada cultivo fue sometido a diluciones seriadas, de las cuales se sembraron alícuotas de 2,5  $\mu$ l ( $10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$  y 10 células) en medio PDA (control) y en medio PDA suplementado con las distintas concentraciones de metales pesados. Las fotografías se tomaron tras 2 días de incubación a 20°C.

En cuanto a las cepas de levadura, cinco de ellas mostraron tolerancia a todos los metales pesados sometidos a estudio, *Pichia kluyveri*, *Candida oleophila*, *Pichia fermentans*, *Cystofilobasidium infirmominiatum* y *Metschnikowia pulcherrima*. En el caso de *M. pulcherrima* existen estudios previos que reportan su alta tolerancia a Cd, Ni, Pb y Zn (**Vadkertiova & Slavikova, 2006**) de igual manera para *P. fermentans* se reporta tolerancia a Cd y Cr (**Breierová et al., 2002, Ksheminska et al., 2005**), sin embargo, en los otros tres casos, este supone el primer trabajo que los relaciona con la tolerancia a estrés por metales pesados.

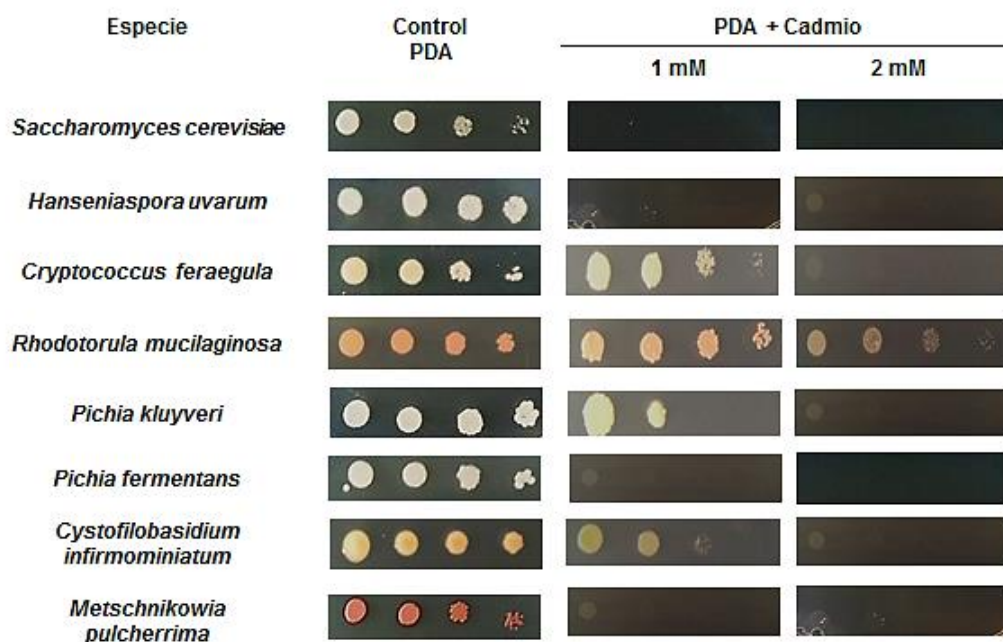
#### **4.1.1.2. Crecimiento de levaduras en presencia de concentraciones crecientes de metales pesados**

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

#### **4.1.1.3. Crecimiento de levaduras en presencia de concentraciones crecientes de Cd**

Diversos microorganismos han sido reconocidos por su capacidad para tolerar diversas concentraciones de Cd, entre los cuales se han reportado bacterias como *Variovorax paradoxus*, *Rhodococcus sp.* y *Flavobacterium sp.* (**Belimov et al., 2005**). Sin embargo, estudios recientes reportan a las levaduras como microorganismos versátiles que se adaptan a condiciones extremas, por lo cual son capaces de tolerar eficientemente concentraciones de metales pesados como el Cd, tal es el caso de *S. uvarium* y *C. utilis* que demostraron tolerar aproximadamente 0,13 mM Cd (**Norris & Kelley, 1979**). Así como *S. cerevisiae* que ha sido examinado recientemente reportando que tolera concentraciones de Cd hasta de 0,16 mM (**Volesky et al., 1993**).

Con el fin de analizar las cepas de levaduras resistentes al estrés por Cd, se realizó un segundo ensayo de crecimiento en gota en el que se aumentó hasta diez veces la concentración tolerada inicialmente por las levaduras, es así que las cepas se hicieron crecer en presencia de 1 y 2 mM de Cd (Figura 3).



**Figura 3. Crecimiento de las especies de levaduras aisladas del CRLSA en presencia de Cadmio.** Cada cultivo fue sometido a diluciones seriadas, de las cuales se sembraron alícuotas de 2,5  $\mu$ l ( $10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$  y 10 células) en medio PDA (control) y en medio PDA suplementado con nitrato de cadmio. Las fotografías se tomaron tras 4 días de incubación a 20°C.

Los resultados del goteo en placa muestran resistencia parcial a 1 mM de Cd por parte de las levaduras *Pichia Kluyveri* y *Cystofilobasidium infirmominiatum*, sin embargo, el crecimiento más evidente se observa en *Cryptococcus faraegula* y *Rhodotorula mucilaginosa*.

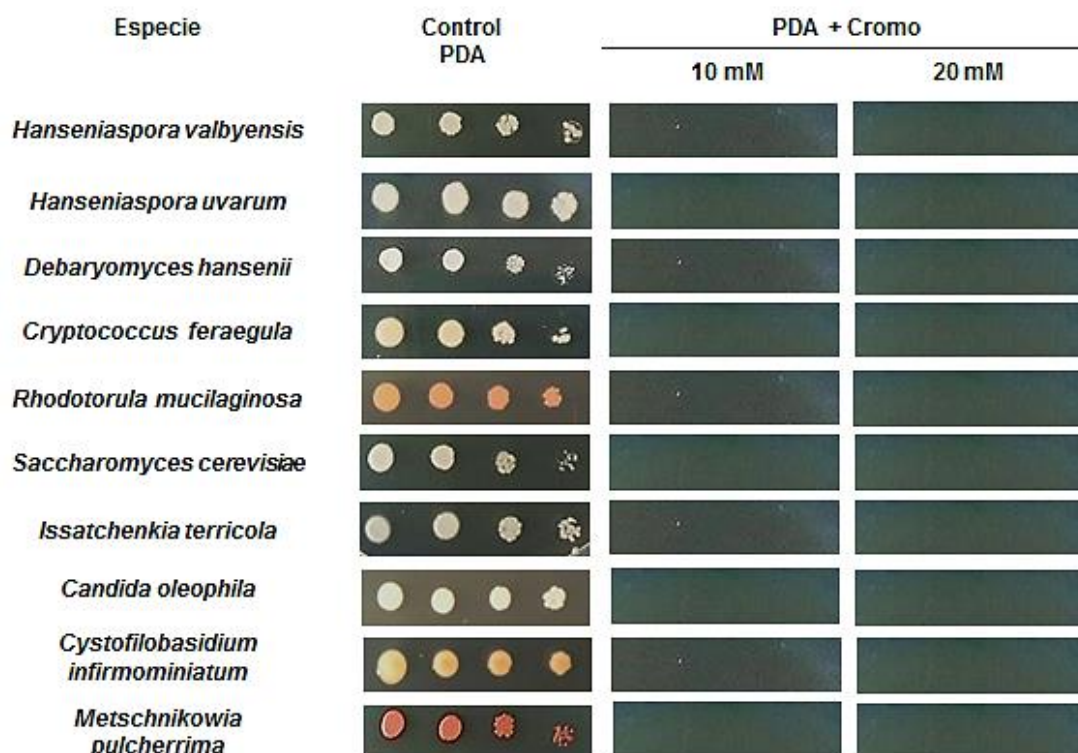
El estrés generado a 2mM de Cd fue tolerado notablemente solo por *Rhodotorula mucilaginosa* convirtiéndose así en una especie fúngica de interés investigativo en cuanto a remoción de este contaminante. No existen investigaciones previas que asocien a *Rhodotorula mucilaginosa* con la resistencia a 2mM de Cd por lo cual este supone el primer estudio.

#### 4.1.1.4. Crecimiento de levaduras en presencia de concentraciones crecientes de Cr

Los procesos industriales como la minería, preservación de madera, soldadura, fabricación de cemento, industria de pinturas, industria del cuero, industria fotográfica, industria galvánica y producción de acero inoxidable constituyen la primera fuente de emisión de Cr al ambiente (**Cuberos et al., 2009**). El proceso del curtido del cuero es una de las principales actividades industriales que generan contaminación por Cr. En el trayecto del CRLSA existen numerosas curtiembres que desembocan este tipo de contaminante al canal.

Un estudio semejante se realizó en Guanajuato (México), donde se aisló e identificó a *Candida maltosa* de las aguas residuales de una curtiduría, reportando que esta levadura toleraba concentraciones de cromato tan altas como 100 mg/ml semejante a *Rhodospiridium*. Además de este rasgo fenotípico, la cepa *C. maltosa* mostró capacidad para reducir el Cr (VI) (**Ramírez et al., 2004**). Otra especie de *Candida* fue aislada de una planta de tratamiento de aguas residuales que recibe los residuos de las industrias de curtiembres en Italia. Esta cepa fue altamente resistente a Cr (VI) creciendo en concentraciones de hasta 10 mM (**Baldi et al., 1990**).

Las nueve levaduras que mostraron inicialmente mayor resistencia a 2mM de cromo fueron expuestas a 10 y 20 mM de cloruro crómico en un segundo experimento de crecimiento en gota, tomando como control negativo a *Hanseniaspora valbyensis* (Figura 4). Los resultados obtenidos muestran que ninguna cepa fue capaz de tolerar este estrés a pesar de que fueron aisladas de un nicho ecológico muy susceptible a la contaminación por este metal.



**Figura 4. Crecimiento de las especies de levaduras aisladas del CRLSA en presencia de Cromo.** Cada cultivo fue sometido a diluciones seriadas, 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 cloruro de cromo (III). Las fotografías se tomaron tras 4 días de incubación a 20°C.

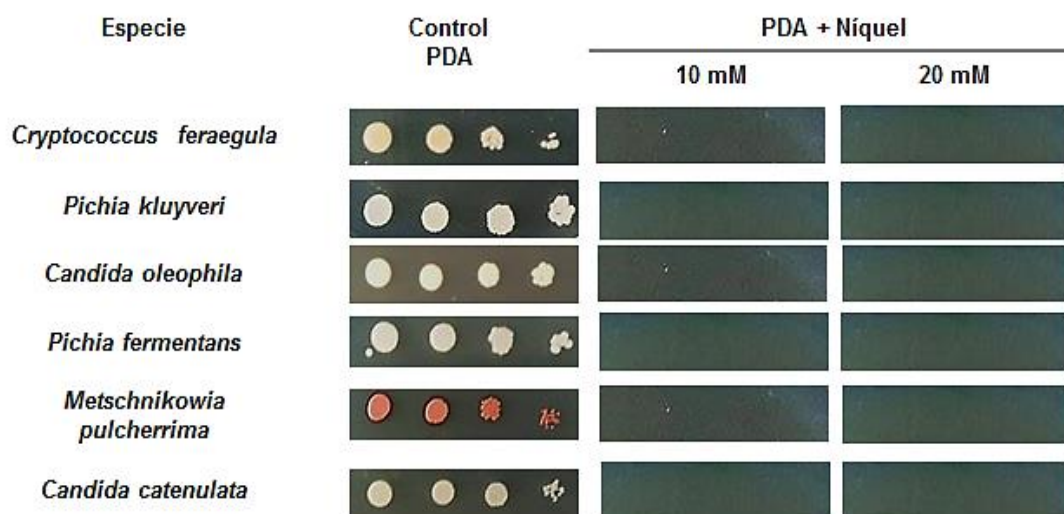
#### 4.1.1.5. Crecimiento de levaduras en presencia de concentraciones crecientes de Ni

El níquel es uno de los contaminantes presentes en las descargas de la industria minera, de la fundición, refinación de elementos metálicos y de diferentes tipos de industrias que utilizan este metal como materia prima. Su presencia, tanto en las aguas residuales utilizadas para riego, como en lodos residuales utilizados como fertilizantes o mejoradores del suelo, es una de las causas de la contaminación en suelos y plantas (**Brown et al., 1988**). A pesar de que son escasos los estudios de levaduras capaces de tolerar Níquel **Ross** en **1994** ha reportado a *Candida utilis* como una levadura capaz de resistir hasta 3mM de  $Ni^{2+}$  aseverando que los ecosistemas



contaminados con este metal son el mejor lugar para aislar microorganismos resistentes al mismo.

*Pichia kluyveri*, *Candida oleophila*, *Pichia fermentans*, *Metschnikowia pulcherrima* y *Candida catenulata* se crecieron en medio de cultivo suplementado con 10 y 20mM de cloruro de níquel (Figura 5). Estas cepas a pesar de su eficiente crecimiento a 2mM de níquel no toleraron el estrés a concentraciones más altas.

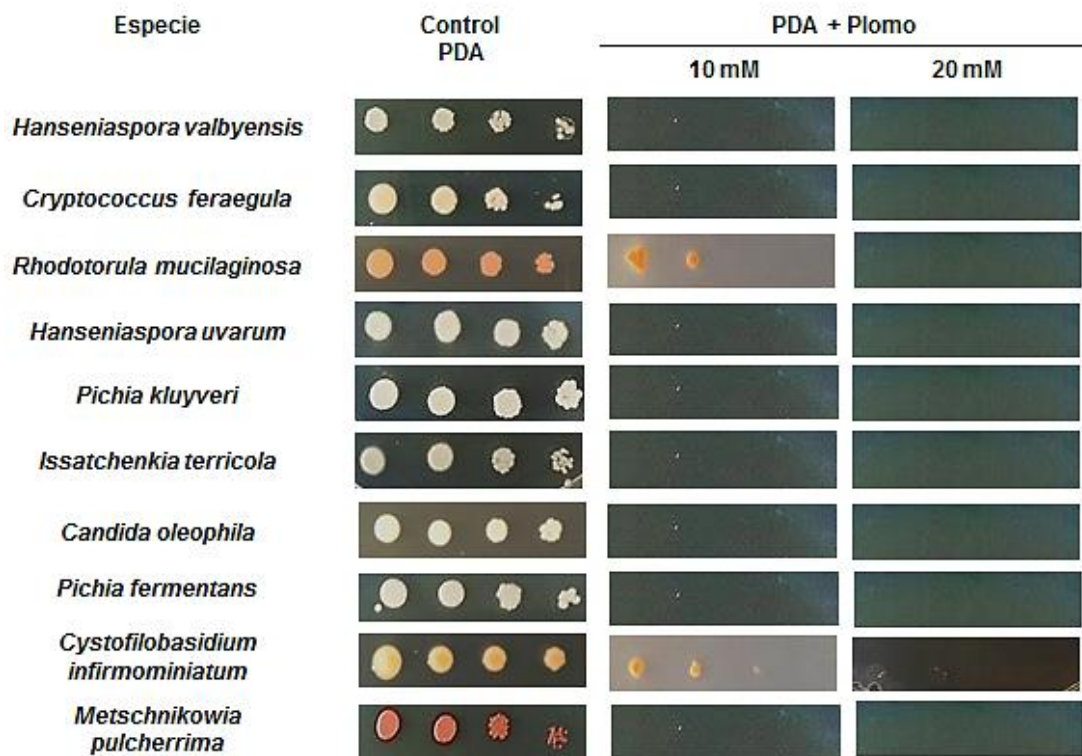


**Figura 5. Crecimiento de las especies de levaduras aisladas del CRLSA en presencia de Níquel.** Cada cultivo fue sometido a diluciones seriadas, de las cuales se sembraron alícuotas de 2,5 µl ( $10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$  y 10 células) en medio PDA (control) y en medio PDA suplementado con cloruro de níquel. Las fotografías se tomaron tras 4 días de incubación a 20°C.

#### 4.1.1.6. Crecimiento de levaduras en presencia de concentraciones crecientes de Pb

El ingreso de Pb a ambientes acuáticos ha incrementado severamente en los últimos 50 años como consecuencia del uso de tetraetilo de plomo como aditivo de combustibles. (Goldberg y Pocock, 1977, Llano et al., 1985). Este metal es utilizado además en la fabricación de pigmentos, recubrimientos, recipientes, ungüentos, pilas eléctricas y actualmente tiene numerosas aplicaciones en la industria metalúrgica: munición de armas,

metal para cojinetes, cobertura de cables, plomo laminado, soldaduras, pigmentos y vidrioado de cerámica, contaminando fácilmente los efluentes en donde desembocan los residuos de estas actividades industriales (Enamorado *et al.*, 2011). La utilización de biomasa fúngica para la remoción de Plomo ha sido utilizada por Cárdenas *et al.*, en 2013 cuyos reportes muestran que *Cryptococcus neoformans* y *Candida albicans* remueven Pb (100 mg/l) en un 68.1 y 21.2% respectivamente.



**Figura 6. Crecimiento de las especies de levaduras aisladas del CRLSA en presencia de Plomo.** Cada cultivo fue sometido a diluciones seriadas, de las cuales se sembraron alícuotas de 2,5 µl ( $10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$  y  $10^1$  células) en medio PDA (control) y en medio PDA suplementado con acetato de plomo. Las fotografías se tomaron tras 4 días de incubación a 20°C.

Nueve de las trece especies de levaduras previamente aisladas del CRLSA fueron expuestas a concentraciones de 10 y 20mM de acetato de plomo (Figura 6), de las cuales solo *R. mucilaginosa* y *C. infirmominiatum* resistieron parcialmente al estrés de 10mM, más no se evidencia crecimiento a 20mM de Pb.

*Rhodotorula mucilaginosa* ha sido reconocida en cuanto a la acumulación de cobre (Norris & Kelley, 1979), más no existen estudios previos que reporten su resistencia a Pb, al igual que *Cystofilobasidium infirmominiatum* por lo cual este supone el primer estudio que las relaciona con la tolerancia a este metal.

#### 4.1.1.7. Crecimiento de levaduras en presencia de concentraciones crecientes de Zn

El Zn se utiliza principalmente en la galvanización de acero, pero también es importante en la preparación de ciertas aleaciones. Se utiliza para la fabricación de placas negativas en algunas baterías eléctricas y para tejados y canalones en las construcciones de edificios. El Zn es el metal primario utilizado en la fabricación de monedas de un centavo americano y se utiliza en la fundición a presión en la industria del automóvil. Su óxido se utiliza como un pigmento blanco en colores de pintura, y como un activador en la industria del caucho. Al igual que otros metales pesados, cuando el Zn se descarga en las aguas naturales como resultado de las actividades industriales puede tener efectos tóxicos graves en los seres humanos y los ecosistemas acuáticos (Kortonekamp *et al.*, 1966).

Dada la contaminación por este metal pesado se han realizado estudios de tolerancia y remoción de Zn. Navarro y Acosta en 2009 usaron la biomasa de la levadura *Cryptococcus neoformans* reportando que la misma creció en presencia hasta de 1000 ppm de este metal.

Dada la amplia resistencia de las trece especies de levaduras aisladas del CRLSA a una concentración de 2mM de Zn, se las sometió a concentraciones crecientes de este metal (10 y 20mM) (Figura 7), los resultados de los goteos muestran a *Metschnikowia pulcherrima* como la única cepa resistente al estrés de 10mM de Zn y ninguna cepa resistente a 20mM. Los resultados obtenidos coinciden con los de Vadkertiova y

Slavikova en 2006 que reportan a *M. pulcherrima* como una levadura capaz de tolerar eficientemente la presencia de metales pesados como el Zn.

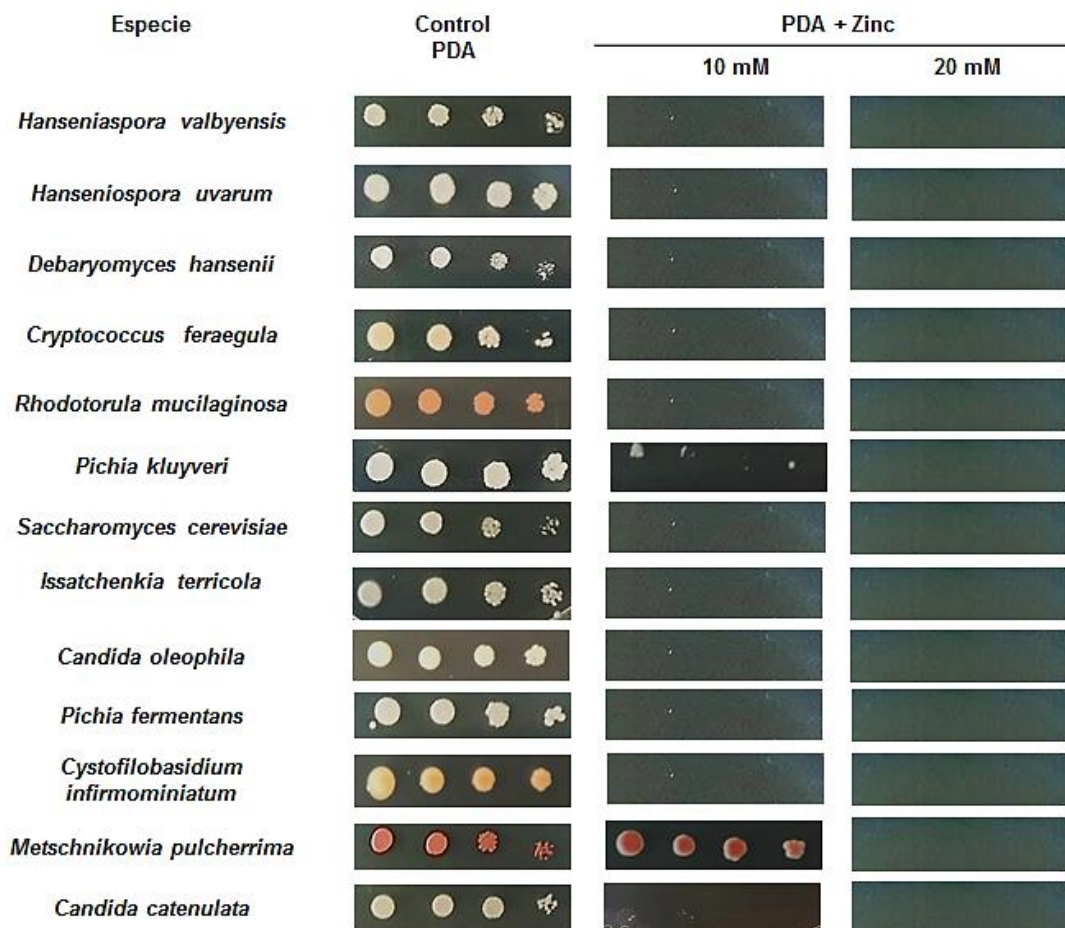


Figura 7. Crecimiento de las especies de levaduras aisladas del CRLSA en presencia de Zinc. Cada cultivo fue sometido a diluciones seriadas, de las cuales se sembraron alícuotas de 2,5 µl ( $10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$  y  $10^1$  células) en medio PDA (control) y en medio PDA suplementado con sulfato de zinc. Las fotografías se tomaron tras 4 días de incubación a 20°C.

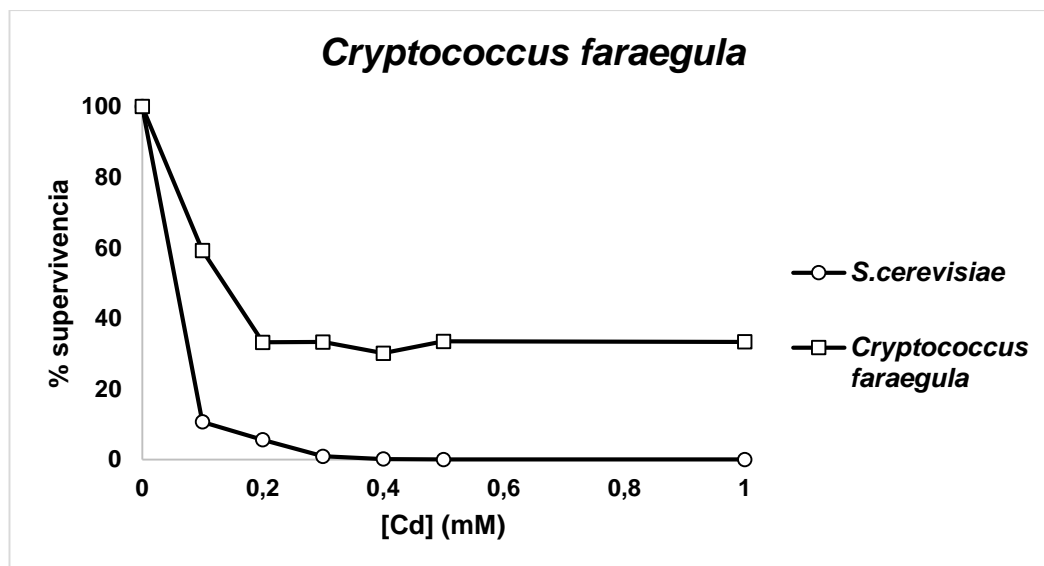
#### 4.1.2. Viabilidad celular de levaduras tras un tratamiento con metales pesados

El cadmio, junto con el plomo y el mercurio, es uno de los tres metales pesados más tóxicos existentes en el planeta (Norris & Kelly, 1979), esta característica unida a los resultados obtenidos de los crecimientos en gota de levaduras aisladas del CRLSA, donde se muestra mayor tolerancia al

estrés generado por este metal, hicieron que se tome en cuenta a *Cryptococcus faraegula* y *Rhodotorula mucilaginosa* para determinar su viabilidad celular tras un tratamiento con nitrato de cadmio.

La supervivencia celular se determinó como la capacidad de formar colonias a partir de células individuales tras el tratamiento con 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 y 1mM de Cd en función del tiempo (48 h). Se usó como control negativo a *S. cerevisiae* sometiéndola a las mismas condiciones de tratamiento. Como control positivo se usaron células de *Cryptococcus faraegula* y *Rhodotorula mucilaginosa* sin tratamiento con este metal.

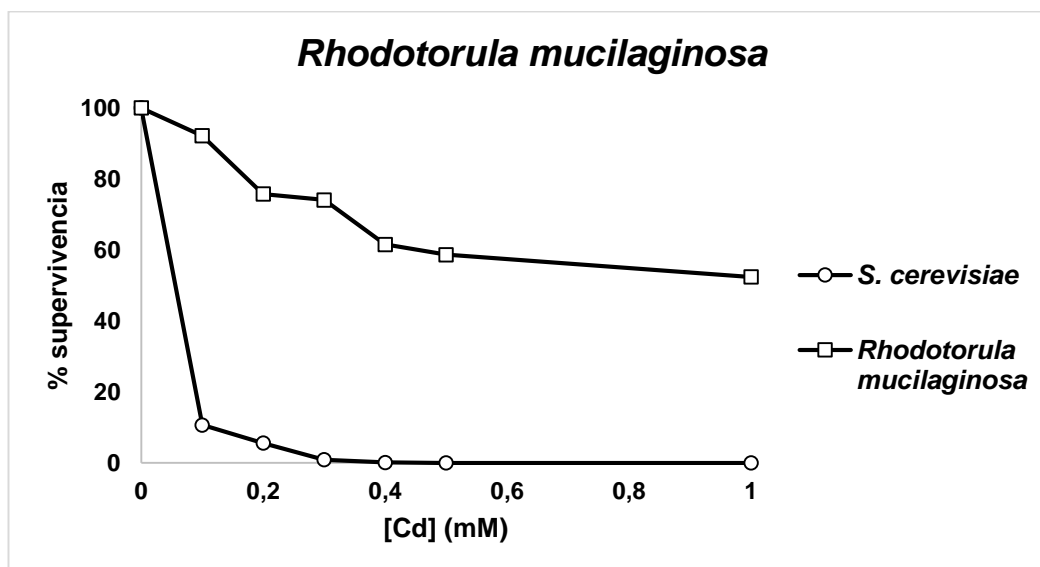
*Cryptococcus faraegula* presentó un porcentaje de supervivencia a 0.1mM de Cd del 59% a partir de la cual se observa que a medida que aumenta la concentración de este metal el porcentaje de supervivencia se mantiene relativamente constante en un rango de 33 - 30% (Figura 8).



**Figura 8. Capacidad de supervivencia de *Cryptococcus faraegula* a diferentes concentraciones de Cd en función del tiempo.** La viabilidad celular se midió como la capacidad de formar colonias a partir de células individuales (unidades formadoras de colonias, CFUs) en función del tiempo (48h). Se usó *S. cerevisiae* como control negativo.

*Rhodotorula mucilaginosa* presentó un porcentaje de supervivencia inicial del 92% a una concentración de 0.1mM de Cd, se observa un descenso parcial de la supervivencia obteniendo 75, 74, 61, 58 y 52% de

viabilidad celular a concentraciones de 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 y 1mM de Cd respectivamente (Figura 9).



**Figura 9. Capacidad de supervivencia de *Rhodotorula mucilaginosa* a diferentes concentraciones de Cd en función del tiempo.** La viabilidad celular se midió como la capacidad de formar colonias a partir de células individuales (unidades formadoras de colonias, CFUs) en función del tiempo (48 h). Se usó *S. cerevisiae* como control negativo.

*Rhodotorula mucilaginosa* toleró de mejor manera el tratamiento con Cd a diferencia de *Cryptococcus faraegula* dado que se observa a la máxima concentración de metal (1mM) que más del 50% de las células inoculadas inicialmente se encontraron viables, convirtiéndose así en una especie fúngica con un alto potencial para ser utilizada en procesos de biorremediación frente a este tipo de contaminante.

#### **4.1.3. Influencia de la concentración de cadmio en el CRLSA frente a la diversidad y tolerancia a este metal de levaduras**

Un estudio previo al presente trabajo de titulación muestra que de cada punto de muestreo se determinaron algunos parámetros químicos como el pH o la concentración de Cd (Tabla II). Pese a que no se encontraron variaciones importantes de pH, el cual se puede considerar

neutro a lo largo del canal LSA, si se observó presencia de Cd, sobre todo en los primeros puntos de muestreo.

**Tabla II. Parámetros bioquímicos del canal de riego LSA**

Punto de muestreo	pH	Concentración de Cadmio (mg/L)	Número de cepas de levaduras
LSA001	7.20	0.0440	1
LSA002	7.05	0.0444	3
LSA003	7.26	0.0484	2
LSA004	7.36	-	4
LSA005	7.38	-	1
LSA006	7.45	-	1
LSA007	7.48	<0.0100	10

Inicialmente se obtuvieron un total de 22 cepas distribuidas a lo largo de los 7 puntos de muestreo (Tabla II). En este punto cabe destacar la relación inversa entre la concentración de cadmio de las muestras y el número de cepas de levadura, dato esperable ya que la diversidad microbiana aumenta en zonas poco contaminadas.

Los tres primeros puntos de muestreo presentaron mayor contaminación por cadmio. *Rhodotorula mucilaginosa* y *Cryptococcus faraegula* se aislaron del segundo punto de muestreo donde la concentración de cadmio fue de 0.0444 mg/L. Esta concentración supera el valor de calidad admisible para aguas de uso agrícola de 0.01 mg/L (TULAS, 2010), confirmando que los ecosistemas extremos actúan como nichos perfectos para organismos caracterizados por su capacidad de adaptación a condiciones limitantes (Mueller *et al.*, 2005, Sittenfeld *et al.*, 2002).

## 4.2. Verificación de hipótesis

### 4.2.1. Resistencia de levaduras aisladas del CRLSA al estrés por metales pesados

#### Hipótesis Nula

No existen levaduras resistentes al estrés por metales pesados en el CRLSA.

#### Hipótesis Alternativa

Existen levaduras resistentes al estrés por metales pesados en el CRLSA.

Tabla III. Crecimiento en presencia de metales pesados de levaduras aisladas del CRLSA

Especie	200µM Cd	2mM Cr	2mM Ni	2mM Pb	2mM Zn
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	1	1	0	0	1
<i>Debaryomyces hansenii</i>	0	1	0	0	1
<i>Cryptococcus fereaegula</i>	1	1	0	1	1
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	1	1	0	1	1
<i>Pichia kluyveri</i>	1	0	1	1	1
<i>Hanseniaspora valbyensis</i>	0	0	1	1	1
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0	1	1	1	1
<i>Issatchenkia terricola</i>	0	1	1	1	1
<i>Candida oleophila</i>	1	1	1	1	1
<i>Pichia fermentans</i>	1	0	1	1	1
<i>Cystofilobasidium infirmominiatum</i>	1	1	1	1	1
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	1	1	1	1	1



<i>Candida catenulata</i>	0	0	1	0	1
---------------------------	---	---	---	---	---

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

**Tabla IV. Valor calculado para la prueba X2 y valor  $p$**

Estadístico	Valor	gl	$p$
Chi Cuadrado Pearson	38.21	1	<0.0001
Chi Cuadrado MV-G2	45.11	1	<0.0001

El análisis de crecimiento de levaduras aisladas del CRLSA en presencia de Cd, Cr, Ni, Pb y Zn, para la prueba Chi-cuadrado (X2), el valor  $p$  calculado es menor a 0,05; por lo tanto, se acepta la hipótesis alternativa la cual indica que existen levaduras resistentes al estrés por metales pesados en el CRLSA.

#### **4.2.2. Supervivencia de levaduras aisladas del CRLSA tras un tratamiento con metales pesados.**

##### **Hipótesis Nula**

Las levaduras existentes en el CRLSA no son viables tras un tratamiento con metales pesados.

##### **Hipótesis Alternativa**

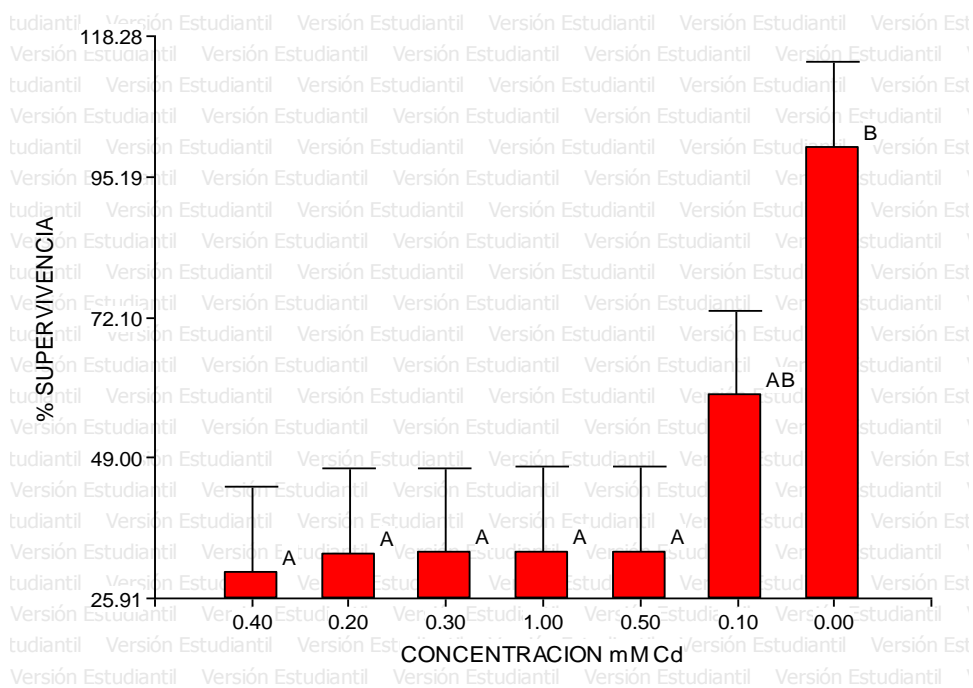
Las levaduras existentes en el CRLSA son viables tras un tratamiento con metales pesados.

**Tabla V. Cuadro de análisis de varianza para la supervivencia a Cd de *Cryptococcus faraegula***

F.V.	SC	gl	CM	CF	$p$ -valor
Modelo	15938.69	6	2656.45	3.35	0.0179
Concentración mM Cd	15938.69	6	2656.45	3.35	0.0179
Error	16664.55	21	793.55		
Total	32603.24	27			

**Tabla VI. Prueba de Tukey para la supervivencia a Cd de *Cryptococcus faraeugala***

Concentración mM Cd	Medias	n	E.E.		
0.40	30.11	4	14.09	A	
0.20	33.22	4	14.09	A	
0.30	33.28	4	14.09	A	
1.00	33.36	4	14.09	A	
0.50	33.48	4	14.09	A	
0.10	59.21	4	14.09	A	B
0.00	100.00	4	14.09		B



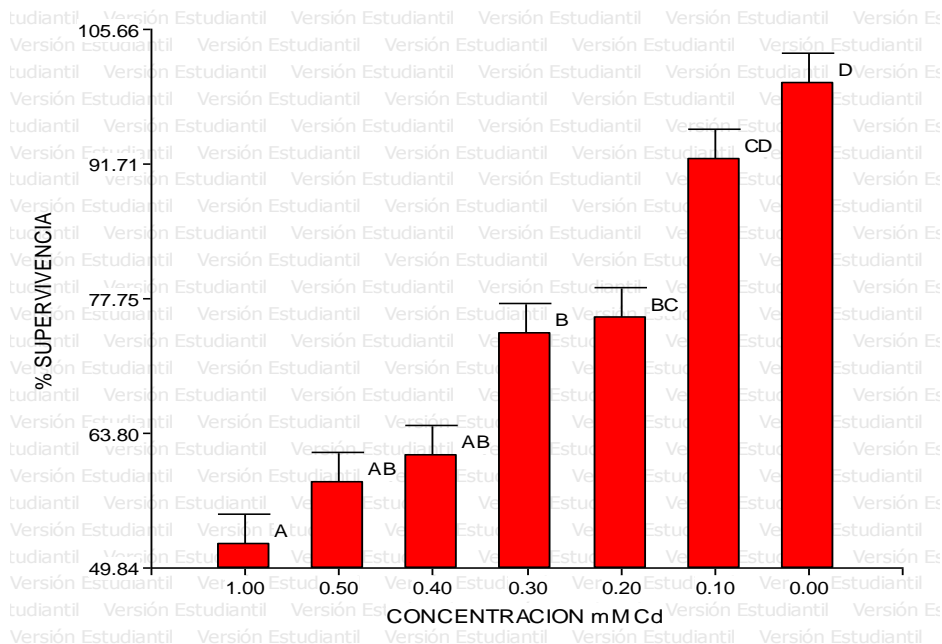
**Figura 10. Porcentaje de supervivencia de *Cryptococcus faraeugala* a diferentes concentraciones de Cd.**

**Tabla VII. Cuadro de análisis de varianza para la supervivencia a Cd de *Rhodotorula mucilaginosa***

F.V.	SC	gl	CM	CF	p-valor
Modelo	3727.65	6	621.28	31.81	0.0001
Concentración mM					
Cd	3727.65	6	621.28	31.81	0.0001
Error	136.74	7	19.53		
Total	3864.39	13			

**Tabla VIII. Prueba de Tukey para la supervivencia a Cd de *Rhodotorula mucilaginosa***

Concentración mM Cd	Medias	n	E.E.			
1.00	52.38	2	3.13	A		
0.50	58.65	2	3.13	A	B	
0.40	61.55	2	3.13	A	B	
0.30	74.07	2	3.13		B	
0.20	75.72	2	3.13		B	C
0.10	92.12	2	3.13			C D
0.00	100.00	2	3.13			D



**Figura 11. Porcentaje de supervivencia de *Rhodotorula mucilaginosa* a diferentes concentraciones de Cd.**

Mediante el diseño experimental de un factor se determinó la supervivencia de *Cryptococcus faraegula* y *Rhodotorula mucilaginosa* a diferentes concentraciones de Cd, mostrándose que existe supervivencia hasta del 50% a 1mM de este metal. El análisis de varianza muestra un valor de p menor a 0.05; por lo cual se acepta la hipótesis alternativa, la misma que indica que las levaduras existentes en el CRLSA son viables tras un tratamiento con metales pesados.

## CAPÍTULO V

### CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

#### 5.1. Conclusiones

- Las levaduras aisladas del CRLSA presentan una amplia tolerancia al estrés generado por Cd (53.85% de las especies), Cr (69.23%), Ni (69.23%), Pb (76.92%) y Zn (100%) a concentraciones preliminares de 0.2mM y 2mM. *Pichia kluyveri*, *Candida oleophila*, *Pichia fermentans*, *Cystofilobasidium infirmominiatum* y *Metschnikowia pulcherrima* presentaron un amplio rango de tolerancia hacia todos los metales en análisis.
  
- *Rhodotorula mucilaginosa* presenta mayor tolerancia a Cd creciendo en presencia de hasta 2 mM de este metal, esta característica unida a los resultados de supervivencia donde se muestra la viabilidad de más del 50% de las células inoculadas inicialmente tras un tratamiento con nitrato de cadmio, hacen de esta levadura una especie fúngica con un alto potencial para ser utilizada en procesos de biorremediación frente a este tipo de contaminante.
  
- La contaminación por Cd presente en el CRLSA hace de este un ecosistema extremo, que actúa como nicho perfecto para organismos caracterizados por su capacidad de adaptación a condiciones limitantes, como en el caso de *Rhodotorula mucilaginosa* y *Cryptococcus faraeogula* levaduras que mostraron mayor resistencia a este metal y que fueron aisladas del segundo punto del canal contaminado con 0.0444 mg/L de Cd.

## 5.2.Recomendaciones

- Evaluar la remoción de cadmio que presentan las levaduras *Rhodotorula mucilaginosa* y *Cryptococcus faraegula*.
- Potenciar la biorremediación usando levaduras autóctonas de Ecuador.

## Referencias Bibliográficas

- Anand, P., Isar, J., Saran, S., & Saxena, R. K. (2006). Bioaccumulation of copper by *Trichoderma viride*. *Bioresource Technology*. 97(8), 1018-1025.
- Balabanova, B., Stafilov, T., Šjan, R., Bačeva, K. (2011). Distribution of chemical elements in Attic dust as reflection on their geogenic and anthropogenic sources in the vicinity of the copper mine and flotation plant. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 61: 173-184.
- 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.
- Baldrian, P., & Gabriel, J. (2002). Intraspecific variability in growth response to cadmium of the wood-rotting fungus *Piptoporus betulinus*. *Mycologia*. 94(3), 428-436.
- Belimov, A., Hontzeas, N., Safronova, V., Demchinskaya, S., Piluzza, G., Bullitta, S., & Glick, B. (2005). Cadmium-tolerant plant growth-promoting bacteria associated with the roots of Indian mustard (*Brassica juncea* L. Czern.). *Soil Biology and Biochemistry*, 37(2), 241-250.
- Boguslawska-Was, E., & Dabrowski, W. (2001). The seasonal variability of yeasts and yeast-like organisms in water and bottom sediment of the Szczecin Lagoon. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 203: pp 451-458.
- Breierová, E., Vajczikova, I., Sasinková, V., Stratilová, E., Fišera, M., Gregor, T., & Šajbidor, J. (2002). Biosorption of cadmium ions by different yeast species. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 57(7-8), 634-639.

- Brierley, C., Brierley, J., & Davidson, M. (1989). Applied microbiology for metal recovery and removal from wastewater. In: Beveridge, TJ, Doyle, RJ (Eds.) *Metal Ions and Bacteria*. Wiley, New York, pp 359 – 381.
- Brown, P., Welch, R., & Cary, E. (1988). Nickel: A micronutrient essential for higher plants. *Plant Physiol.* 85:801-803.
- Cárdenas, J., Moctezuma, M., Acosta, I., & Martínez, V. (2013). Biosorción de Plomo (II) en solución por diferentes biomasas fúngicas. *Rev Latin Rec Natu* 9 (1): 57-61.
- Caron, D., Countway, P., & Brown, M. (2004). The growing contributions of molecular biology and immunology to protect an ecology: Molecular signatures as ecological tools. *J. Euk. Microbiol* 51: pp 38–48.
- CESA (2003). El Agua de Consumo Humano en la Provincia de Cotopaxi. Cotopaxi-Ecuador, Pp 15.
- Cordero, J., Guevara, M., Morales, E., & Lodeiros, C. (2005). Efecto de metales pesados en el crecimiento de la microalga tropical. *Rev. Biol. Trop.* 53(3-4), 325-330.
- Croteau, M., Luoma, S., & Stewart, A. (2005). Trophic transfer of metals along freshwater food webs: evidence of cadmium biomagnification in nature. *Limnology and Oceanography.* 50(5), 1511-1519.
- Cuberos, E., Rodríguez, A., & Prieto, E. (2009). Niveles de cromo y alteraciones de salud en una población expuesta a las actividades de curtiembres en Bogotá, Colombia. *Revista de salud pública*, 11(2), 278-289.



- Doemel, W., & Brock, T. (1971). The physiological ecology of *Cyanidium caldarium*. *J Gen Microbiol* 67: 17– 32.
- Enamorado, Y., Villanueva, M., Hernández, I., Coto, O., & Pomares, M. (2011). Caracterización de la biomasa inactiva de *Aspergillus niger* 0-5 como sorbente de Pb (II). *Química Viva*, 34 (7): 1141-1146.
- Gadanho, M., Libkind, D., & Sampaio, J. (2006). Yeast diversity in the extreme acidic environments of the Iberian Pyrite Belt. *Microb Ecol* 52: pp 552–563.
- Gavrilescu, M. (2004). Removal of heavy metals from the by environment Biosorption. *Eng. Life Sci.* 4, 219-232.
- Goldberg, A., & Pocock, S. (1977). Contribution of lead in drinking water to blood lead. *Lancet* 2: 661-2.
- Gupta, R., Ahuja, P., Khan, S., Saxena, R., Mohapatra, H. (2000). Microbial biosorbents: meeting challenges of heavy metal pollution in aqueous solutions. *Curr Sci* 78: 967– 973.
- Herbert, R. (1992). A perspective on the biotechnological potential of extremophiles. *Trends Biotechnol* 10: 395 – 402.
- Howard, T. (2000). Heavy Metals in the Environment. Using wetlands for their removal. *Lewis Publishers*. Pp 31-48.
- 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.
- Kortenkamp, A., Casadevall, M., Faux, S. P., Jenner, A., Shayer, R. O., Woodbridge, N., & O'Brien, P. (1996). A role for molecular oxygen in

the formation of DNA damage during the reduction of the carcinogen chromium (VI) by glutathione. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 329(2), 199-207.

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.

Llano, J., Pérez, J., Gaspar, G., Solís, F. (1985). Saturnismo familiar a partir del agua de uso doméstico. *Rev Clin Esp*; 177: 150-1.

Lone, M., He, Z., Stoffella, P., & Yang, X. (2008). Phytoremediation of heavy metal polluted soils and water: progresses and perspectives. *Journal of Zhejiang University Science B*. 9(3), 210-220.

MacKenzie, J., & Canil, D. (2008). Volatile heavy metal mobility in silicate liquids: implications for volcanic degassing and eruption prediction. *Earth and Planetary Science Letters*. 269(3), 488-496.

Malik, A. (2004). Metal bioremediation through growing cells. *Environment international*. 30(2), 261-278.

Massaccesi, G., Romero, M., Cazau, M., & Bucsinszky, A. (2002). Cadmium removal capacities of filamentous soil fungi isolated from industrially polluted sediments, in La Plata (Argentina). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 18(9), 817-820.

Moreira, D., López, A., Amils, R., Marín, I. (1994). Characterization of two new thermoacidophilic microalgae: genome organization and comparison with *Galdieria sulphuraria*. *FEMS Microbiol Lett* 122: 109 – 114.

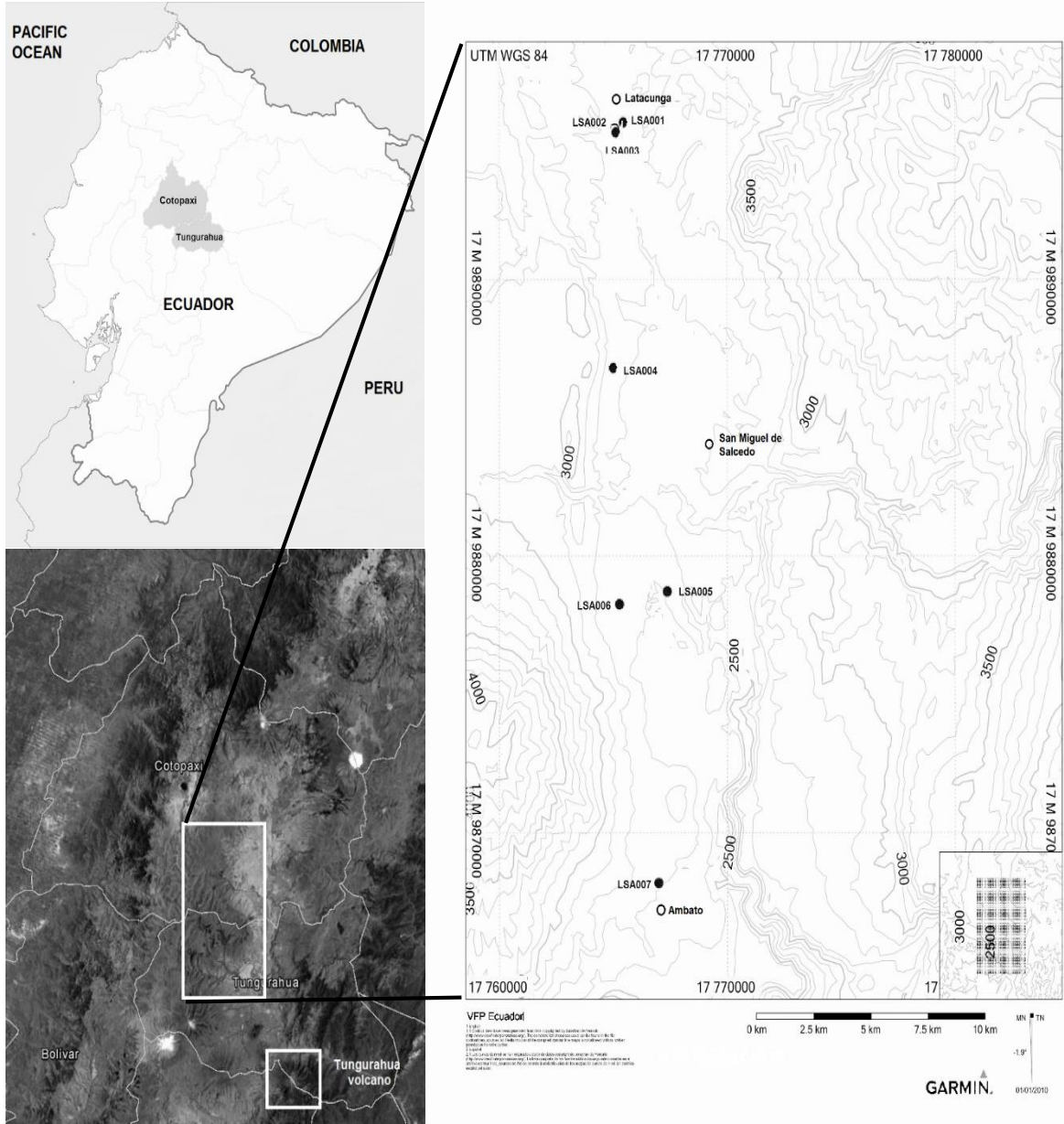
- Mueller, D., Vincent, W., Bonilla, S., & Laurion, I. (2005). Extremotrophs, extremophiles and broadband pigmentation strategies in a high arctic ice shelf ecosystem. *FEMS Microbiology Ecology*, 53(1), 73-87.
- Navarro, B., & Acosta, I. (2009). Remoción de cromo (VI) por la biomasa celular de la levadura capsulada *Cryptococcus neoformans*.
- Norris, P., & Kelley, D. (1979). Accumulation of metals by bacteria and yeasts. *Dev Ind Microbiol* 20:299–308.
- Onishi, H. (1963). Osmophilic yeasts. *Adv Food Res* 12: 53–94.
- Pérez-Rama, M., Alonso, J., López, C., & Vaamonde, E. (2002). Cadmium removal by living cells of the marine microalga *Tetraselmis suecica*. *Bioresource Technology*. 84(3), 265-270.
- Ramírez-Ramírez, R., Calvo-Méndez, C., Ávila-Rodríguez, M., Lappe, P., Ulloa, M., Vázquez-Juárez, R., & Gutiérrez-Corona, J. (2004). Cr (VI) reduction in a chromate-resistant strain of *Candida maltosa* isolated from the leather industry. *Antonie van Leeuwenhoek*, 85(1), 63-68.
- Reichenauer, T., & Germida, J. (2008). Phytoremediation of organic contaminants in soil and groundwater. *ChemSusChem*. 1(8- 9), 708-717.
- Ross, I. (1994). Reduced uptake of nickel by a nickel resistant strain of *Candida utilis*. *Microbios*, 83(337), 261-270.
- Rothschild, L., Mancinelli, R. (2001). Life in extreme environments. *Nature* 409: 1091–1101.

- 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: pp 415–424.
- Sarma, H. (2011). Metal hyperaccumulation in plants: a review focusing on phytoremediation technology. *Journal of Environmental Science and Technology*. 4(2), 118-138.
- 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<sup>+</sup> depletion in fermenting yeast. *J Biol Chem*, 288(18), pp 82-92.
- Sharp, R., & Munster, M. (1986). Biotechnological implications for microorganisms from extreme environments. In: Herbert, RA, Codd, GA (Eds.) *Microbes in Extreme Environments*. Academic Press, London, pp 215 –295.
- Shcherbov, B., Strakhovenko, V, & Sukhorukov, F. (2008). The ecogeochemical role of forest fires in the Baikal region. *Geography and Natural Resources*. 29(2), 150-155.
- Singh, O., & Jain, R. (2003). Phytoremediation of toxic aromatic pollutants from soil. *Applied microbiology and biotechnology*. 63(2), 128-135.
- Sittenfeld, A., Mora, M., Ortega, J., Albertazzi, F., Cordero, A., Roncel, M., & Serrano, A. (2002). Characterization of a photosynthetic *Euglena* strain isolated from an acidic hot mud pool of a volcanic area of Costa Rica. *FEMS microbiology ecology*, 42(1), 151-161.
- Texto Unificado de Legislación Ambiental Secundaria (TULAS). (2010). Libro VI, Norma de Calidad Ambiental y Descarga de Efluentes: Recurso Agua.

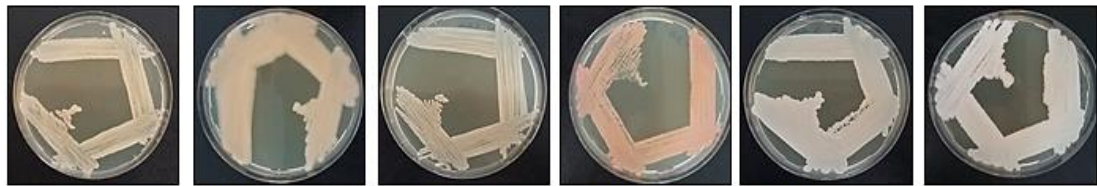
- Tobin, J., Cooper, D., & Neufeld, R. (1984). Uptake of metal ions by *Rhizopus arrhizus* biomass. *Appl Environ Microbiol* 47:821–824.
- Vadkertiova, R., & Slavikova, E. (2006). Metal tolerance of yeasts isolated from water, soil and plant environments. *J Basic Microbiol* 46(2): 145-178.
- Volesky, B., May, H., & Holan, Z. (1993). Cadmium biosorption by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Bioeng* 41: 826–829.
- Wang, J., & Chen, C. (2009). Biosorbents for heavy metals removal and their future. *Biotechnology advances*. 27(2), 195-226.
- Watanabe, K., Futamata, H., & Harayama, S. (2002). Understanding the diversity in catabolic potential of microorganisms for the development of bioremediation strategies. *Antonie van Leeuwenhoek* 81: 655–663.
- Zettler, L., Messerli, M., Laatsch, A., Smith, P., & Sogin, M. (2003). From genes to genomes: beyond biodiversity in Spain's Rio Tinto. *Biol Bull* 204: 205 –209.

# Anexos

## Anexo A: Puntos de muestreo del CRLSA



## ANEXO B: Características macroscópicas de levaduras aisladas del CRLSA



*Hanseniospora uvarum*

*Debaryomyces hansenii*

*Cryptococcus fereaegula*

*Rhodotorula mucilaginosa*

*Pichia kluyveri*

*Hanseniaspora valbyensis*



*Saccharomyces cerevisiae*

*Issatchenkia terricola*

*Candida oleophila*

*Pichia fermentans*

*Cystofilobasidium infirmominatum*

*Metschnikowia pulcherrima*



*Candida catenulata*