

INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL

CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS

EFECTO DE LA SALINIDAD EN LA COMPOSICION Y CONCENTRACION DE  
OSMOREGULADORES EN LEVADURAS HALOTOLERANTES.

Tesis que para obtener el grado de  
Maestro en Ciencias Marinas presenta:  
Norma Yolanda Hernández Saavedra.

Octubre de 1992. La Paz, B.C.S., México.

## ABREVIATURAS Y SIMBOLOS UTILIZADOS EN ESTE TRABAJO

ATP	Adenosin trifosfato
$a_w$	Actividad de agua
BSA	Albúmina sérica bovina
cel	Células
cm	Centímetro
°C	Grados centígrados
DHA	Dihidroxiacetona
g	Gramos
G3P	Glicerol-3-fosfato
hr	Horas
Kg	Kilogramo
Km	Kilómetro
l (lt)	Litro
lb	Libras
M	Molar
m	Pendiente (tasa de pérdida de volúmen)
mM	Milimolar
max	Máximo
MBPM	Metabolitos de bajo peso molecular
mg	Miligramo
ml	Mililitro
min	Mínimo
MPa	Megapascales
N	Normal
NAD	Nicotinadenina dinucleótido (oxidado)
NADH	Nicotinadenina dinucleótido (reducido)
nm	Nanómetros
$N_1$	Número de células al tiempo 1
$N_0$	Número de células al tiempo cero
opt	Optimo
Os	Osmios
PEG	Polietilenglicol

p.s.	Peso seco
r	<b>Indice</b> de correlación
r.p.m.	Revoluciones por minuto
t	Tiempo
TMAO	Trimetilamina N-óxido
>	Mayor que
<	Menor que
%	Por ciento
Y	Potencial hídrico
$\pi$	Presión osmótica
$\mu$	Velocidad específica de crecimiento
$\mu\text{g}$	Microgramos
$\mu\text{l}$	<b>Microlitros</b>
$\mu\text{M}$	Micromoles
$\mu^3$	Micras cúbicas

## ABREVIATURAS DE GENEROS

Reconocidas por la CBS Yeast Division of the "Centraalbureau voor Schimmelcultures", Laboratory of Microbiology, Technical University, Julianalaan 67 A. Delft, Netherlands (Lodder y Kreger van Rij, 1983).

<u>Candida</u>	<u>C.</u>
<u>Debarvomvces</u>	<u>Deb.</u>
<u>Hansenula</u>	<u>H.</u>
<u>Saccharomvces</u>	<u>Sacch.</u>
<u>Sporidiobolus</u>	<u>Sporid.</u>
<u>Rhodotorula</u>	<u>Rh.</u>
<u>Zigosaccharomyces</u>	<u>Zigosacch.</u>

## RELACION DE TABLAS

1.	Sistemas osmorreguladores . . . . .	4
2.	Actividad de agua de algunos fluidos y soluciones de cloruro de sodio . . . . .	10
3.	Osmoregulación en levaduras . . . . .	16
4.	Acumulación de glicerol en <u>Debaryomyces hansenii</u> después de la exposición a varios solutos estresantes ....	17
5.	Muestreo I . . . . .	41
6.	Muestreo II . . . . .	41
7.	Ubicación taxonómica de las cepas de levaduras aisladas del medio natural . . . . .	45
8.	Salinidades en el aislamiento, intervalos de tolerancia al cloruro de sodio y salinidades experimentales de las especies de levaduras consideradas en este estudio . . .	45
9.	Efecto de la concentración de cloruro de sodio en el tamaño y volumen celular de las cepas de levaduras consideradas en este estudio . . . . .	57
10.	Presiones osmóticas intracelulares y del medio de cultivo en las diferentes cepas estudiadas . . . . .	68

## RELACION DE FIGURAS

Figura 1. Metabolismo del glicerol en <u>Debarvomvces</u> <u>hansenii</u> . . . . .	19
Figura 2. Ubicación de la zona de muestreo . . . . .	29
Figura 3. Efecto de la concentración de cloruro de sodio en la velocidad específica de crecimiento de las cinco especies consideradas en este estudio . . . . .	49
Figura 4. Efecto de la concentración de cloruro de sodio en el contenido de lípidos totales en las cepas de estudio . . . . .	63
Figura 5. Efecto de la concentración de cloruro de sodio en el contenido intracelular de carbohidratos, en las diferentes especies consideradas en este estudio . . . .	66
Figura 6. Efecto de la concentración de cloruro de sodio en el contenido intracelular de aminoácidos libres en las cepas . . . . .	72
Figura 7. Efecto de la concentración de cloruro de sodio en el contenido de glicerol intracelular de varias especies de levaduras . . . . .	76

## GLOSARIO

**Ácidos grasos:** lípidos consistentes en ácidos tricarboxílicos de larga cadena hidrocarbonada. Los ácidos grasos pueden existir con diversos grados de ramificación y diferentes números de insaturaciones o dobles enlaces en la cadena hidrocarbonada. También pueden contener otro grupo funcional.

**Actividad de agua:** ( $a_w$ ) es la disponibilidad de las moléculas de una solución para intervenir dentro de un proceso (incluyendo la evaporación) en relación a aquella del agua pura a la misma presión y temperatura.

**Aldosa:** azúcar que contiene un aldehído (CHO) o un grupo aldehído potencial.

**Cetosa:** azúcar que contiene una cetona (-CO-CH<sub>2</sub>) o un grupo cetona potencial.

**Cianobacterias:** grupo de bacterias caracterizadas por contener pigmentos verde-azules. Fotosintetizan aeróbicamente, y son abundantes en una gran variedad de habitats, particularmente en agua dulce y suelo. Carecen de motilidad, de actividad fermentativa y flagelos: su reproducción es asexual.

**Difusión pasiva:** fenómeno donde los solutos pasan a través de membranas bajo su gradiente de concentración sin interacciones específicas con los componentes de la membrana, en la que la tasa de translocación **tipicamente** no es saturable.

**Electrolito:** líquido que contiene iones positivos y negativos, que conduce pulsos eléctricos por el flujo de estas cargas. Pueden ser soluciones de ácidos o sales de metales (compuestos iónicos), generalmente en agua.

**Estrés osmótico:** perturbación creada en un organismo por las diferencias en el potencial osmótico del medio circundante, con respecto al propio.

**Eubacterias:** gran y diverso grupo de bacterias distinguidas de las demás principalmente por poseer una pared celular rígida que les confiere una forma estable. La mayoría de estas bacterias se dividen por fisión binaria y pueden ser esféricas, ovoides o elípticas. La mayoría de los organismos que pertenecen a este grupo no son móviles pero algunas poseen flagelos.

**Fase exponencial de crecimiento:** fase del crecimiento en el que el número de individuos presentes se incrementa de manera exponencial con respecto al tiempo de cultivo ( $N_t = N_0 e^{at}$ ).

**Fermentación:** rompimiento de sustancias orgánicas, particularmente carbohidratos, bajo condiciones aeróbicas. Es una forma de respiración anaeróbica y está presente en ciertas bacterias y levaduras. La fermentación es una vía metabólica para la obtención de energía.

**Fosfolípidos:** lípido glicérico en el cual un ácido graso es reemplazado por un fosfato y en el que el hidrógeno P-O-H puede ser reemplazado por una amplia variedad de derivados.

**Heterotrófico:** tipo de nutrición en el que la principal fuente de carbono y energía es obtenida de compuestos orgánicos.

**Hiperosmótico:** solución con una presión osmótica mayor que la de otra solución de referencia.

**Hongos filamentosos:** Diverso grupo de organismos, principalmente terrestres que se diferencian de las plantas por su carencia de clorofila; son generalmente parasíticos o saprofiticos y están constituidos por hifas.

**Levaduras:** Hongos unicelulares que se reproducen asexualmente por gemación y/o fisión. En este grupo también se observa reproducción sexual (formación de esporas sexuales).

**Levaduras halotolerantes:** levaduras capaces de proliferar a bajas actividades de agua por tolerar altas concentraciones de sales en el medio.

**Levaduras halofílicas:** levaduras capaces de crecer optimamente y proliferar a bajas actividades de agua sólo cuando en el medio existen altas concentraciones de sales.

**Levaduras osmofílicas:** levaduras capaces de crecer y proliferar a bajas actividades de agua (altas presiones osmóticas) creadas por soluciones de azúcares altamente concentradas.

**Micelio:** Masa de filamentos tubulares no fotosintéticos (hifas), que comprenden el cuerpo de un hongo. En esta estructura se producen los órganos reproductivos de los hongos.

**Isotónica:** se refiere a una solución que tiene la misma presión osmótica que una de referencia.

**Osmoregulación:** proceso por medio del cual algunos organismos regulan su presión osmótica interna al controlar la cantidad de agua y su concentración de sales, para controlar su propia turgencia.

**Osmoreguladores:** solutos osmóticamente activos diferentes del soluto principal externo que son producidos por la célula para balancear las diferencias que existen con respecto al

potencial osmótico del medio extracelular. Comprenden en su mayoría iones inorgánicos y moléculas orgánicas de bajo peso molecular.

**Presión osmótica:** es la presión que se requiere para mantener el equilibrio entre el paso de moléculas de un solvente a través de una membrana en una y otra dirección, .

**Polialcohol:** (polihidroxiálcohol, polioles o alcoholes polihídricos) alcohol que tiene varios grupos OH en su molécula.

**Vacuola:** organelo esférico lleno de fluido y de tamaño variable que se encuentra en los eucariotas. Está rodeado por una membrana simple y funciona como compartimiento para separar una gran variedad de materiales de el citoplasma. Existen varios tipos especializados entre los que se encuentran: las vacuolas alimenticias, las contráctiles, las autofágicas, etc.

**Zwitterión:** ión con ambas cargas, positiva y negativa. Los aminoácidos pueden formar zwitteriones; el grupo amino tiene la forma  $-NH_3^+$  y el grupo ácido es ionizado como  $-COO^-$ .

## EFEECTO DE LA SALINIDAD EN LA COMPOSICION Y CONCENTRACION DE OSMOREGULADORES EN LEVADURAS HALOTOLERANTES

### RESUMEN:

Se aislaron cinco cepas de levaduras halotolerantes a partir de muestras de agua colectada en la laguna de condensación de la salina de Pichilingue B.C.S., por el método de enriquecimiento. De estas, se estudiaron las tres cepas más halotolerantes y no filamentosas y dos especies de la Colección de Levaduras Marinas del Centro de Investigaciones Biológicas de B.C.S., que se pretenden introducir en la dieta del camarón y en otras aplicaciones biotecnológicas. Se estudió el efecto de la salinidad y la temperatura en el crecimiento y en la composición y concentración de osmoreguladores en estas cepas, encontrándose que el efecto del incremento de la salinidad y la temperatura es particular para cada especie. Sin embargo, se observaron tres grupos definidos: organismos ligeramente halotolerantes, que se desarrollan en concentraciones de NaCl del 3 al 9 % (Rhodotorula rubra, Cryptococcus albidus var. albidus, y Candida sp.), organismos moderadamente halotolerantes que se desarrollan en concentraciones de NaCl del 9 al 18 % (Hansenula sp. y Debaryomyces hansenii) y organismos extremadamente halotolerantes, que se desarrollan en medios con concentraciones de NaCl del 20 % y más (Aureobasidium pullulans).

También se encontró una estrecha relación entre el incremento en la salinidad y la elevación de los niveles intracelulares de ciertos metabolitos. Para Rh. rubra, Cr. albidus var. albidus, Candida sp. y A. pullulans el glicerol intracelular se incrementa concomitantemente con la salinidad, determinándose que este metabolito es el que juega el principal papel en la osmoregulación de estas especies. No obstante, en Candida sp. también se observó una importante participación de los aminoácidos intracelulares en el proceso osmoregulatorio.

En Deb. hansenii, aunque el glicerol se sintetiza en respuesta al incremento de la salinidad, no es capaz de balancear el potencial osmótico intracelular con respecto al del medio que le rodea, por lo que se concluye que en este microorganismo existe otro (u otros) mecanismos no considerados en este estudio que le permiten subsistir y desarrollarse en medios altamente salinos.

ABSTRACT:

Five halotolerant yeast strains were studied for the effect of salinity and temperature on overall growth of the organism and the composition and concentration of their osmoregulators. It was found that an increase in temperature and salinity promoted a strain specific effects. however, three tendencies were observed and defined as: slightly halotolerant (Rhodotorula rubra, Cryptococcus albidus var. albidus and Candidasp.), moderately halotolerant (Hansp. and Debaryomyces hansenii) and extremely halotolerant (Aureobasidium pullulans).

A close relationship was found between an increase in salinity an increase in the concentration of certain intracellular metabolites. In Rh. rubra, Cr. albidus var. albidus, Candidasp. and A. pullulans, the glycerol level increased concomitantly with salinity. This metabolite seems to play a major role in the osmoregulation of these species. Nevertheless, in the last two species, the intracellular amino acid pool contributed to their osmoregulatory process. Although most yeasts synthesize glycerol in response to salinity, Deb. hansenii was not able to balance the osmotic pressure. Therefore, we conclude that this particular microorganism may have another mechanism that allows it to survive and grow in highly saline environments.

## INDICE

1.	INTRODUCCION . . . . .	1
1.1	Efecto de la salinidad y osmoregulación en microorganismos . . . . .	1
1.1.1	Osmoreguladores solubles compatibles . . . . .	3
1.1.2	Efecto del NaCl en la actividad enzimática . . . . .	5
1.1.3	Presiones osmóticas . . . . .	8
1.2	Levaduras Marinas . . . . .	10
2.	ANTECEDENTES . . . . .	14
2.1	Osmoregulación en levaduras . . . . .	14
2.1.1	Metabolismo del glicerol . . . . .	18
2.1.2	Transporte de polialcoholes . . . . .	20
2.1.3	Iones inorgánicos . . . . .	21
2.1.3.1	Transporte . . . . .	22
2.1.4	Compartimentalización de solutos . . . . .	23
3.	JUSTIFICACION . . . . .	25
4.	OBJETIVO GENERAL . . . . .	27
4.1	Objetivos específicos . . . . .	27
5.	MATERIALES Y METODOS . . . . .	28
5.1	Area de Muestreo . . . . .	28
5.2	Organismos de estudio . . . . .	28
5.2.1	Organismos de colección . . . . .	28
5.2.2	Aislamientos del medio natural . . . . .	30
5.2.3	Técnica de aislamiento . . . . .	30
5.3	Purificación . . . . .	30
5.3.1	Mantenimiento . . . . .	31
5.4	Caracterización . . . . .	31
5.5	Determinación de crecimiento . . . . .	31
5.5.1	Preparación del inóculo . . . . .	31

5.5.2	Estudios de crecimiento .....	32
5.6	Determinación del peso y del volúmen celular . .	33
5.6.1	Peso celular .....	33
5.6.2	Volúmen .....	33
5.7	Determinación de proteínas, carbohidratos y lípidos totales .....	34
5.7.1	Determinación de proteínas totales .....	34
5.7.2	Determinación de carbohidratos totales .	34
5.7.3	Determinación de lípidos totales .....	34
5.8	Extracción de metabolitos de bajo peso molecular (MBPM) .....	35
5.8.1	Obtención de biomasa .....	35
5.8.2	Extracción .....	35
5.9	Determinación de MBPM .....	36
5.9.1	Determinación de proteínas .....	36
5.9.2	Determinación de carbohidratos .....	37
5.9.3	Determinación de aminoácidos libres ....	37
5.9.4	Determinación de glicerol .....	37
5.10	Cálculo de la presión osmótica .....	37
5.11	Análisis estadístico .....	39
6.	RESULTADOS Y DISCUSION .....	40
6.1	Aislamiento .....	40
6.2	Caracterización y determinación taxonómica ....	44
6.3	Crecimiento .....	46
6.4	Volúmen celular .....	55
6.4.1	Morfología celular .....	60
6.5	Contenido de proteínas y carbohidratos totales .....	61
6.6	Contenido de lípidos totales .....	61
6.7	Producción y acumulación de MBPM .....	65
6.7.1	Carbohidratos .....	65

6.7.2	Aminoácidos libres .....	71
6.7.3	Glicerol .....	75
6.8	Discusión general .....	80
7.	CONCLUSIONES .....	83
8.	RECOMENDACIONES .....	86
9.	LITERATURA CITADA .....	87
10.	APENDICES .....	95
10.1	Apéndice 1 .....	95
10.2	Apéndice II .....	97
10.3	Apéndice III .....	101
10.4	Apéndice IV .....	102

## 1. INTRODUCCION

### 1.1 Efecto de la salinidad y osmoreguladores en microorganismos.

La habilidad para adaptarse, dentro de límites variantes, a cambios en la presión osmótica del medio, es una propiedad inherente de la mayoría de las células vivas.

Se ha observado que la exposición a altas concentraciones de sales provoca varios efectos en las células. Una concentración de cloruro de sodio hiperfisiológica induce a las células a adoptar formas pequeñas, ocurriendo además un pronunciado y continuo decremento en el volúmen celular (como respuesta inmediata al estrés osmótico) y un incremento en la excentricidad elipsoidal al incrementarse la salinidad (Lindman, 1981 a; Watanabe y Takakawa, 1984; Ginzburg, 1987).

La composición de lípidos intracelulares también se ve afectada por un incremento en la salinidad. En levaduras, varían las proporciones de ésteres-esteroles y ácidos grasos libres de acuerdo a la molaridad del medio (Watanabe y Takakawa, 1984; Tunblad-Johansson et al, 1987). Un incremento en la salinidad de cero a 8 % resulta en un decremento en el contenido de fosfolípidos celulares en base al peso seco. En Saccharomyces cerevisiae se **decrementa** ligeramente la proporción de ácidos grasos  $C_{16}$  con un consecuente incremento de los ácidos  $C_{18}$ , mientras que en las cepas osmotolerantes se incrementa el contenido relativo de ácido oleico

(C<sub>18:1</sub>) a expensas de la proporción de ácidos C<sub>18</sub> polienólicos (Tunblad-Johansson y Adler, 1987).

La estructura de la pared celular permanece sin cambios a concentraciones de cloruro de sodio de 0 y 18%, sin embargo, los niveles de mananos (tanto de la pared como del medio extracelular) disminuyen cuando las células crecen en presencia de un 15% **de** cloruro de sodio (Watanabe y Takakawa, 1984). Por otra parte, el contenido de carbohidratos y proteínas de la membrana permanece constante ante los cambios en la molaridad extracelular (Hamada et al, 1984).

A altas salinidades los niveles internos de sales no son suficientes para balancear el potencial osmótico del ambiente (Norkrans y Kylin, 1969; Hobot y Jennings, 1981), por lo que se acumulan intracelularmente solutos que son diferentes del soluto principal externo, conocidos como osmoreguladores (Lindman, 1981b; Ginzburg, 1987). Estos solutos internos tienen como función principal igualar la presión osmótica intracelular con la del medio externo. Además, son compatibles con los procesos metabólicos celulares, por lo que no interfieren ni dañan el funcionamiento normal de la célula, y en muchos casos **protegen** la actividad enzimática de las altas concentraciones de iones.

En la actualidad, se conocen varios solutos involucrados en la adaptación osmótica de varios microorganismos (Tabla 1). En las arqueobacterias halofílicas extremas (Halobacteriaceae), **por** ejemplo, el KCl es el principal soluto intracelular, encontrándose a concentraciones de 5 eq/lt. En Dunaliella salina (un alga

halofílica unicelular) y en algunos hongos microscópicos los polialcoholes se acumulan como solutos compatibles (Yancey et al, 1982), y en las eubacterias halofílicas se ha encontrado que la betaina tiene esta función (Imhoff y Rodríguez-Valera, 1984). Los disacáridos pueden ser también buenos osmoreguladores como en el caso de algunas microalgas (Vázquez-Duhalt y Arredondo-Vega, 1991; Band et al, 1992).

#### 1.1.1 Osmoreguladores solubles compatibles.

Los osmoreguladores son solutos osmoticamente activos, comprendidos en su mayoría por iones inorgánicos y moléculas orgánicas de bajo peso molecular que se encuentran presentes en todas las células (Yancey et al, 1982).

Los osmoreguladores celulares que se acumulan en el interior de las células evitan la deshidratación al balancear el potencial hídrico del citoplasma con el medio exterior (Le Rudulier et al, 1984). Estos productos osmoreguladores no afectan adversamente la estructura macromolecular y función de las proteínas, por lo que se les conoce bajo el término de solutos compatibles (Lindman, 1981 a; Yancey et al, 1982; Adler, 1986).

Los solutos compatibles y no compatibles se distinguen en base a dos propiedades: a) los solutos no compatibles interactúan específicamente con ligandos y sitios activos de las enzimas por lo que afectan su función: b) es diferente la forma en la que los solutos compatibles y no compatibles afectan la hidratación, solubilidad e interacción de cargas de varios grupos de proteínas.

Estos efectos estructurales, se pueden convertir en manifestaciones funcionales, sin embargo, los osmoreguladores orgánicos que comunmente son utilizados por los organismos no poseen carga que

TABLA 1.

**Sistemas osmoreguladores** presentes en diversos grupos de **microorganismos.**

---

GRUPO A. ALCOHOLES POLIHIDRICOS		
Cyanobacterias	Glucocilglicerol	Yancey <u>et al</u> , 1982
Hongos	Arabitol	Yancey <u>et al</u> , 1982
	Glicerol	Adler <u>et al</u> , 1985
	Manitol	Adler <u>et al</u> , 1982
	Glicerol	Ginzburg, 1987
Algas unicelulares	Sacarosa	Band <u>et al</u> , 1982
	Isofloridósido	Yancey <u>et al</u> , 1982
	Laminaribiosa	Arredondo-Vega and
		Vázquez-Duhalt, 1992
GRUPO B. AMINOACIDOS Y DERIVADOS DE AMINOACIDOS		
Eubacterias	Ac. glutámico	Yancey <u>et al</u> , 1982
	Prolina	Yancey <u>et al</u> , 1982
	$\gamma$ -Ac. aminobutírico	Yancey <u>et al</u> , 1982
Eubacterias halofílicas	Betaina	Imhoff <u>et al</u> , 1984
Protozoarios	Glicina	Yancey <u>et al</u> , 1982
	Alanina	Yancey <u>et al</u> , 1982
	Prolina	Yancey <u>et al</u> , 1982
	Glicina	Mackay <u>et al</u> , 1984
Cyanobacterias		
GRUPO C. UREA Y METILAMINAS		
Cyanobacterias	Betaina	Mackay <u>et al</u> , 1984
GRUPO D. IONES INORGANICOS		
Cyanobacterias	K <sup>+</sup>	Mackay <u>et al</u> , 1984
Arqueobacterias	K <sup>+</sup>	Yancey <u>et al</u> , 1982
Arqueobacterias halofílicas extremas	KCl	Imhoff <u>et al</u> , 1984

---

(Modificada de Yancey et. al., 1982).

pueda formar complejos con los metabolitos celulares, generalmente cargados negativamente. Los polialcoholes, la urea y el trimetilamina N-óxido (TMAO), no tienen carga negativa, además, otras metilaminas y aminoácidos actúan como zwitteriones al pH fisiológico (Yancey et al, 1982).

Existen varios tipos de sistemas osmoreguladores compatibles intracelulares (Tabla 1), dentro de los que se distinguen cuatro grupos que son: (A) alcoholes polihídricos o polioles; (B) aminoácidos y derivados de aminoácidos; (C) urea y metilaminas; y (D) los iones inorgánicos (Hobot y Jennings, 1981; Yancey et al, 1982; Le Rudulier et al, 1984; Mackay et al, 1984; Wethered y Jennings, 1985; Adler, 1986).

#### 1.1.2 Efecto de NaCl en la actividad enzimática.

La concentración de NaCl en el medio tiene ciertos efectos sobre la funcionalidad de algunas enzimas de organismos expuestos a un estrés osmótico salino. Una de las preguntas que más ha preocupado a los investigadores, es si el organismo posee enzimas capaces de tolerar altas concentraciones de NaCl, o si el interior celular semejante al de los organismos de agua dulce, y si el NaCl es excluido de la célula por una membrana impermeable (Ginzburg, 1987).

Johnson et al, 1968 fué el primero en estudiar el efecto del NaCl en enzimas específicas. Estudiando a D. salina observó que la concentración inhibitoria de NaCl de las enzimas intracelulares fué muy baja en comparación a aquella observada para las enzimas

extracelulares, concluyendo entonces que el interior celular está virtualmente libre de **NaCl**. Esta conclusión ha sido ampliamente aceptada, aunque no se ha argumentado el efecto particular del **NaCl** en todas las enzimas de D. salina. Sin embargo, se ha observado que las unidades funcionales de las halobacterias están adaptadas para trabajar en altas concentraciones de sal, las cuales además, se requieren para mantener la integridad de la envoltura celular y la estabilidad y actividad de las proteínas, incluyendo a las enzimas. En general, se ha establecido que la mayoría de las enzimas halobactriales requieren altas concentraciones de sal (1 - 4 M) para su estabilidad y actividad (Bayley y Norton, 1978; **Nolasco**, 1992). En otros trabajos se enfatiza la importancia que tienen el **sustrato** y la concentración de la enzima en la determinación del grado de inhibición causado por el **NaCl**: mientras mayores sean las concentraciones de enzima y **sustrato** (favoreciéndose la formación de complejos sustrato-enzima), menor va a ser el grado de inhibición causado (Gimmler et al, 1984). Otros autores han puntualizado que la sensibilidad de las enzimas no es la misma in vivo que in vitro.

Finalmente, se ha observado que el efecto del glicerol en las enzimas de D. salina puede resumirse en dos puntos principales (Ginzburg, 1987):

- a) Estabiliza la estructura de algunas enzimas (p. ej. dihidroxiacetona **cinasa**)
- b) Contraresta la inhibición causada por el **NaCl** en algunas enzimas (p. ej. glicerol-3-fosfato deshidrogenasa,

dihidroxiacetona reductasa).

Por otro lado, algunas enzimas de D. salina poseen características especiales. Muchas, han sido modificadas en vías metabólicas que las vuelven insensibles a los iones, particularmente Na<sup>+</sup>, y al glicerol. También se han observado modificaciones en la estructura de las moléculas enzimáticas que les confieren tolerancia al NaCl: sus proteínas contienen un amplio cociente de residuos ácido/básico (Ginzburg, 1987), generalmente están hidratadas y tienen una alta viscosidad intrínseca (Paradies y Vetterman, 1979).

En levaduras, los polialcoholes no sólo tienen la función de solutos compatibles en la célula, también se les considera como carbohidratos de reserva, como compuestos transportadores y como moléculas de almacen de poder reductor (Blomberg y Adler, 1992). No existe mucha información de por qué los polialcoholes son almacenados como reservas de carbono, pero el manitol es el candidato más conspicuo. Aunque este compuesto se encuentra también en grandes cantidades en el micelio, en los cuerpos fructíferos y en esporas, esta función no está en conflicto con su papel de osmoregulador.

Jennings (1987) puntualizó a la trehalosa como el compuesto transportado con mayor frecuencia por el glicerol, existiendo evidencias experimentales de que los polialcoholes trasportan moléculas carbonadas a grandes distancias.

El papel de los polialcoholes como fuente de poder reductor, es importante puesto que el mantenimiento del metabolismo celular

es dependiente de un continuo aporte de  $\text{NAD}^+$  citosólico para la oxidación de sustratos. Los polialcoholes son más reductores que los azúcares y la formación de polihidroxialcoholes representa una vía de depósito de equivalentes reducidos a  $\text{NADH}$  re-oxidado. Está bien establecido que la formación de glicerol en Sacch. cerevisiae es un medio por el que las células oxidan  $\text{NADH}$  durante la fermentación alcohólica. La reducción de una aldosa o una **cetosa** al correspondiente polialcohol, también se ha considerado como un medio de remover  $\text{H}^+$  del citoplasma (Jennings, 1984).

Aunque la reacción para la conversión de azúcares a polialcoholes no es consumidora de protones, su producción puede estar integrada en la regulación del pH celular simplemente por constituir un producto final neutro.

### 1.1.3 Presiones osmóticas.

El agua que es el constituyente predominante de las células vivientes y metabolizantes, es reconocido como un prerequisite para la vida, y las dificultades de la sobrevivencia se incrementan con la sequedad del medioambiente.

Sin embargo, un déficit de agua puede existir también en un medio donde el agua aparentemente es abundante. La introducción y subsecuente disolución en agua de un compuesto iónico (como el cloruro de sodio) o un compuesto no iónico (como la sacarosa) puede disminuir gradualmente su concentración relativa. La influencia de los solutos en la efectividad del contenido de agua (Tabla 2) generalmente se expresa en términos de actividad de agua ( $a_w$ ) o

potencial hídrico (Y). La actividad de agua, que está definida como la disponibilidad de las moléculas de una solución para intervenir dentro de un proceso (incluyendo la evaporación), en relación a aquella del agua pura a la misma presión y temperatura, es **numericamente** igual al equilibrio de la humedad relativa.

La relación entre la actividad de agua y el potencial hídrico en una solución esta dada por:

$$Y = \frac{RT}{V_w} \ln a_w + P$$

donde R = constante de los gases, T = temperatura en grados Kelvin,  $V_w$  = volúmen molal parcial de agua y P = presión hidrostática del agua.

La presión osmótica,  $\pi$ , (que se incrementa al aumentar la cantidad de material disuelto) es la medida de la tendencia a diluirse de una disolución separada del disolvente puro por una membrana semipermeable y es igual a:

$$\pi = - \frac{RT}{V_w} \ln a_w$$

y la relación que existe entre la  $a_w$  y la concentración del soluto esta dada por:

$$\ln a_w = - \frac{v m O}{55.51}$$

donde v = número de iones formados por cada molécula de soluto; m = concentración molal del soluto y O = coeficiente molal osmótico.

Los microorganismos en todo momento están en equilibrio hídrico con su medio, debido a la alta permeabilidad del agua a través de su membrana plasmática. Los microorganismos, generalmente sumergidos en su medio, pueden ajustar su contenido de agua a los

pocos segundos de presentarse un cambio ambiental en la actividad de agua. Sin embargo, esto no implica necesariamente una igualación de la actividad de agua en ambos lados de la membrana plasmática. Aunque la pared celular puede resistir la presión de turgencia (presión hidrostática) a una baja actividad de agua intracelular

Tabla 2.

Actividad de agua de algunos fluidos y soluciones de **NaCl**.

a..	Compuesto	Molaridad	<b>NaCl (%)</b>
1.0	agua pura	<b>0.0</b>	<b>0.0</b>
0.994	plasma sanguineo		<b>0.9</b>
0.980	agua de mar	<b>0.599</b>	3.5
0.953	solución NaCl	1.370	8.0
0.940		1.711	10.0
0.926	"	2.050	11.9
0.895		2.567	15.0
0.845	"	3.422	20.0
0.840		3.910	22.8

(Tomado de Lindman, 1981 b).

(en relación a la extracelular), adquirida por la acumulación intracelular de solutos, puede balancearse por una diferencia en la presión de turgencia a través de la membrana. Consecuentemente, en las células con paredes es frecuente encontrar bajas  $a_w$  (Lidman, 1981 a).

## 1.2 Levaduras Marinas.

El término "Levaduras Marinas" incluye a todas las levaduras y organismos levaduriformes capaces de construir y perpetuar

poblaciones en ambientes marinos, o aquellas en las que su reproducción y crecimiento ocurren preferentemente a la concentración de sales del mar (Kohlmeyer y Kohlmeyer, 1979); ésta definición no excluye a aquellas levaduras que también son capaces de ocupar, o aún de preferir, nichos ecológicos no marinos (Van Uden y Fell, 1968).

Se ha encontrado que algunas especies de levaduras están mejor equipadas que otras para vivir en el mar. Se ha demostrado que la versatilidad asimilativa de las levaduras marinas es significativamente mayor que la de las levaduras de origen terrestre (Ahearn et al, 1962; Ahearn, 1964). Las levaduras, en general, asimilan un promedio de 12.8 compuestos de carbono, mientras que las especies marinas asimilan un promedio de 19.2 (Ahearn, 1964; Van Uden y Fell, 1968).

La capacidad de asimilar una gran variedad de compuestos de carbono es una ventaja para los microorganismos heterotróficos que viven en el mar. Sin embargo, esta capacidad puede ser una expresión de la versatilidad de asimilación en general, y una característica de especies adaptadas a ambientes en donde la cantidad de nutrientes es crítica (Ahearn et al, 1962). Esta capacidad de asimilación no sólo permite al microorganismo el uso de una amplia variedad de compuestos como fuentes de energía y biomasa, sino también implica que una alta fracción relativa del total de materia orgánica suspendida y disuelta está disponible para la célula. Lo anterior es de importancia decisiva cuando la concentración de nutrientes es muy baja, como sucede en mar

abierto.

Dentro de los géneros de levaduras marinas más comunmente encontrados en ambientes marinos, tenemos los siguientes: Candida, Cryptococcus, Debarvomyces, Hansenula, Kluyveromyces, Metschnikowia, Pichia, Rhodotorula, Saccharomyces, Torulopsis y Trichosporon (Norkrans, 1966; Van Uden y Fell, 1968).

La tolerancia a la salinidad se presenta tanto en especies marinas como en especies de origen terrestre, debido a que las levaduras pueden crecer a concentraciones de sales superiores a las del agua de mar (Van Uden y Fell, 1968; Kolhmeyer y Kolhmeyer, 1979), desarrollándose desde una concentración de cloruro de sodio del 4% (w/v) hasta una concentración del 24% (w/v) (Norkrans, 1968; Reinheimer, 1974).

En condiciones naturales existen las llamadas levaduras osmofílicas y las levaduras halotolerantes, que corresponden a organismos capaces de proliferar a muy baja actividad de agua (Tilbury, 1980; Lindman, 1981 b).

Las levaduras osmofílicas tienen una gran habilidad de prosperar a altas presiones osmóticas creadas por soluciones de azúcar altamente concentradas (Anand y Brown, 1968; Tilbury, 1980; Lindman, 1981 b). El término halotolerante es más estricto y se aplica exclusivamente a los organismos que toleran altas concentraciones de sales, especialmente NaCl (Lindman, 1981 b). Dentro de los géneros que ocurren en ambientes con altas concentraciones de sales se encuentran: Debaryomyces, Saccharomyces, Torulopsis, Pichia, Hansenula y Candida (Tilbury,

1980; Lindman, 1981 b; Javor, 1989 a).

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Osmoregulación en levaduras.

La vulnerabilidad de los microorganismos no halotolerantes se debe en gran medida a su requerimiento general de agua "libre" citoplasmática, que es un agente reactivo en las reacciones bioquímicas. Más aún, las proteínas y otros componentes celulares son inherentemente dependientes del agua que permanece en un estado funcional o libre.

Como podría esperarse, la halotolerancia en las levaduras está asociada con un mosaico especial de características y cualidades. Una de las propiedades más importantes y más estudiadas de este tipo de levaduras, es su habilidad de producir y retener varios alcoholes polihídricos (polioles) intracelularmente (Onishi, 1963; Brown, 1974), como respuesta a un incremento en la presión osmótica del medio extracelular (Gustafsson y Norkrans, 1976). Esta habilidad también se ha encontrado en otros microorganismos eucarióticos halotolerantes (Yancey *et al*, 1982; Le Rudulier, 1984). Los polialcoholes, principalmente el glicerol, pero también el arabinitol, eritritol y manitol (Adler *et al*, 1982; Blomberg y Adler, 1989), son producidos en grandes cantidades como respuesta a una baja actividad de agua, y actúan como osmoreguladores intracelulares.

Independientemente de la concentración extracelular, la concentración intracelular de sales permanece prácticamente

constante. Como en las bacterias halofílicas, en Debarvomvces hansenii, se ha observado una marcada capacidad de retener iones  $K^+$  preferentemente a los de  $Na^+$  (Norkrans y Kylin, 1969). Se ha encontrado que los polialcoholes inhiben la actividad enzimática con un menor alcance que otros compuestos a las concentraciones correspondientes (Myers y Jacoby, 1973). Ellos también exhiben un efecto estabilizante en las proteínas, así como un efecto protector en su conformación nativa contra la desnaturalización.

La producción de osmoreguladores en levaduras no ha sido estudiada ampliamente, sin embargo, se tienen noticias de ello para algunas especies en las que se ha encontrado al glicerol como el principal osmoregulador (Adler y Gustaffson, 1980; Adler et al, 1981).

Sacch. cerevisiae, que es una levadura poco halotolerante, también muestra producción de glicerol cuando está sujeta a estrés salino (Blomberg y Adler, 1989), sin embargo, la mayor parte del glicerol que produce se pierde en el medio circundante, observándose por lo tanto una baja capacidad de retener al glicerol intracelularmente, en comparación con otras levaduras más tolerantes al NaCl. La permeabilidad del glicerol está marcadamente influenciada por la composición de los ácidos grasos en los fosfolípidos. Combs et al (1980) encontraron que al incrementarse la concentración de NaCl disminuye la proporción de ácidos grasos insaturados en Candida albicans, lo cual posteriormente fué observado también en Deb. hansenii y Zigosaccharomyces rouxii (Adler et al, 1982; Hamada et al, 1984).

También actúan como osmoreguladores otros polialcoholes y algunos carbohidratos como la trehalosa (Tabla 3). En Deb. hansenii, que es la especie más estudiada, se ha encontrado que el glicerol es el producto osmoregulador en la fase exponencial de crecimiento, mientras que el arabinitol se produce en altas concentraciones durante la fase estacionaria (Adler et al, 1985). En Candida tropicalis, se ha observado que el osmoregulador producido bajo un estrés de cloruro de sodio es la trehalosa (Saubenova et al, 1989).

Se ha observado que el osmoregulador producido por la célula depende en cierta medida del tipo de soluto inductor del estrés osmótico. En Zigosacch. rouxii (sin. Saccharomyces rouxii), se

TABLA 3.

Osmoregulación en levaduras.

<u>Especie</u>	<u>Tipo de stress</u>	<u>Osmoresulador</u>	<u>Referencia</u>
<u>Deb. hansenii</u>	NaCl	Glicerol	Lucas, 1990
<u>Zigosacch. rouxii</u>	NaCl	Glicerol	Van-Zyl, 1990
	PEG	Glicerol- Arabinitol	Van-Zyl, 1990
<u>H. anomala</u>	NaCl	Glicerol	Van-Eck, 1989
<u>C. tropicalis</u>	NaCl	Trehalosa	Saubenova, 1989
<u>Sporid. salmonicolor</u>	NaCl	$\tau$ -Decalactona	Gervais, 1990

**NaCl** = cloruro de sodio, PEG = polietilenglicol.

encontró que al exponer a las células a un medio con alta concentración de cloruro de sodio, el osmoregulador producido es el glicerol. Sin embargo, al exponer a las células a un medio con alta

También actúan como osmoreguladores otros polialcoholes y algunos carbohidratos como la trehalosa (Tabla 3). En Deb. hansenii, que es la especie más estudiada, se ha encontrado que el glicerol es el producto osmoregulador en la fase exponencial de crecimiento, mientras que el arabinitol se produce en altas concentraciones durante la fase estacionaria (Adler et al, 1985). En Candida tropicalis, se ha observado que el osmoregulador producido bajo un estrés de cloruro de sodio es la trehalosa (Saubenova et al, 1989).

se ha observado que el osmoregulador producido por la célula depende en cierta medida del tipo de soluto inductor del estrés osmótico. En Zigosacch. rouxii (sin. Saccharomyces rouxii), se

TABLA 3.

Osmoregulación en levaduras.

Espece	Tipo de stress	Osmoregulador	Referencia
<u>Deb. hansenii</u>	NaCl	Glicerol	Lucas, 1990
<u>Zigosacch. rouxii</u>	NaCl	Glicerol	Van-Zyl, 1990
	PEG	Glicerol- Arabinitol	Van-Zyl, 1990
<u>H. anomala</u>	NaCl	Glicerol	Van-Eck, 1989
<u>C. tropicalis</u>	NaCl	Trehalosa	Saubenova, 1989
<u>Sporid. salmonicolor</u>	NaCl	$\gamma$ -Decalactona	Gervais, 1990

**NaCl** = cloruro de sodio, **PEG** = polietilenglicol.

encontró que al exponer a las células a un medio con alta concentración de cloruro de sodio, el osmoregulador producido es el glicerol. Sin embargo, al exponer a las células a un medio con alta

concentración de polietilenglicol (PEG), el osmoregulador producido no sólo es el glicerol, sino que también se sintetizan cantidades significativas de arabinitol que contribuyen a contrarestar la presión osmótica creada por el medio extracelular (Van Zyl, 1990). Sin embargo, en Deb. hansenii se ha observado que soluciones isotónicas de varios solutos estresantes inducen la acumulación de glicerol a niveles similares (Tabla 4), por lo que en esta especie, la acumulación del glicerol es una respuesta generalizada al estrés osmótico (Adler, 1986).

TABLA 4.

Acumulación de glicerol por Deb. hansenii después de la exposición a **varios solutos estresantes**.

Solutos estresantes	Glicerol intracelular	
	$\mu\text{M mg p.s.}^{-1}$	
	a. 0.9964	a. 0.9927
KCl	0.24	0.44
NaCl	0.25	0.43
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.25	0.44
Sacarosa	0.27	0.49

(Tomado de Adler, 1986).

La alta acumulación intracelular de glicerol y el hecho de que los cambios internos de sales (Norkrans y Kylin, 1969; Hobot y Jennings, 1981), aminoácidos y otros compuestos de bajo peso molecular, no son suficientes para ajustar la presión osmótica del medio extracelular, sugiere que el glicerol tiene el papel fundamental en la osmoregulación de ésta especie.

En Deb. hansenii, la producción de glicerol es inducida osmóticamente, mientras que en Zizosacch. rouxii el glicerol es producido constitutivamente y las células regulan su contenido intracelular alterando la proporción retenida dentro de ellas (Brown, 1978; Van Zyl and Prior, 1990).

#### 2.1.1. Metabolismo del glicerol.

El metabolismo del glicerol, que ha sido ampliamente estudiado en Deb. hansenii, se muestra en la figura 1. Ahí puede observarse que hay dos vías para la degradación del glicerol. Una, es la vía (G3P) que involucra a las enzimas glicerol cinasa (paso A) y glicerol-3-fosfato deshidrogenasa mitocondrial (paso B); y la otra es la vía (DHA) que incluye a las enzimas glicerol deshidrogenasa (paso C) y la dihidroxiacetona cinasa (paso D) (Adler et al, 1985; Nilsson et al, 1989). Evidencias experimentales (Adler, 1986) muestran que la vía DHA es de muy poca importancia para la degradación del glicerol, por lo que se cree que la ruta principal para su degradación es la G3P (Gancedo et al, 1968; Adler et al, 1985; Adler, 1986).

Por otra parte, la producción de glicerol ocurre **vía síntesis** de la dihidroxiacetona fosfato (paso E) en la vía glicolítica, seguida por una reducción de la dihidroxiacetona fosfato por la glicero-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NADP (paso F) y la subsecuente desfosforilación del glicerol-3-fosfato vía fosfatasa (paso G) (Gancedo et al, 1968; Adler et al, 1985; Adler, 1986; Nilsson y Adler, 1990). A diferencia del metabolismo del glicerol

en D. salina, en Deb. hansenii la conversión de dihidroxiacetona a dihidroxiacetona fosfato, es reversible (Brown y Edgley, 1980; Adler, 1986; Ginzburg, 1987). En Zigosacch. rouxii y en Sacch. cerevisiae, la vía responsable de la formación de glicerol es la

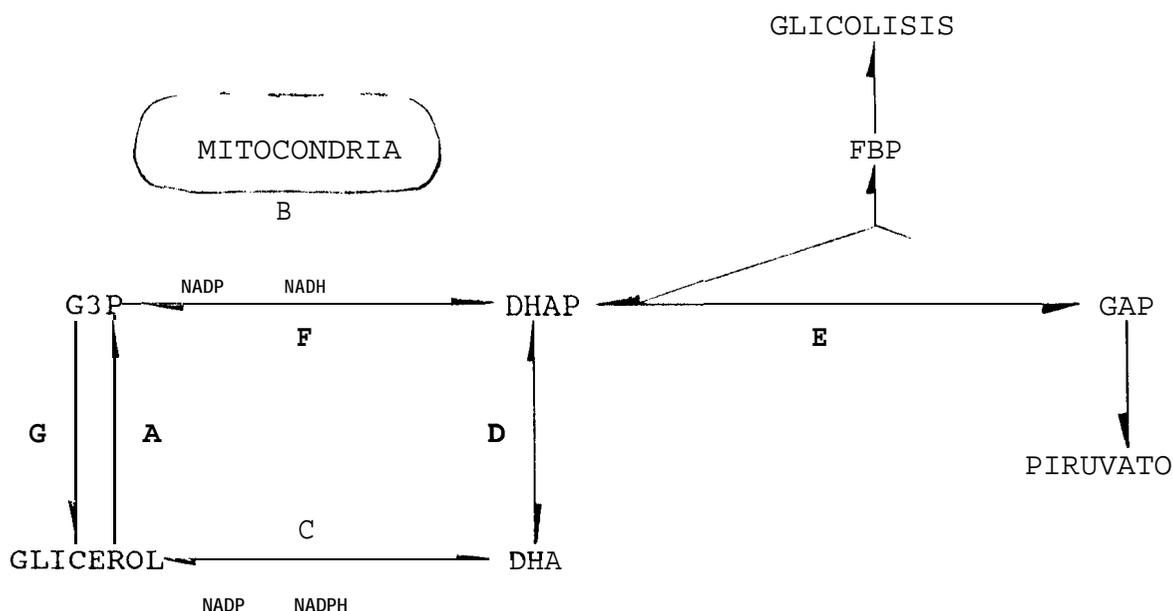


Figura 1. Esquema del metabolismo del glicerol en Deb. hansenii. G3P: glicerol-3-fosfato; DHAP: dihidroxiacetona fosfato; DHA: dihidroxiacetona; GAP, gliceraldehído; FBP, fructosa difosfato; NADPH, nicotinadenina dinucleótido fosfato reducida; NADP, nicotinadenina dinucleótido fosfato. A) glicerol-cinasa; B) glicerol-3-fosfato deshidrogenasa mitocondrial; C) glicerol deshidrogenasa; D) dihidroxiacetona-cinasa; F) glicerol-3-fosfato deshidrogenasa.

de la DHA, sólo que en la última especie es dependiente de  $\text{NAD}^+$  más que de  $\text{NADP}^+$  (Blomberg y Adler, 1992). El glicerol es un producto final regulador cuando las levaduras fermentan azúcar o etanol. Para mantener el balance redox, DHAP es reducida a glicerol.

Por otra parte el crecimiento en glicerol como única fuente de carbono fué demostrado en el 89 % de las 496 cepas de levaduras descritas por Barnett et al (1983). El glicerol es el polialcohol más pequeño que puede funcionar como soluto compatible. Desde el punto de vista de la economía del carbono, la producción de glicerol representa una vía efectiva y poco costosa de osmoregulación. Esta puede ser la razón por la que el glicerol es el osmolito preferido en células en fase exponencial, mientras que en células en fase estacionaria el glicerol comienza a desaparecer y empiezan a ser los compuestos orgánicos intracelulares predominantes otros **polioles** de mayor tamaño. Estos compuestos que son menos permeables que el glicerol, o más fáciles de retener dentro de la célula, no pueden ser completamente sustituidos por el glicerol en términos de contribución al potencial osmótico.

#### 2.1.2. Transporte de polialcoholes.

Un sistema de transporte constitutivo con alta especificidad para el glicerol se ha identificado en Deb. hansenii (Adler et al., 1985; Lucas et al., 1990). Células en ayuno para  $\text{K}^+$  y  $\text{Na}^+$  transportan el glicerol por difusión pasiva, mientras que la adición de estos dos iones origina un transporte de acuerdo a la cinética de Michaelis-Menten (Lucas et al., 1990). El glicerol es

transportado por un sistema de cotransporte (symporter) **sodio-glicerol**, en donde el gradiente transmembranal de Na' deriva de la incorporación del glicerol, que se mantiene por un sistema de contratransporte (antiporter)  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ . Los iones potasio son aceptados como **sustrato** cuando la concentración de  $\text{Na}^+$  es muy baja.

Se sabe poco de los mecanismos por los cuales los polialcoholes de mayor tamaño son introducidos a la célula. Según las observaciones de Canh et al (1975), los polioles de mayor tamaño cruzan la membrana plasmática de Sacch. cerevisiae por difusión pasiva. Sin embargo, la incorporación de manitol en esta especie parece ser energía dependiente, mediada por un sistema acarreador de transporte. Klöppel y Höfer (1976) demostraron que Rh. saccharalis posee un sistema constitutivo de transporte de manitol, xilitol y arabinitol y un sistema de incorporación inducible, con baja afinidad a polioles, por lo que su incorporación está asociada con la absorción de protones.

### 2.1.3. Iones inorgánicos.

En levaduras suceden ajustes de los principales cationes intracelulares en respuesta al estrés osmótico. Los niveles intracelulares de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  en Sacch. cerevisiae varían dependiendo del valor de pH, de la disponibilidad del sustrato y de la concentración de electrolitos en el medio (Rothstein, 1963; Borst-Pauwels, 1981).

En las células en reposo los niveles de estos iones son aproximadamente iguales, mientras que en células en crecimiento, el

nivel de  $\text{Na}^+$  disminuye y el nivel de  $\text{K}^+$  aumenta rápidamente (Jones et al., 1965). En experimentos en quimiostato se ha encontrado que la cantidad de  $\text{K}^+$  permanece mientras que los iones  $\text{Na}^+$  se incrementan concomitantemente con la salinidad; la relación interna  $\text{K}^+/\text{Na}^+$  disminuye de  $>10$  a baja salinidad a  $= 0.5$  en altas salinidades (Larsson et al., 1990). Deb. hansenii ajusta los niveles en corto tiempo en base a un marcado reflujó de  $\text{Na}^+$ , lo que contrasta con el ajuste en un estado estable de crecimiento, en el que están involucrados la disminución de los iones  $\text{Na}^+$  y el incremento en el contenido de glicerol (Hobot y Jennings, 1981).

#### 2.1.3.1 Transporte.

La  $\text{ATPasa-H}^+$  de la membrana plasmática de hongos y levaduras ha sido muy bien caracterizada (Serrano, 1989); esta enzima genera un gradiente electroquímico de protones que provee permanentemente de la fuerza estimulante para el transporte de nutrientes y iones inorgánicos a través de la membrana.

En Sacch. cerevisiae hay evidencias de que la incorporación de  $\text{K}^+$  está estimulada por una bomba electroquímica de protones (Peña, 1975; Eddy, 1982). El sistema de transporte responsable de la incorporación de  $\text{K}^+$  tiene afinidades duales, el gen que codifica para una proteína de la membrana plasmática (TRK1), que es necesaria para la incorporación de alta afinidad de los iones  $\text{K}^+$ , fué recientemente clonado y secuenciado (Gaber et al., 1990). Se cree que los iones  $\text{Na}^+$  entran a la célula levaduriforme a través de acarreadores  $\text{K}^+$ , y probablemente también por contratransporte de

sustrato Na<sup>+</sup>.

Usando registros eléctricos obtenidos mediante el uso de la técnica de "patch-clamp" se ha demostrado la existencia de canales de K<sup>+</sup> voltaje-dependientes en la membrana plasmática de Sacch. cerevisiae (Gustin et al., 1986). Estos canales están conducidos y favorecidos externamente por el paso del ion K<sup>+</sup> por encima del ion Na<sup>+</sup> por más de 20 veces. Gustin et al (1989) identificó en la membrana plasmática de levaduras canales iónicos mecanosensitivos. Estos canales difieren de los canales de K<sup>+</sup> en la sensibilidad de inhibición, conductancia y en su permeabilidad a iones. El tipo de energía que regula estos canales depende del tamaño celular, que induce la regulación por la tensión (o estiramiento) de la membrana plasmática más que por su presión. La existencia de los canales iónicos mecanosensitivos sugieren un mecanismo molecular por el que la tensión de la membrana induce a cambios en la permeabilidad.

#### 2.1.4. Compartimentalización de solutos.

La compartimentalización celular es un aspecto importante de la acumulación de solutos. La presencia de vacuolas en levaduras y hongos filamentosos ofrece a los organismos la posibilidad de segregar iones dentro de estos organelos inertes, y de esta forma, disminuir la concentración de los iones en el citoplasma. En levaduras, la solución vacuolar es isotónica con la del citoplasma, pero su composición es diferente (DÜrr et al., 1975); la vacuola se considera como un compartimiento de almacenamiento de solutos catiónicos (Ca<sup>++</sup>, arginina, lisina, etc..). Existe un confinamiento

selectivo de iones  $\text{Na}^+$  o  $\text{K}^+$  a la vacuola en hongos expuestos a medios salinos. Cuando el crecimiento sucede en un medio diluido, los iones ( $\text{K}^+$  en levaduras) son los principales contribuyentes en las relaciones osmóticas. Siguiendo un shock hiperosmótico, hay un rápido ajuste iónico que resulta en la pérdida de turgencia y volúmen, que es seguida por una larga fase caracterizada por la acumulación selectiva y compensatoria de polialcoholes. Este nivel estable de iones y polialcoholes individuales, aparentemente, depende del soluto estresante y del organismo estudiado.

### 3. JUSTIFICACION

Las características mencionadas en la introducción (producción de solutos compatibles, gran versatilidad en la asimilación de fuentes de carbono, requerimiento nutricional menor al de levaduras terrestres, mayor capacidad de adaptación a medios extremos, etc) hacen que las levaduras halotolerantes sean una buena alternativa para la producción comercial de alcoholes polihídricos (Phaff, 1986). Además, se tiene la ventaja de que al crecer las levaduras en medios extremos (temperatura y/o salinidad), los costos de producción se ven reducidos fuertemente al disminuir los riesgos de contaminación y las necesidades de esterilización, que son los de mayor peso en la obtención a gran escala de productos químicos a partir de microorganismos.

Otra ventaja de utilizar estas levaduras para la producción de químicos finos es que, dada su gran adaptabilidad fisiológica pueden metabolizar fuentes de carbono baratas y en bajas concentraciones, lo que otro tipo de microorganismos son incapaces de aprovechar bajo las mismas condiciones.

Aunado a la importancia que tienen las levaduras extraídas de medios extremos para su explotación comercial, un aspecto importante, es que este trabajo representa una contribución al conocimiento de la biota de las salinas (en especial de la Salina de Pichilínque B.C.S.), y abre una fuente de estudio con respecto al papel de las levaduras en la dinámica de los ambientes hipersalinos. Desafortunadamente, antes de este trabajo no se

habían tenido noticias de aislamientos de levaduras a partir de muestras de agua tomadas de ninguna salina del país, por lo que este trabajo es pionero en ese campo y pretende ser una nueva línea de estudio.

#### 4. OBJETIVO GENERAL

Realizar un estudio en levaduras halotolerantes aisladas de medios ambientes extremos para conocer la naturaleza y cantidad de sus productos osmoreguladores, así como su producción en relación a la concentración de cloruro de sodio en el medio.

##### 4.1 Objetivos específicos.

1. Determinación del crecimiento y de la composición celular de cada una de las cepas:

Velocidad específica de crecimiento

Constituyentes celulares

Osmoreguladores

2. Determinar el efecto de la salinidad y la temperatura en el crecimiento de cada una de las cepas.

3. Determinar el efecto de la salinidad en la composición y producción de osmoreguladores.

## 5. MATERIALES Y METODOS

### 5.1 Area de muestreo.

Las muestras de agua fueron tomadas durante los meses de Enero y Febrero de 1990 de los vasos de cristalización y en la laguna de condensación de la salina que se encuentra en la Isla Sn. Juan Nepomusceno localizada entre los 24'16'5" L.N. y los 110°20'10''L.W. Esta salina que se conoce bajo el nombre de "La Salina de Pichilingue" se encuentra a 23 Km al norte de la Ciudad de la Paz, B.C.S. siguiendo la carretera a Pichilingue (Figura 2).

### 5.2 Organismos de estudio.

#### 5.2.1 Organismos de colección.

Para este estudio se trabajó-con dos cepas de levaduras de la Colección de Levaduras Marinas, del Centro de Investigaciones Biológicas de Baja California Sur, A.C., que corresponden a las especies: Rhodotorula rubra (cepa A18) y Deb. hansenii (cepa C11) (apéndice IV). Se decidió trabajar con la cepa de Rh. rubra por tratarse de una cepa pigmentada (grupo en el que no se han realizado estudios de este tipo) que ha sido incorporada experimentalmente en alimento para camarón. La cepa de Deb. hansenii se tomo como control por ser la especie más estudiada en aspectos de halotolerancia.

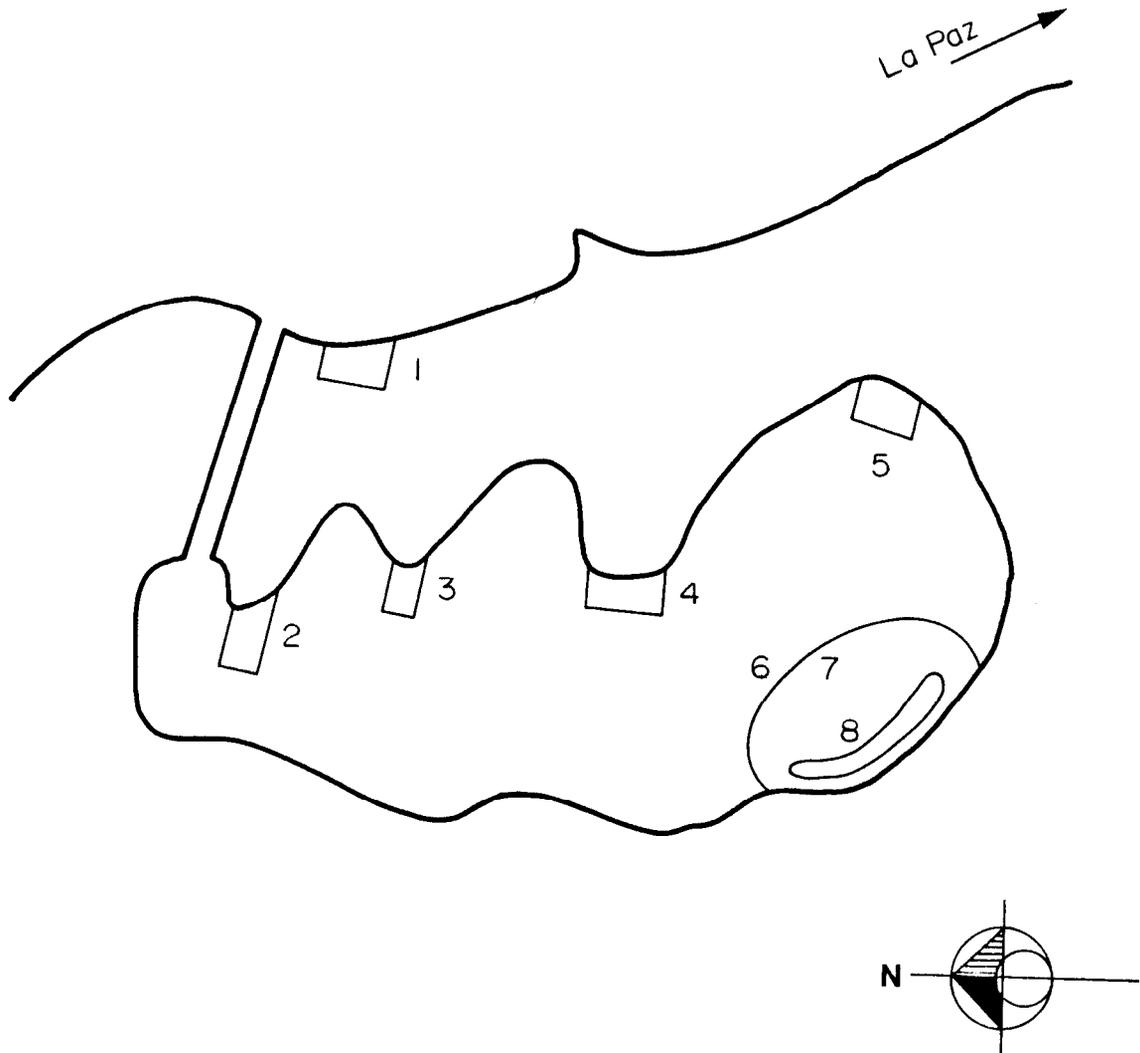


Figura 2. Localización del sitio de muestreo. 1) Transbordadores, 2) PROPEPAZ, 3) Planta desaladora, 4) Puerto de altura, 5) Campo pesquero, 6) Salina de Pichilingue, 7) Vasos de condensación, 8) Laguna de condensación.

### 5.2.2 Aislamientos del medio natural.

Se realizaron dos muestreos en el **area** de estudio. El muestreo 1 se llevó a cabo en el mes de enero de 1990, en cuatro cristalizadores de la salina. El muestreo II se realizó en el mes de febrero de 1990, en tres sitios diferentes de la laguna de condensación de la salina. En cada sitio se colectaron muestras de 200 ml (Figura 2), haciendo un total de siete. Estas, se tomaron en botellas de vidrio transparente con tapón esmerilado de 300 ml de capacidad previamente esterilizadas en autoclave durante 15 minutos a 15 lb/pulg<sup>2</sup> de presión. Se determinó la densidad del agua de cada estación con un gravímetro en una probeta de 500 ml.

### 5.2.3. Técnica de aislamiento.

Para el aislamiento de levaduras se tomaron 10 ml de cada muestra de agua y se inocularon por duplicado (bajo condiciones estériles) en matraces Erlenmeyer de 250 ml de capacidad conteniendo 50 ml de medio LH (Apéndice 1) previamente esterilizado a 15 lb/pulg<sup>2</sup> de presión durante 15 minutos, conteniendo 0, 5, 10, 15 y 20 % de NaCl. Una vez inoculados, los matraces se incubaron a 25°C ( $\pm$  2°C) en agitación orbital constante a 100 rpm durante 15 días.

## 5.3 Purificación.

Una vez que se obtuvo crecimiento en los matraces de aislamiento, se tomó una asada de cada uno y se sembró por estría

cruzada en placas de medio M1 (Apendice 1). Las placas se incubaron a 25°C ( $\pm$  2°C) de 72 a 96 horas.

A partir del crecimiento obtenido en estas placas, se localizaron las diferentes cepas presentes, en base a su morfología colonial, y se reseleccionaron (cada una por separado) en placas de medio M1 hasta obtener cultivos puros.

#### 5.3.1 Mantenimiento.

Las cepas se mantuvieron por duplicado en tubos con agar inclinado (medio M1) a 5°C. Las cepas se subcultivaron haciendo resiembras en forma trimestral.

### 5.4 **Caracterización.**

**Las** cepas obtenidas se caracterizaron siguiendo los criterios establecidos por Van der Walt y Yarrow (1983), los cuales se basan en características morfológicas, en la asimilación de 26 fuentes de carbono, tres fuentes de nitrógeno y en la fermentación de seis carbohidratos. El método utilizado para las pruebas de asimilación de fuentes de carbono y nitrógeno, fué el auxonográfico (Lodder y Kreger van Rij, 1983) modificado por Hernández (1990).

### 5.5 **Determinación del crecimiento.**

#### 5.5.1 Preparación del inóculo.

Para los estudios de crecimiento se inocularon matraces

Erlenmeyer de 250 ml que contenían 50 ml de medio MB (Apéndice 1) sin NaCl con una asada de un cultivo de 24 horas en placa de medio YPG (Apéndice 1). Los matraces se incubaron a 25°C y en agitación orbital constante a 100 rpm durante 36 horas. Posteriormente, las células se cosecharon (manteniendo las condiciones de esterilidad) por centrifugación a 4 000 rpm durante 10 minutos a 5°C. El paquete celular se resuspendió por medio de un vortex en 5 ml de solución isotónica de glucosa estéril y se determinó el número de células con un hemocitómetro o cámara de Neubauer. Se ajustó la densidad celular a  $1 \times 10^8$  cel/ml con solución isotónica de glucosa. Esta suspensión celular se utilizó como inóculo en los experimentos de crecimiento.

#### 5.5.2 Estudios de crecimiento.

En las cinéticas de crecimiento, se utilizó el medio MB con las concentraciones de NaCl correspondientes a cada cepa. Se adicionaron, bajo condiciones de esterilidad, 250  $\mu$ l del inóculo ( $1 \times 10^8$  cel/ml) para obtener una concentración celular final de  $1 \times 10^6$  cel/ml. Los experimentos se realizaron por triplicado y se incubaron a 20, 25 y 30°C en agitación constante a 100 rpm. El crecimiento se determinó por turbidimetría con un espectrofotómetro Spectronic 2000 (Bauch-Lomb) a una absorbancia de 580 nm, a temperatura ambiente y en cubetas de plástico de 1 cm. El crecimiento se monitoreó cada dos horas, hasta alcanzar la fase estacionaria.

Se determinó la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) de

cada cepa bajo las diferentes condiciones de temperatura y salinidad, mediante la fórmula:

$$\mu = \frac{\ln \frac{N_t}{N_0}}{t}$$

donde:  $\ln$  = logaritmo natural;  $N_t$  = número de organismos al tiempo  $t$ ;  $N_0$  = número inicial de organismos;  $t$  = tiempo.

## 5.6 Determinación del peso y del volumen celular.

### 5.6.1 Peso celular.

El peso seco de las células se determinó por triplicado siguiendo el método propuesto por Bauer y Shiloach (1974) usando 500  $\mu$ l de la suspensión celular utilizada como inóculo en los estudios de crecimiento; de esta forma fué posible calcular el peso en miligramos por célula al conocer el peso de un número conocido de ellas.

### 5.6.2 Volúmen.

El volúmen celular se determinó al medir el tamaño de las células mediante un micrómetro en un microscopio óptico a un aumento de 100 X. El volúmen celular se calculó a partir de los datos obtenidos, mediante la fórmula:

$$V = 4/3 \pi h b c$$

donde  $V$  = volúmen,  $\pi$  = 3.1416,  $h$  = alto,  $b$  = ancho y  $c$  = largo.

Es importante mencionar que el volúmen celular se determinó, en todos los casos, bajo las diferentes condiciones de salinidad y temperatura.

## 5.7 Determinación de proteínas, carbohidratos y lípidos totales.

### 5.7.1 Determinación de proteínas totales.

El paquete celular utilizado para determinar el peso seco (la serie de 5 ml) se rehidrató con 3 ml de agua destilada. De esta suspensión celular se tomó 1 ml y se le adicionó 1 ml de hidróxido de sodio 2 N y se puso a reflujo durante una hora. Posteriormente se centrifugaron los tubos a 3 500 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante se recuperó y se neutralizó con ácido clorhídrico 2 N. A esta fracción se le determinó la concentración de proteínas totales por el método tradicional de Lowry (Lowry et al, 1951) (Apéndice II).

### 5.7.2 Determinación de carbohidratos totales.

A una alícuota de 1 ml del paquete celular rehidratado, se le adicionó 1 ml de ácido clorhídrico 2 N. La mezcla se agitó suavemente y se puso a reflujo durante una hora. Posteriormente se determinó la concentración de azúcares totales por el método de la antrona (Yemm y Willis, 1954).

### 5.7.3 Determinación de lípidos totales.

La fase clorofórmica obtenida de la extracción se colocó en viales puestos previamente a peso constante. El cloroformo se evaporó bajo flujo de nitrógeno hasta su completa eliminación. El contenido de lípidos totales se determinó por gravimetría (Vázquez-

Duhalt y Greppin, 1981).

## 5.8 Extracción de Metabolitos de Bajo Peso Molecular (MBPM).

### 5.8.1 Obtención de biomasa.

Se realizaron cultivos, **por** triplicado, en matraces Erlenmeyer de 250 ml conteniendo 50 ml de medio MB. La obtención del **inóculo**, la inoculación y la incubación de los cultivos se realizaron de igual forma y bajo las mismas condiciones experimentales que los estudios de crecimiento, guardando las mismas proporciones. En este caso la cosecha celular se realizó en la fase exponencial de crecimiento.

Se tomaron (por triplicado) 5 y 10 ml de cada cultivo, y se centrifugaron a 4 000 rpm durante 10 minutos a 5°C. El paquete celular obtenido se resuspendió con un vortex en un regulador de fosfatos ( $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ , 6.8 g/l, pH 7.8) isotónico (con NaCl) al medio de cultivo inicial. El paquete celular se lavó, **por** centrifugación, en dos ocasiones más utilizando el mismo regulador. La serie de 5 ml se usó para determinar el peso seco según el método de Bauer y Shiloach (1974).

### 5.8.2 Extracción.

La extracción de los diferentes metabolitos fué realizada de acuerdo con Band et al (1992). Los paquetes celulares de la serie de 10 ml obtenidos del ultimo lavado se transfirieron a tubos Eppendorf de 1.5 ml. El paquete celular se centrifugó a 15 000 rpm

durante 10 minutos en una ultracentrifuga Eppendorf, para eliminar el exceso de líquido. Al paquete celular resultante se le adicionaron 500  $\mu\text{l}$  de una mezcla cloroformo-metanol (1:2) resuspendiéndose con un vortex. Los tubos se almacenaron en reposo a 5°C durante 24 horas (Nurmien y Suomamainen, 1971). Transcurrido el tiempo de reposo, los tubos se centrifugaron a 15 000 rpm durante 10 minutos; el sobrenadante fué colectado. Se realizaron dos lavados más (por centrifugación) con 300 y 200  $\mu\text{l}$  de la mezcla cloroformo-metanol, respectivamente; el sobrenadante obtenido de estos lavados se reunió con el primero.

A partir de este paso, el paquete celular fué desechado y sólo se trabajó con el sobrenadante colectado (fase cloroformo-metanol)

A la fase cloroformo-metanol obtenida se le adicionaron 500  $\mu\text{l}$  de agua destilada; esta solución se agitó vigorosamente con un vortex y posteriormente se centrifugó a 15 000 rpm durante cinco minutos. Se separó la fase clorofórmica resultante, de la fase metanol-agua que fué mantenida durante 5 minutos a 100°C y utilizada posteriormente en la determinación de aminoácidos, proteínas, carbohidratos y glicerol.

## 5.9 Determinación de MBPM.

### 5.9.1 Determinación de proteínas.

Se determinó el contenido de proteínas en la fase metanol-agua obtenida de la extracción, por la técnica espectrofotométrica denominada Micro-Lowry (Apéndice II), que es una modificación de la

técnica original descrita por Lowry (Lowry et al, 1951) usando Albumina Sérica Bovina (BSA) como estándar.

#### 5.9.2 Determinación de carbohidratos.

El contenido de carbohidratos se determinó en la fase metanol-agua por el método espectrofotométrico de la antrona (Yemm y Willis, 1954), usando D-glucosa como estándar (Apéndice II).

#### 5.9.3 Determinación de aminoácidos libres.

La cantidad de aminoácidos libres contenida en la fase metanol-agua se realizó por el método espectrofotométrico de la ninhidrina (Rosen, 1957), utilizando DL-metionina como estándar, con un volumen de ensayo final de 1 ml (Apéndice II).

#### 5.9.4 Determinación de glicerol.

El contenido de glicerol presente en las muestras de la fase metanol-agua se determinó por el método espectrofotométrico descrito por Sastry (Sastry y Kates, 1964), usando glicerol como estándar (Apendice 2).

#### 5.10 Cálculo de la presión osmótica.

La presión osmótica ejercida por cada metabolito se calculó de la siguiente manera:

1. Los datos de concentración de aminoácidos y glicerol, en  $\mu\text{M}/\text{mg}$  de peso seco (p.s.) se convirtieron a  $\mu\text{g}/\text{mg}$  p.s. al

multiplicar los valores obtenidos en cada caso por 147.1 (peso molecular del ácido glutámico, aminoácido más abundante en levaduras) y 92.1 (peso molecular del glicerol), que corresponden a los  $\mu\text{g}/\mu\text{M}$  de cada compuesto (Jímenez-Vargas y Macarulla, 1979).

$$(\mu\text{M}/\text{mg p.s.}) (\mu\text{g}/\mu\text{M}) = \mu\text{g}/\text{mg p.s.}$$

En el caso de los carbohidratos, los valores se dejaron igual ya que la técnica de cuantificación nos da directamente  $\mu\text{g}$ .

2. El contenido de cada compuesto, ahora en  $\mu\text{g.mg p.s.}$ , se multiplica por el peso en mg p.s. de una célula, para obtener la concentración en  $\mu\text{g}$  de cada compuesto en una célula.

$$(\mu\text{g}/\text{mg p.s.}) (\text{mg p.s./cel.}) = \mu\text{g}/\text{cel.}$$

3. El valor obtenido, en  $\mu\text{g}/\text{cel}$ , se multiplica por el volúmen en  $\mu^3$  de una celula, para obtener la cantidad en  $\mu\text{g}$  del compuesto por unidad de volúmen celular.

$$(\mu\text{g}/\text{cel}) (\text{cel}/\mu^3) = \mu\text{g}/\mu^3$$

4. Finalmente, este valor se divide entre  $10^6$  (que son los  $\mu\text{g}$  que hay en un gramo) y se multiplica por  $10^{15}$  (que son las  $\mu^3$  contenidas en un litro) para obtener la concentración del compuesto en gr/lt.

$$(\mu\text{g}/\mu^3) (\text{gr}/10^6\mu\text{g}) (10^{15} \mu^3/\text{lt}) = \text{gr}/\text{lt.}$$

Para calcular la presión osmótica ejercida por cada metabolito (glicerol y carbohidratos) y por el NaCl se consultaron las tablas de las propiedades conservativas de las soluciones acuosas (Weast, 1986), a partir de las cuales se calculó la fórmula que describe la relación entre la concentración anhidra de cada compuesto (en

gr/lt) y la osmolaridad (en osmios/kg de agua) que ejerce cada uno (Apéndice III).

Para la determinación de la osmolaridad de los carbohidratos, la tabla utilizada fué la de la glucosa, por ser el azúcar universal: y en el caso del NaCl y el glicerol se utilizaron las tablas correspondientes. Para calcular la presión osmótica que ejerce la concentración de aminoácidos intracelulares se usó la tabla con las concentraciones isosmóticas de la lisina y el NaCl dadas por Bonner (1982) (Apéndice III).

#### 4.11 Análisis **estadístico**

Todos los resultados se sometieron a análisis de varianza de dos vías utilizando el paquete estadístico STATGRAPHICS versión 5.0 con un intervalo de confianza de  $p = 0.05$ .

## 6. RESULTADOS Y DISCUSION

### 6.1 Aislamiento

Los resultados obtenidos en los muestreos realizados en la salina se observan en las tablas 5 y 6. En el muestreo 1 (Tabla 5), no se obtuvo ningún aislamiento positivo para levaduras, a pesar de que en la muestra de la estación número 3 hubo crecimiento en el medio de aislamiento con 5% de NaCl. En este caso se trató de una bacteria cocoide gram (+). En la muestra 1, en el medio con 5% de NaCl también se obtuvo crecimiento, pero aquí el aislamiento fue un hongo filamentoso. El hecho de que no se obtuvieran aislamientos positivos de levaduras a partir de las muestras tomadas de los cristalizadores, indica que en estos medios con densidades entre 1.25 - 1.29 (Tabla 5) no pueden subsistir células levaduriformes. La densidad del agua en los cristalizadores no sólo está dada por la concentración de NaCl, sino por otras sales minerales como la calcita, el yeso y las potasas (Javor, 1989 b); estas últimas principalmente las sales de Mg y K, tienen un efecto negativo en el desarrollo de los microorganismos. Otra observación que es importante recalcar, es la coloración de los cristalizadores muestreados. Los cristalizadores 1 y 2 (muestras 1 y 2) presentaron una coloración verde-agua, mientras que los cristalizadores 3 y 4 (muestras 3 y 4) mostraron una coloración rosada. La coloración de los cristalizadores está dada por los microorganismos que los colonizan (en sucesiones), lo que es un indicador de su estado

**Tabla 5.**

Muestreo 1 realizado en los cristalizadores de la Salina de Pichilingue en enero de 1990.

Muestra	Densidad (g/ml)	NaCl %		
		5	10	15
1	1.25	H		
2	1.29			
3	1.27	B		
4	1.28			

(-): sin crecimiento; (H): hongo filamentoso; (B): bacteria.

**Tabla 6.**

Muestreo II, realizado en la laguna de condensación de la Salina de Pichilingue en febrero de 1990.

Muestra	Densidad (g/ml)	NaCl %				
		0	5	10	15	20
1	1.06	+	H			+
2	1.21					
3	1.09	+	+	B	B	

(+): crecimiento positivo; (-): sin crecimiento;  
(H): hongo filamentoso; (B): bacteria.

dentro del proceso de precipitación. Para el caso de los cristalizadores muestreados, su coloración indica que su proceso de precipitación de sales era muy avanzado.

En los cristalizadores rosados, se presume que estaba ocurriendo la precipitación del NaCl, lo que implica que los iones Na<sup>+</sup> y Cl<sup>-</sup> no eran los más abundantes; la halita (NaCl) es el tercer mineral evaporítico que se precipita en la secuencia de precipitación, le preceden el CaCO<sub>3</sub> y el CaSO<sub>4</sub> · 2 H<sub>2</sub>O (Javor, 1989 b). En los cristalizadores verdes, estaba ocurriendo la precipitación de los minerales de K-Mg (KCl y KCl·MgCl<sub>2</sub> · 6 H<sub>2</sub>O), que son los últimos en precipitar dentro de la secuencia de precipitación de minerales evaporíticos (Javor, 1989 b). Por lo tanto, no es extraño no haber obtenido el material biológico de nuestro interés a partir de las muestra tomadas en ellos, pues los compuestos presentes en las muestras se presume (por referencias bibliográficas) eran los más tóxicos para los organismos en soluciones concentradas (Javor, 1989 b).

Por otra parte, la microflora de los cristalizadores está caracterizada por la presencia de cianobacterias, algas verdes unicelulares, dinoflagelados, diatomeas, protozoarios, bacterias fototróficas y halófilas, y en raras ocasiones hongos (Javor, 1989 c), por lo que es raro encontrar levaduras con una alta frecuencia. Sin embargo, se escogió este sitio de muestreo para tratar de encontrar organismos altamente adaptados a este tipo de ambientes, desafortunadamente no se encontraron.

En el muestreo II (Tabla 6) se obtuvieron aislamientos para

levaduras. Aquí fueron seis las muestras que presentaron crecimiento, sin embargo, sólo en cuatro estuvieron presentes las levaduras. En las otras dos muestras volvieron a presentarse bacterias cocoides gram (+). De la muestra 1 (denotada por la letra P en el código de cada cepa) en el medio de aislamiento sin NaCl (primer dígito del código de cada cepa que denota la salinidad del medio de aislamiento) se obtuvieron dos cepas (P01 y P02), y con el 20% de NaCl se obtuvo sólo una (P20). De la muestra 2 no se obtuvo ningún aislamiento, esto debido probablemente a la densidad del agua (1.21), que para las levaduras parece ser muy alta, ya que no permite su desarrollo bajo estas condiciones. De la muestra 3 (denotada en el código de cada cepa por la letra E) se obtuvo una cepa en el medio de aislamiento sin NaCl (E0) y dos en el que contenía 5% (E51 y E52), de esta forma el número total de cepas de levaduras aisladas fué seis. En el caso de las muestras de las que se obtuvieron aislamientos de levaduras, como se muestra en la tabla 6, la densidad registrada no es mayor de 1.10.

Al comparar estos valores con los registrados en las muestras de las que no se obtuvieron levaduras, es fácil observar que en ellas las densidades son siempre mayores a 1.20; lo cual nos permite concluir que en densidades mayores de 1.20 es muy poco probable encontrar levaduras, mientras que en aguas con densidades menores a 1.10, la probabilidad de obtener aislamientos de esta naturaleza es alta.

## 6.2 Caracterización y determinación taxonómica.

Se caracterizaron las seis cepas de levaduras obtenidas en los muestreos, según los criterios de Van der Walt y Yarrow (1983) agrupándose en los órdenes Blastomycetales (4 cepas), Endomycetales (1 cepa) e Hypomycetales (1 cepa), que al ser identificadas, usando las claves para géneros y especies que no requieren características de reproducción sexual (Kreger van Rij, 1983) corresponden a cuatro géneros (Cryptococcus, Candida, Hansenula y Aureobasidium), cinco especies y dos variedades (Tabla 7). Las particularidades fisiológicas, morfológicas y bioquímicas de cada cepa se presentan en el apéndice IV. De los géneros obtenidos en el aislamiento, sólo Candida y Hansenula aparte de ser frecuentes en medios marinos (Norkrans, 1966; Van Uden y Fell, 1968) son también encontrados en medios con altas concentraciones de sales (Tilbury, 1980; Lindman 1981 a; Javor, 1989 a); los géneros Cryptococcus y Aureobasidium sólo han sido reportados en ambientes marinos y estuarinos (Norkrans, 1966; Van Uden y Fell, 1968; Meyers et al, 1968). Según la clasificación de los microorganismos halotolerantes dada por Larsen (1986), las dos variedades de Cr. albidus, Candida sp y Rh. rubra (cepa A 18) corresponden a microorganismos ligeramente halotolerantes; Hansenula sp. y Deb. hansenii (cepa C 11) a organismos moderadamente halotolerantes y finalmente, A. pullulans pertenece al grupo de los microorganismos extremadamente

Tabla 7.

Ubicación taxonómica de las cepas de levaduras aisladas de muestras de agua tomadas de la laguna de condensación de la Salina de Pichilingue, B.C.S.

Cepa	Orden	Especie
P01	Blastomycetales	<u>Cr. albidus var. aerius</u>
P02		<u>Cr. macerans</u>
E01	"	<u>Cr. albidus var. albidus</u>
E51		<u>Candida sp.</u>
E52	Endomycetales	<u>Hansenula sp.</u>
P20	Hypomycetes	<u>A. Pullulans</u>

Tabla 8.

Salinidades de aislamiento, intervalos de tolerancia máxima al cloruro de sodio y salinidades experimentales de las especies de levaduras trabajadas.

Especie	Clave	S.A. (%)	I.T.S. (%)	S.P. (%)
<u>Cr. albidus a.</u>	E01	cero	0.0 - 10	0-4-8-10
<u>Cr. macerans</u>	P01	cero	0.0 - 12	N.D.
<u>Candida sp.</u>	E51	5	0.0 - 12	0-3-9
<u>Hansenula sp.</u>	E52	5	0.0 - 17	0-5-10-14
<u>A. pullulans</u>	P15	20	0.0 - 25	0-3-6-12-24
<u>Deb. hansenii</u>	C11	3	0.0 - 18	0-5-10-14
<u>Rh. rubra</u>	A18	3	0.0 - 12	0-4-8-12

S.A. = salinidad de aislamiento, I.T.S. = intervalo de máxima tolerancia al NaCl, S.P. = salinidades de ensayo.

halotolerantes. La tolerancia a la salinidad observada no es muy diferente entre las especies, encontrándose entre cero y 18% (Tabla 8). La excepción ocurre con la cepa de A. pullulans, que tiene un intervalo máximo de tolerancia a la salinidad aún mayor; va de cero hasta 25% de cloruro de sodio (Tabla 8). La similitud entre los intervalos de tolerancia al cloruro de sodio observados se debe probablemente a que el medio del que fueron aisladas las cepas era más o menos homogéneo en lo que se refiere a densidad, variando de 1.06 a 1.09 (Tabla 6).

### 6.3 Crecimiento.

Para determinar experimentalmente el grado de osmotolerancia de una célula se utilizan criterios de sobrevivencia y producción de gas: mientras los criterios de sobrevivencia dan actividades de agua más bajas, el crecimiento se ha reportado como la característica más osmosensitiva.

La tasa de incremento en biomasa parece ser un parámetro relevante para estudiar la medida en que son afectadas las células por los cambios en la actividad de agua ( $a_w$ ). En estudios realizados por diferentes autores (Anand y Brown, 1968; Scott, 1957) se encontró que una respuesta generalizada de las células expuestas a medios con diferentes valores para el potencial hídrico es la presencia de tres valores denominados cardinales, en los que el crecimiento observado es máximo a un potencial hídrico dado ( $Y_{opt}$ ) y menor a un potencial hídrico máximo ( $Y_{max}$ ) tolerado por la

célula, y a uno mínimo ( $Y_{\min}$ ). Estos resultados nos permiten diferenciar fácilmente entre cepas halotolerantes y halofílicas. Por ejemplo, algunas cepas de levaduras crecen más rápido en altos potenciales de agua con valores de  $Y_{\text{opt}}$  más cercanos al  $Y_{\text{max}}$  que al  $Y_{\min}$ , es decir, sólo toleran bajos potenciales de agua por lo que se les considera como cepas osmotolerantes.

El crecimiento de las levaduras bajo un incremento en la temperatura es posible por el aumento en la acumulación de solutos compatibles durante el crecimiento a bajas actividades de agua. Estos solutos intracelulares estabilizan las proteínas contra la desnaturalización térmica in vitro, por lo que se evitan los efectos nocivos en las células originados por la temperatura. Las especies incapaces de crecer a altos potenciales hídricos podrían sufrir la desnaturalización de sus proteínas a la temperatura estresantes, y el crecimiento sólo podría darse por una disminución en el potencial hídrico o por una baja en la temperatura.

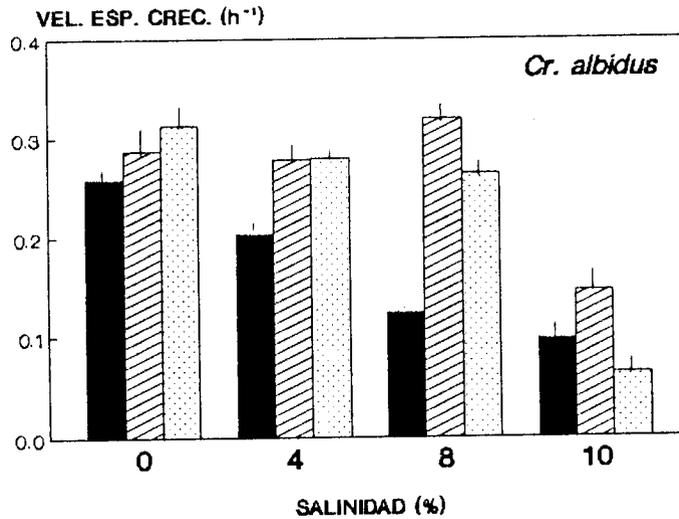
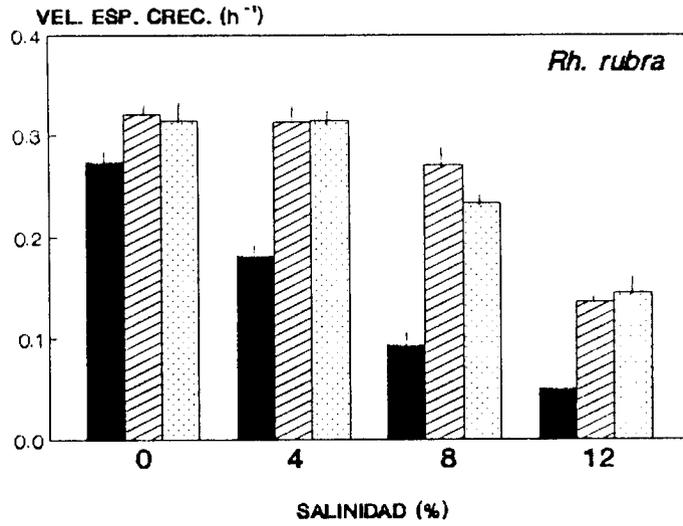
Scott (1957) propuso la idea de un  $Y_{\text{opt}}$  soluto dependiente, ya que encontró que la velocidad específica de crecimiento está relacionada con la naturaleza del soluto. Otro descubrimiento aparentemente general de Anand y Brown (1968) es que la mayoría de las levaduras osmotolerantes tienen una velocidad específica de crecimiento mucho menor que aquella de las cepas no osmotolerantes. La media de los tiempos de generación para las especies osmotolerantes fué de 4 - 8 hr mientras que aquellas de las especies no osmotolerantes fluctua entre 1.5 y 2 hr; este tipo de comportamiento fué observado en este estudio en donde la cepa más

halotolerante (A. pullulans) tiene tiempos de duplicación significativamente mayores (32.85 horas en las condiciones de crecimiento más extremas, 20°C y 24 % de NaCl en el medio de cultivo) que las de especies menos halotolerantes (datos no mostrados). No obstante, no se ha dado ninguna explicación reelevante a esta observación.

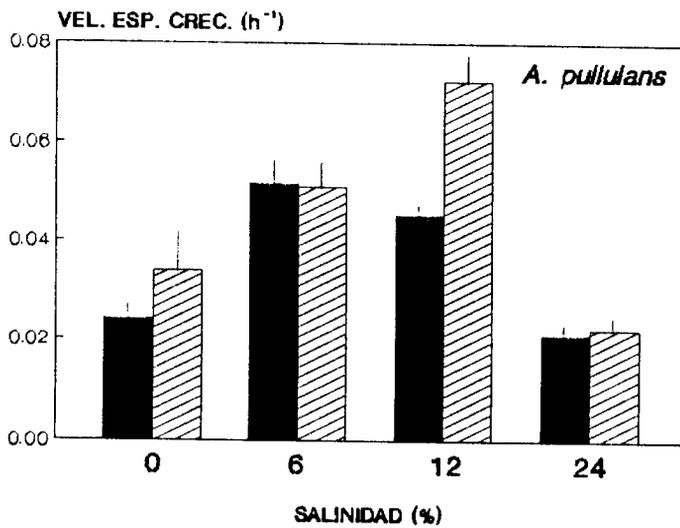
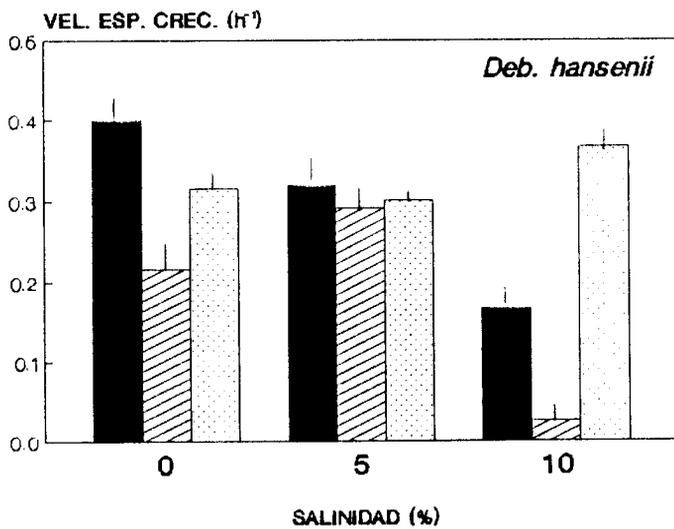
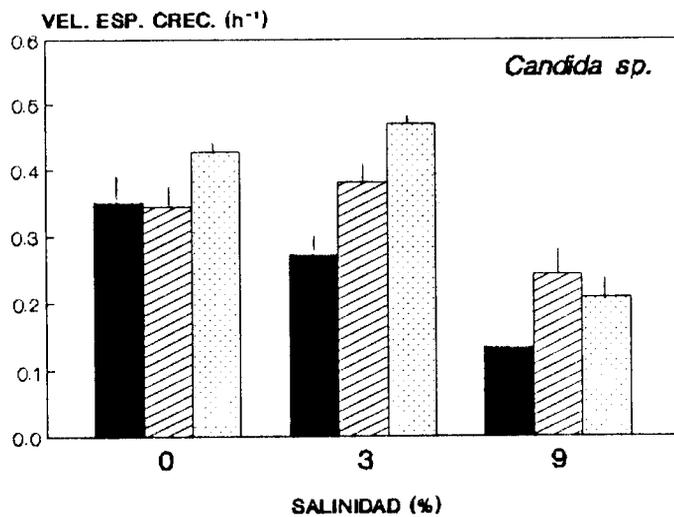
Onishi (1957) encontró que el valor del pH también influencia fuertemente la habilidad de las células para crecer en medios con baja  $a_w$ . Mientras Zigosacch. rouxii se desarrolla adecuadamente en un amplio intervalo de pH en altas actividades de agua (pH 3 - 7), en un medio con baja  $a_w$  ajustado con NaCl el intervalo se reduce a 4 - 5.

El crecimiento de las diferentes especies estudiadas, expresado en velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ), bajo diferentes condiciones de temperatura y salinidad, se muestra en la figura 3. Para todas las especies, excepto A. pullulans, la salinidad tiene un claro efecto negativo en el crecimiento a una temperatura de 20°C, mientras que a las otras dos temperaturas ensayadas el comportamiento de cada especie es mas o menos particular.

Para el caso de Rh. rubra y Cr. albidus var. albidus (figura 3), al aplicar un análisis de varianza de 2 vías ( $p \leq 0.05$ ) se encontró que no existen diferencias significativas entre los datos obtenidos a 25 y 30°C, pero si hay diferencias entre estos y los observados a 20°C. A 20°C existen diferencias significativas entre todas las condiciones de salinidad probadas, observándose un efecto



**Figura 3.** Efecto de la concentración de NaCl en la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) de las cinco especies estudiadas. ■ 20°C, ▨ 25°C y ▩ 30°C.



inversamente proporcional, del incremento en la salinidad, en la velocidad específica de crecimiento. Sin embargo en Rh. rubra, a temperaturas cálidas (25 y 30°C) no existen diferencias entre las observaciones con cero y 4% de cloruro de sodio; el efecto de la salinidad sólo es evidente (en el crecimiento) a partir de una concentración del 8%. Para esta especie, un incremento de 5°C (a partir de los 20°C) se traduce en un mejor crecimiento, aumentando la  $\mu$ , lo que implica que su crecimiento se ve significativamente favorecido a temperaturas cálidas. El organismo se encuentra en un ambiente más adecuado para su desarrollo bajo estas condiciones de temperatura, de esta forma su metabolismo puede contrarrestar los efectos de una concentración de NaCl del 4 % para Rh. rubra y 9 % para Cr. albidus var. albidus, sin un gasto energético excesivo que se vea reflejado en su crecimiento, ya que al igual que en este estudio Norkrans (1966) observó que el crecimiento de algunas especies de los géneros Rhodotorula y Cryptococcus no se favorece a bajas temperaturas. Una concentración del 8 % de NaCl a temperaturas mayores de 25°C afecta significativamente el crecimiento de Rh. rubra, y una concentración de 12 % de NaCl merma de forma significativa el crecimiento de Cryptococcus. Bajo estas condiciones de salinidad y temperatura, las proteínas celulares pueden ya no ser funcionales y/o los requerimientos energéticos de la célula son lo suficientemente grandes que afectan significativamente su crecimiento.

El caso de A. pullulans (figura 3) es especial, de todas las especies estudiadas fué la que presento las  $\mu$  más bajas, sin

embargo, también fué la que creció a una mayor concentración de NaCl (Tabla 6). Para esta especie, el incremento de la salinidad se traduce en una mejora en el crecimiento (en las dos temperaturas probadas), hasta una concentración del 12 % de NaCl; a una salinidad mayor (24 % de NaCl) la  $\mu$  disminuye significativamente ( $p \leq 0.05$ ) aún respecto al control sin NaCl. Para esta especie, la temperatura de crecimiento observada como óptima fue a 25°C, ya que al realizar los cultivos a 30°C no se observó crecimiento bajo ninguna condición de salinidad. Al observar estos resultados es evidente que esta especie necesita una concentración de aproximadamente 12 % de NaCl para desarrollarse en condiciones óptimas, sin embargo, esta observación no es definitiva puesto que se desconoce su comportamiento a salinidades intermedias entre 12 y 24 % de NaCl.

Por otra parte, siguiendo el modelo de Anand y Brown (1968) y Scott (1957) en esta especie se observa la diferenciación entre los tres valores cardinales del potencial hídrico, tratándose de una especie ligeramente halofílica puesto que el  $Y_{opt}$  (12 % NaCl) se encuentra muy próximo al  $Y_{min}$  (24 % NaCl).

Para Candida sp. (figura 3) a temperaturas mayores de 25°C, en todos los casos de salinidad el crecimiento observado fué mejor que a 20°C. Sin embargo, el efecto de la salinidad no se correlaciona con el crecimiento, observándose una mejora a una concentración de NaCl del 3 % a 25 y 30°C. Para esta especie la temperatura óptima de crecimiento dentro de las tres probadas fué 30°C. Evidentemente, el crecimiento de esta especie es mejor a una

salinidad que se encuentra comunmente en el medio marino, por lo cual también sería interesante conocer su comportamiento a una concentración de NaCl del 4 %, pues es el intervalo de salinidad más frecuente en ese tipo de ambientes. Esta observación nos indicaría su origen marino, si recordamos la definición de levaduras marinas dada por Kreger van Rij (1979). En esta especie también se observan bien definidos los tres puntos cardinales de potencial hídrico, tratándose en este caso de una levadura halotolerante puesto que el  $Y_{opt}$  (5 % NaCl) está muy cercano al  $Y_{max}$  (0.0 % NaCl).

En Deb. hansenii (figura 3) a 30°C no se observa un efecto significativo ( $p \leq 0.05$ ) del incremento de la salinidad en el crecimiento; a 25°C se presenta un comportamiento semejante al de Candida sp. a 25°C, en donde el crecimiento óptimo a esta temperatura se observa a una concentración de NaCl del 5 %, en donde este es el  $Y_{opt}$ , y el  $Y_{max}$  se encuentra a una concentración de NaCl del 0.0 %, por lo que también esta especie puede considerarse como una levadura halotolerante.

Todas las consideraciones anteriores nos hablan de que la temperatura es un factor vital, estrechamente relacionado con la halotolerancia de cada especie. Aunque esta aseveración parece simple, el hecho es que estamos ante un fenómeno muy complejo que involucra además del efecto de la salinidad y la temperatura, las particularidades fisiológicas de cada especie, pues no todas responden de la misma forma a los mismos estímulos. En general, las variaciones de temperatura (en este caso el incremento) provocan

dos efectos en levaduras: a) que el crecimiento se mejore a pesar de una "x" concentración de NaCl o, b) que la concentración de NaCl no tenga efecto alguno en el crecimiento de cada especie. No obstante lo anterior, si se puede generalizar en el sentido de considerar a la halotolerancia como un fenómeno fuertemente termodependiente.

En general, se observan tres grupos de comportamiento en las especies estudiadas en relación a su crecimiento bajo diferentes condiciones de salinidad y temperatura, dados probablemente por sus relaciones taxonómicas (que involucra sus propiedades bioquímicas y fisiológicas) y por lo tanto filogenéticas. Dentro del primer grupo natural se encuentran las dos especies pigmentadas, Rh. rubra y Cr. albidus var. albidus, que pertenecen a la familia Cryptococcaceae. En el segundo grupo, están consideradas las cepas de Deb. hansenii y Candida sp. Aunque Candida sp. taxonómicamente corresponde al grupo anterior, puede ser el estadio imperfecto de alguna especie de la clase Ascomycetes, orden Endomycetales, familia Saccharomycetaceae a la que pertenece Deb. hansenii, lo cual no es raro. El tercer grupo de comportamiento lo representa A. pullulans que no es considerada como una levadura típica. Esta especie está considerada dentro del grupo taxonómico Hypomycetes, ya que es un organismo levaduriforme. De las especies estudiadas, es la que taxonómicamente se encuentra más aislada, razón por la que no se ajusta a ninguno de los grupos anteriores.

#### 6.4 Volúmen celular.

La respuesta inicial de las células de levaduras sujetas a medios con baja  $a_w$  es la pérdida de agua, además, se ha observado que la respuesta del tamaño celular a los cambios en la  $a_w$  del medio es reversible.

El efecto de la concentración de cloruro de sodio en el volúmen celular de las especies estudiadas se muestra en la tabla 9. Como se ha reportado con anterioridad, un incremento en la salinidad se traduce en un pronunciado y continuo decremento en el volúmen celular (Lidman, 1981 a y b), lo cual fué observado en todas las especies consideradas en este estudio. La mayor tasa de pérdida de volúmen (m) con respecto al incremento de la salinidad, fué observada en Cr. albidus var. albidus y la segunda en importancia se presentó en Rh. rubra. Coincidentemente, estas dos especies son las que mostraron tamaños celulares mayores (tabla 9), lo que indica que ambas tienen una pérdida de líquido intracelular considerable. No obstante, en Cr. albidus var. albidus la pérdida de volúmen es proporcional al incremento de la salinidad. Para Rh. rubra no es así, pues bajo una concentración de NaCl del 4 % la pérdida de volúmen es del orden del 60 %, como se ha reportado con anterioridad para Sacch. cerevisiae (Niedermayer et al., 1977). Al incrementarse la salinidad a 8 y 12 % de NaCl la pérdida de volúmen no es mayor al 4 % con respecto a la observada a 4 % de salinidad. El hecho de que la pérdida de volúmen no sea gradual, se refleja en el índice de correlación ( $r$ ) encontrado en cada caso. El

comportamiento antes mencionado implica que la respuesta de la célula a una concentración de 4 % es principalmente por pérdida de líquido intracelular, y a salinidades mayores se activan otros mecanismos que ayudan a balancear la presión osmótica intracelular con respecto a la del medio extracelular, como se verá más adelante.

En las especies restantes, la pérdida de volumen es gradual, lo que se confirma al observar los índices de correlación calculados que son, en todos los casos, superiores a 0.9. Al observar estos resultados y por referencias bibliográficas (Ginzburg, 1987, Lindman, 1981 a y b) puede deducirse que la pérdida de líquido intracelular, para balancear la presión osmótica interna con respecto al exterior, es inmediata. La velocidad de esta respuesta es consecuencia de la alta permeabilidad de las membranas biológicas al agua. El coeficiente de permeabilidad del agua en D. salina, eritrocitos humanos y membranas lipídicas vesiculares producidas artificialmente es  $2 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ , sin embargo, la permeabilidad a los solutos es generalmente mucho más baja; por ejemplo, el coeficiente de permeabilidad para azúcares y iones  $\text{Na}^+$  es de alrededor de  $10^{-7}$  y  $10^{-11}$  respectivamente (Stein, 1986). La cantidad de agua que deja la célula, como respuesta a una baja  $a_w$  extracelular, se ve afectada por las propiedades elásticas de la pared celular y la presión de turgencia inicial. La elasticidad de la pared celular varía de acuerdo al estadio de crecimiento, siendo más elástica en la fase estacionaria. En consecuencia, la elasticidad de la pared celular permite un 20 % de disminución del

TABLA 9.

Efecto de la concentración de NaCl en el tamaño y volúmen celular de varias especies de levaduras.

<u>Rh rubra</u> ( $1.0556 \times 10^{-8}$ mg/cel)				
NaCl (%)	V. c. ( $\mu^3$ )	P.V. (%)	a ( $\mu$ )	b ( $\mu$ )
0	53.014	0	2.50	2.250
4	21.250	59.91	1.83	1.660
8	20.689	60.97	1.75	1.680
12	19.271	63.65	1.87	1.568
$y = -2.54 x + 43.82; \quad r = 0.80$				
<u>A. pullulans</u> ( $6.5682 \times 10^{-9}$ mg/cel)				
0	32.986	0	3.50	1.500
3	25.738	21.97	3.25	1.375
6	20.117	39.01	2.09	1.515
12	18.778	43.07	2.75	1.276
24	10.269	68.86	2.37	1.016
$y = -0.83 x + 29.11; \quad r = 0.94$				
<u>Cr. albidus var. albidus</u> ( $3.2371 \times 10^{-8}$ mg/cel)				
0	162.571	0	3.50	3.330
5	139.726	14.05	3.33	3.165
10	115.917	28.69	2.62	2.375
$y = -4.66 x + 162.73; \quad r = 0.99$				

---

Deb. hansenii ( $4.47 \times 10^{-9}$  mg/cel)

---

0	22.449	0	1.75	1.750
5	20.128	10.33	1.68	1.685
10	10.889	45.90	1.37	1.375
14	9.854	56.10	1.33	1.333

$$y = -1.007 X + 23.134; \quad r = 0.95$$


---

Candidasp. ( $3.5186 \times 10^{-9}$  mg/cel)

---

0	17.671	0	1.87	1.500
3	13.089	25.92	2.00	1.250
6	6.283	64.44	1.50	1.000

$$y = -1.898 X + 18.04; \quad r = 0.99$$


---

V.C. = volúmen celular, P.V. = pérdida de volúmen con respecto al control (0.0 % de NaCl), a = radio celular mayor, b = radio celular menor, y = volúmen celular, x = concentración de NaCl del medio, r = índice de correlación.

tamaño celular antes del punto de plasmólisis incipiente. Teóricamente, este tipo de respuesta es la primera en aparecer al someter a la célula a un bajo  $a_w$ , sin embargo, se considera que el volúmen celular se recupera al sintetizarse, y/o acumularse, intracelularmente algún metabolito o soluto compatible que equilibre la presión interna con respecto al medio externo (Ginzburg, 1987).

Si esta aseveración fuera considerada textualmente, se esperaría que únicamente con la pérdida de volúmen las células serían capaces de equilibrar la presión osmótica interna con la del medio exterior, o que se trata de especies no halotolerantes, ya que de sintetizarse algún metabolito con funciones osmoreguladoras el volúmen celular normal sería recuperado. En la naturaleza, especialmente en levaduras, no ocurre así; en la osmoregulación de estos microorganismos están involucrados tanto los ajustes en el volúmen celular como la producción de metabolitos con funciones osmoreguladoras, a lo que los autores no le han dado importancia; ellos consideran a la producción de solutos compatibles osmoreguladores como el único fenómeno responsable de la halotolerancia en estos microorganismos. En estudios con microscopia electrónica se han observado grandes depresiones en la membrana plasmática, siempre asociadas a la deshidratación. Estas depresiones se observaron siempre asociadas con las invaginaciones típicas de la membrana plasmática de las células durante su crecimiento en medios con baja  $a_w$ . En Sacch. cerevisiae deshidratada osmóticamente no se observó plasmólisis, pero la pared

celular apareció rugosa. En este estudio no fueron realizadas observaciones tan finas en las células, sin embargo, para estudios futuros sería interesante realizarlas y así tener una idea integral del fenómeno.

#### 6.4.1 Morfología celular

Otra de las consideraciones reportadas en cuanto al comportamiento de las células expuestas a estrés salino, es la modificación de su forma al aumentar su excentricidad elipsoidal concomitantemente con la salinidad. En las células no esféricas existen diferencias entre el porcentaje de disminución de longitud de los ejes, observándose el más pronunciado en el eje menor (hay alrededor del 23 % de disminución en su longitud), en comparación con el mayor (la disminución es sólo del 11 %). Este fenómeno sólo fué observado en algunas de las especies consideradas en este trabajo. Las formas celulares que se presentaron fueron: esférica (Deb. hansenii), ovoide (Candida sp., Cr. albidus y Rh. rubra) y elongada (A. pullulans). Sólo en Rh. rubra y Cr. albidus se observó la tendencia antes mencionada: en las demás especies las variaciones observadas no fueron significativas ( $p \leq 0.05$ ), es decir, las células conservaron su forma original a pesar de los incrementos en la concentración de NaCl del medio (tabla 9). De aquí se deduce que no es posible generalizar a este respecto, pues la respuesta de cada especie al estrés salino es particular.

## 6.5 Contenido de proteínas y carbohidratos totales.

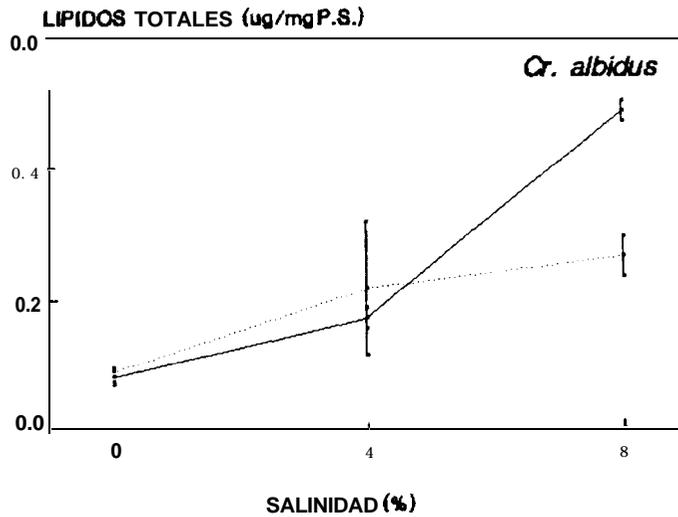
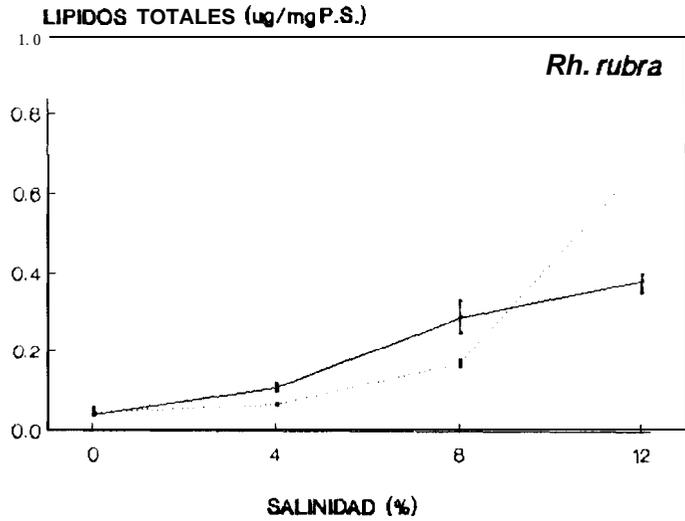
El contenido total de proteínas y carbohidratos de todas las especies estudiadas no presentó modificaciones significativas ( $p \leq 0.05$ ) al incrementarse la salinidad a las temperaturas probadas, lo cual coincide con las observaciones de Hamada et al, (1984) para Zisosacch. rouxii, por lo que se concluye que no tienen, al parecer, participación importante en la osmoregulación de ninguna de las especies estudiadas.

## 6.6 Contenido de lípidos totales

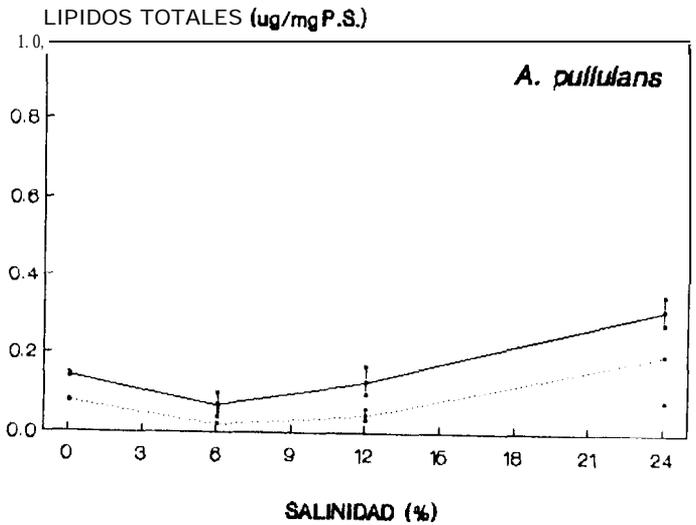
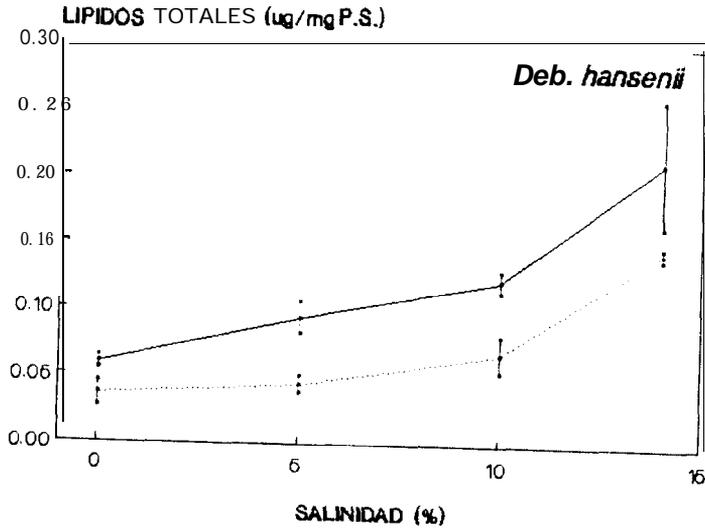
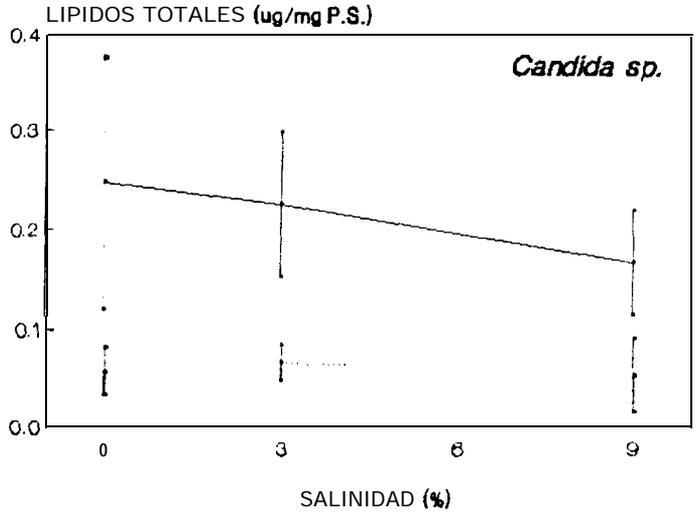
La permeabilidad del glicerol en membranas artificiales se incrementa debido a la introducción de dobles enlaces en ácidos grasos de los fosfolípidos. Esto sugiere que las membranas plasmáticas de células osmotolerantes son diferentes de aquellas de células no osmotolerantes; la magnitud con la que una disminución en el  $a_w$  induce cambios en la composición lipídica de la membrana es diferente en ambos tipos celulares. Sin embargo, comunmente se encuentra que una disminución en la  $a_w$  causa un decremento en los ácidos polienólicos  $C_{18}$  (generalmente  $C_{18:2}$ ) y un incremento más o menos correspondiente en el contenido de residuos de ácido oleico ( $C_{18:1}$ ) en fosfolípidos fúngicos. La composición lipídica de la membrana de levaduras también afecta su estabilidad. Se ha sugerido que el estigmasterol y el ergosterol, al comenzar a ser predominantes en la membrana le confieren una mejor estabilidad por

restringir con mayor efectividad la movilidad de las cadenas de los ácidos grasos, que se incrementa cuando la membrana se tensa. Contrariamente a lo que se había encontrado para otras especies de levaduras, en Rh. rubra, Cr. albidus var. albidus, A. pullulans, y Deb. hansenii (figura 4) el contenido de lípidos totales aumenta al incrementarse la concentración de NaCl del medio, sin observarse diferencias significativas en Rh. rubra y A. pullulans entre las temperaturas probadas. El papel del incremento en los lípidos totales en la osmoregulación de levaduras no está bien definido, sin embargo, se ha reportado que en levaduras osmotolerantes los fosfolípidos aumentan al incrementarse la salinidad, sugiriendo que la fluidéz de la membrana disminuye al ser expuesta al NaCl (Tunblad-Johansson and Adler, 1987; Tunblad-Johansson et al, 1987; Watanabe y Takakawua, 1984); esta respuesta limita la permeabilidad de la membrana al glicerol, que puede ser el caso para estas especies, ya que no existen evidencias experimentales de que el glicerol producido sea liberado al exterior de la célula, como sucede con levaduras no halotolerantes como Sacch. cerevisiae, en donde el glicerol que es sintetizado continuamente, es liberado al exterior celular lo cual le impide funcionar como osmoregulador efectivo.

No obstante lo anterior, son necesarios estudios adicionales para conocer la naturaleza y explicar claramente el efecto de los lípidos en la protección de la viabilidad celular y osmoregulación de las especies antes mencionadas.



**Figura 4.** Efecto de la concentración de NaCl en el contenido de lípidos totales en las cepas consideradas en este estudio.  
—— 20°C, . . . . 25°C y - - - - 30°C.

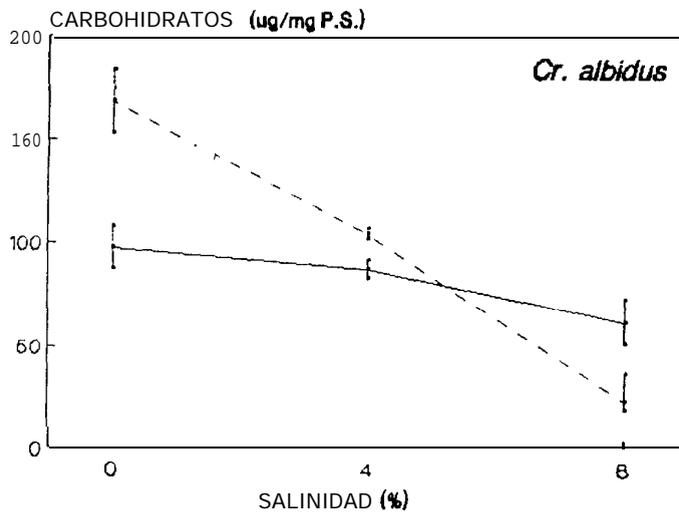
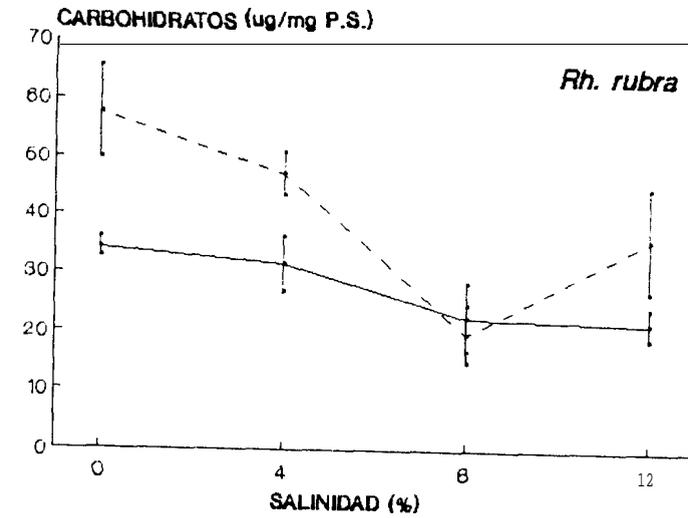


En Candidasp. sucede lo contrario, el contenido de lípidos totales (figura 4) disminuye al incrementarse la salinidad, lo cual no se correlaciona con lo reportado por otros autores, que mencionan que el contenido de lípidos no se modifica al incrementarse la salinidad; ellos sólo observan variaciones en las proporciones de ésteres-esteroles (Watanabe y Takakawa, 1984). Sin embargo, hay que considerar que dichos estudios fueron realizados en Zigosacch. rouxii (una levadura altamente halotolerante) y que son muy escasos los estudios realizados a este respecto en otras especies.

## 6.7 Producción y acumulación de MBPM.

### 6.7.1 Carbohidratos

Para algas unicelulares, plantas vasculares, crustáceos (Yancey et al., 1982) y una especie de levaduras, Candida tropicalis (Saubenova et al., 1989), algunos carbohidratos han sido reportados como osmoreguladores, de estos la trehalosa es el azúcar más común. La trehalosa es un soluto compatible bien conocido en bacterias, en hongos normalmente se acumula bajo condiciones de disminución de crecimiento, particularmente durante los periodos de ayuno y diferenciación (Thevelein, 1984). En estos organismos se ha encontrado que la trehalosa intracelular nunca excede los 50 mM y está implicada en la tolerancia al shock osmótico y como un protector contra la desecación causada por la liofilización y/o el



**Figura 5.** Efecto de la concentración de NaCl en el contenido intracelular de carbohidratos en las 5 cepas consideradas en este estudio. 20°C, . . . . 25°C y 30°C.

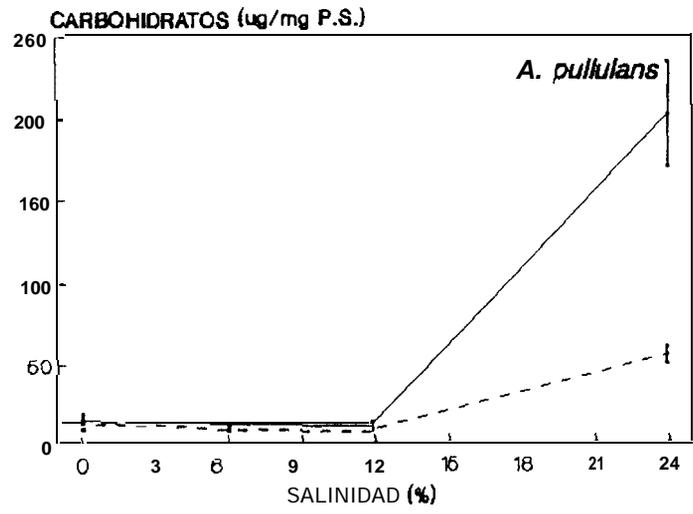
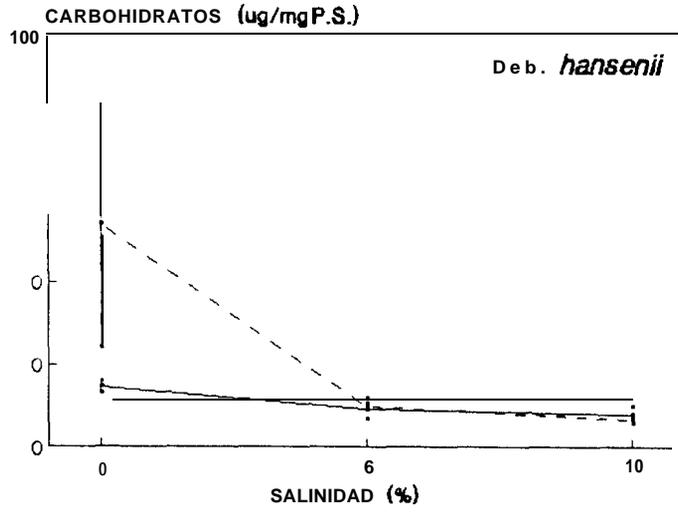
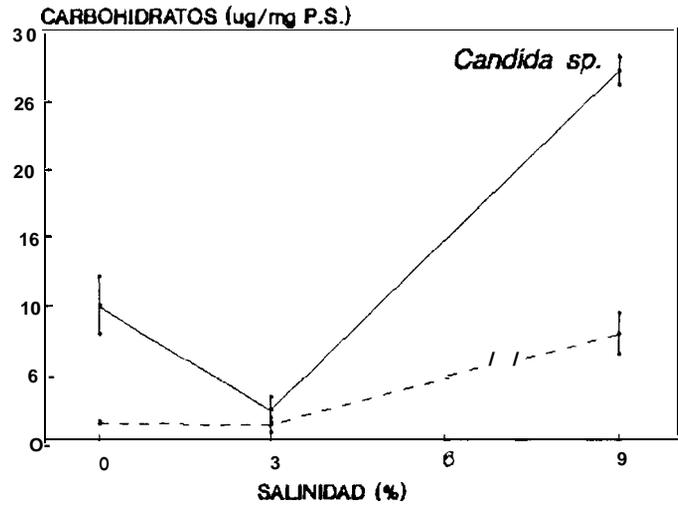


TABLA 10.

Presiones Osmóticas

ESPECIE	[NaCl] (%)	OSMOLARIDAD (Os/kg)			OSMOLARIDAD INTRACELULAR (%)					
		P.O. MEDIO	P.O. INTRACELULAR		CARBOHIDRATOS		AMINOACIDOS		GLICEROL	
			20°C	30°C	20°C	30°C	20°C	30°C	20°C	30°C
Rh. rubra	0	0.22	0.23	0.29	16.9	22.6	70.2	66.7	12.9	10.7
	4	1.30	1.49	1.93	6.0	6.9	31.5	29.4	62.5	63.7
	8	2.73	2.63	2.57	2.5	2.4	11.2	11.8	86.3	85.8
	12	4.40	6.73	6.58	1.0	1.7	1.3	2.7	97.7	95.6
Cr. albidus	0	0.22	0.37	0.43	30.0	44.8	50.3	40.1	19.7	15.1
	4	1.30	1.28	1.14	9.0	12.1	14.7	14.8	76.3	73.0
	8	2.73	3.04	2.66	3.2	1.3	5.0	6.4	91.8	92.3
Candida sp.	0	0.22	0.28	0.16	3.6	0.6	70.8	86.6	25.6	12.8
	3	0.96	1.10	0.91	0.3	0.1	37.7	39.1	62.0	60.8
	9	3.12	1.83	3.33	4.6	0.7	18.2	14.9	77.2	80.4
Deb. hansenii	0	0.22	0.47	0.50	3.0	12.3	49.8	26.3	47.2	61.4
	5	1.64	0.94	1.37	1.1	0.8	18.3	15.9	80.6	83.3
	10	3.53	1.08	2.15	1.5	0.6	13.8	12.5	84.7	86.9
	14	5.34	0.75	1.94	0.0	0.0	19.8	11.1	80.2	88.9
A.pullulans	0	0.22	0.27	0.35	5.6	3.7	15.8	20.8	78.6	68.5
	6	2.00	1.25	0.83	1.7	1.8	15.3	17.9	83.0	80.3
	12	4.40	1.48	1.56	1.6	0.9	14.2	14.3	84.2	84.8
	24	11.91	8.05	9.17	9.9	2.2	9.0	6.9	81.1	90.9

secado al aire en células en fase estacionaria. En este estudio se encontró que en Rh. rubra, Cr. albidus var. albidus y Deb. hansenii los azúcares no tienen tal función, ya que no participan de manera significativa ( $p \leq 0.05$ ) en el equilibrio de la presión osmótica intracelular con respecto a la del medio externo promovida por la concentración de NaCl (tabla 10). El efecto de la salinidad y la temperatura en la concentración intracelular de carbohidratos de bajo peso molecular de estas especies se muestra en las figura 5. En general, la concentración de carbohidratos disminuye con un incremento en la salinidad: a 20°C el contenido de carbohidratos en un medio sin NaCl es mucho menor que el observado a 25°C, esto da una idea de lo que está sucediendo con el crecimiento, ya que como se mencionó con anterioridad el crecimiento de Rh. rubra no se favorece a 20°C. Bajo estas condiciones de temperatura el gasto metabólico del organismo para crecer es mayor, y por lo tanto, la acumulación de cabrohidratos (principal material de reserva) no ocurre, por el contrario, su tasa de utilización es mayor para poder generar la energía necesaria para su desarrollo. Con un incremento en la salinidad el gasto metabólico es aún mayor, por lo que los niveles de carbohidratos intracelulares continúan disminuyendo. A 25°C se observa un efecto parecido, sin embargo, los niveles intacelulares de carbohidratos obtenidos bajo esta condición de temperatura son mayores que los observados a 20°C para todas las condiciones de salinidad, es decir, bajo estas condiciones de crecimiento la célula no requiere de una alta conversión de azúcares a otros productos para obtener la energía

necesaria para reproducirse.

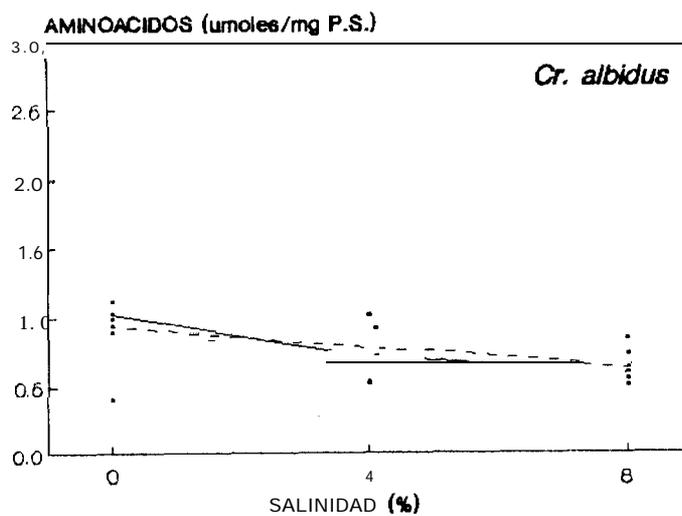
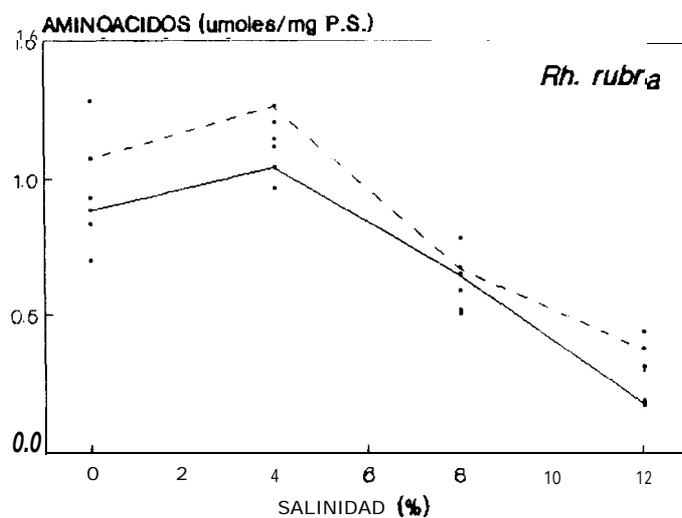
Para el caso particular de Cr. albidus (figura 5) la disminución del contenido de carbohidratos es drástica a 25°C ( $m = -17.71$ ) en comparación con la observada a 20°C ( $m = -4.39$ ).

Para Deb. hansenii (figura 5) la variación en el contenido de carbohidratos con respecto al incremento de la salinidad sólo es evidente a una concentración de NaCl < 5 % ( $p \leq 0.01$ ), con respecto al control, pues entre 5 y 10 % de NaCl no se observan diferencias significativas entre las dos salinidades probadas. En esta especie, la contribución de los carbohidratos en el equilibrio de la presión osmótica intracelular con respecto al medio externo, es despreciable (tabla 10) como en el caso de las dos especies antes mencionadas.

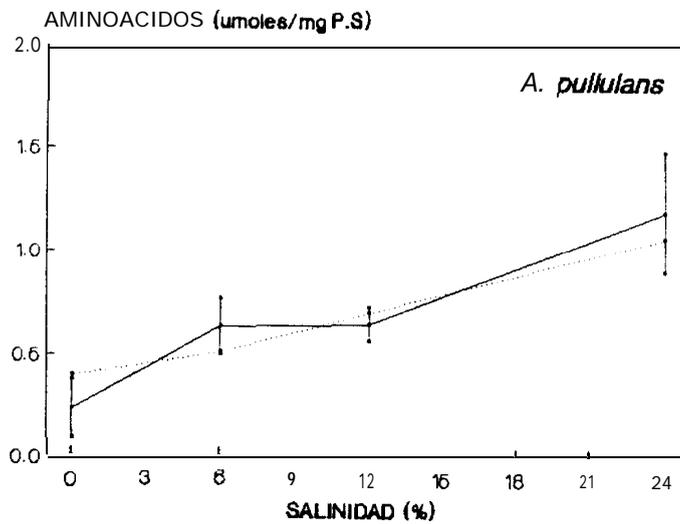
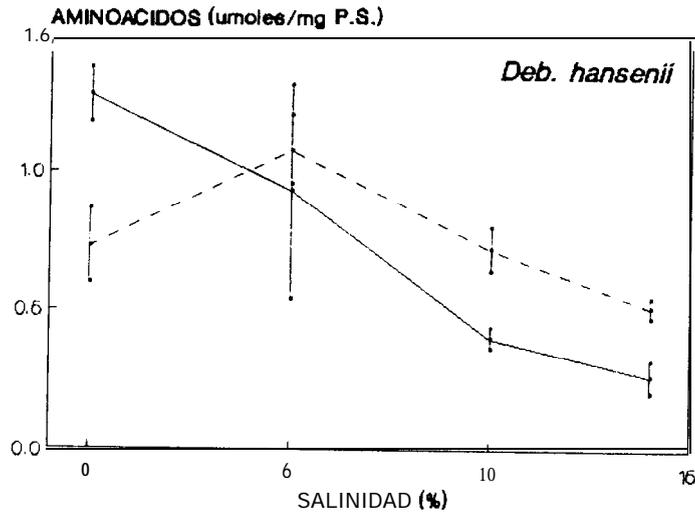
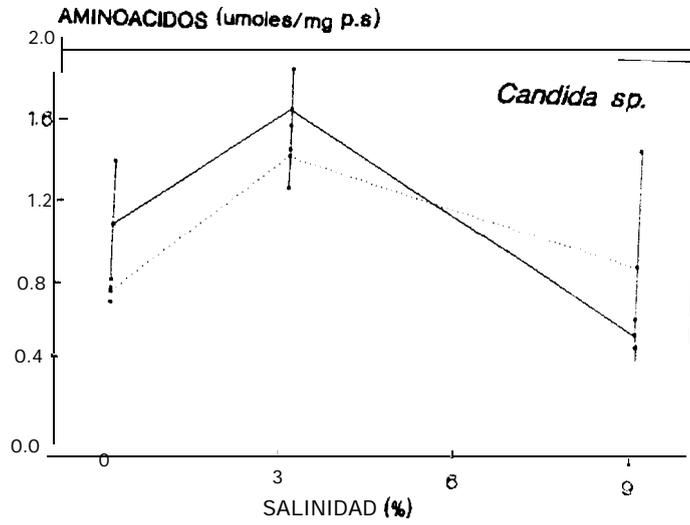
Para Candida sp. y A. pullulans (figura 5), no se observa una clara correlación entre el incremento en la salinidad y el contenido intracelular de carbohidratos, sin embargo, como se indica en la tabla 10, los carbohidratos si tienen participación (aunque muy pequeña en el caso de A. pullulans) en la restauración de la presión osmótica intracelular a altas salinidades. Estas observaciones nos indican que el método que utiliza la célula para equilibrar la presión osmótica intracelular con respecto a la extracelular, depende en cierta medida de la salinidad a la que se desarrolle el microorganismo.

### 6.7.2 Aminoácidos libres

Los aminoácidos libres intracelulares, también han sido reportados como osmoreguladores en organismos como bacterias, protozoarios, plantas superiores e invertebrados (Yancey et al, 1982), sin embargo, para levaduras no existe ninguna observación de este tipo. En Rh. rubra, Cr. albidus var. albidus y Deb. hansenii los aminoácidos libres no tienen ninguna función osmoreguladora (figura 6), por el contrario, un aumento en la salinidad se traduce en un decremento en la concentración de estos metabolitos. A 20°C, al igual que las observaciones de carbohidratos, el contenido de aminoácidos libres es menor que el observado a 25°C, lo cual se explica de la misma forma que la disminución observada en el contenido de carbohidratos. De acuerdo con Adler (Adler y Gustafsson, 1980) la concentración de aminoácidos libres, en relación al peso seco de la biomasa celular, decrece entre 15 y 50% en un cultivo con una alta salinidad (de 4 mM a 2.7 M de NaCl) lo cual fué corroborado en Cr. albidus var. albidus y Deb. hansenii. Sin embargo, en Rh. rubra el contenido de aminoácidos libres es mucho menor (59 - 81%) a una concentración del 12 % de NaCl (2.053 M de NaCl) en comparación con lo observado en un medio sin NaCl. No obstante que el contenido de aminoácidos libres disminuye al incrementarse la salinidad, intracelularmente si provocan cierta presión osmótica en Rh. rubra y Cr. albidus var. albidus, que contribuye al equilibrio de la misma con respecto al medio extracelular, especialmente a una concentración de NaCl del 8 % a



**Figura 6.** Efecto de la concentración de NaCl en el contenido intracelular de aminoácidos libres en las cepas consideradas en este estudio. — 20°C, . . . . 25°C y 30°C.



temperaturas cálidas. En Deb. hansenii (tabla 10) la contribución de los aminoácidos es despreciable.

Para Candida sp., aunque el contenido de aminoácidos libres intracelulares (por mg de peso seco) tienden a disminuir con un incremento en la salinidad (figura 6), la contribución que tienen en la presión osmótica intracelular es importante (tabla 10). Aparentemente, su contribución en el equilibrio de la presión osmótica interna es significativa a concentraciones de NaCl del 0 y 3 % (figura 6), sin embargo no hay que perder de vista que para el cálculo de la presión osmótica que promueve cada metabolito, están involucrados otros parámetros (como el volúmen y el tamaño celular) además del contenido de cada uno de ellos por mg de peso seco (ver método, página 34).

El caso de A. pullulans es muy particular, pues fué la única especie en la que se observó un claro incremento en el contenido de aminoácidos libres intracelulares en relación al aumento de la salinidad (figura 6). Sin embargo, estos no parecen tener una participación importante en el equilibrio de presión osmótica intracelular (tabla 10), con respecto al medio externo. No fueron observadas diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre las dos temperaturas ensayadas.

Brown y Stanley (1972) reportaron que el NaCl arriba de 0.5 M no tiene efectos observables en el contenido de aminoácidos libres en Sacch. cerevisiae y en Zisosacch. rouxii cuando crecen en cultivos en quimiostato. En los hongos Thraustochytrium aureum y T. roseum el contenido de la prolina se incrementa linealmente con la

salinidad. Sin embargo, aún no está claro si estos organismos sintetizaron este aminoácido de novo o fué tomado del medio de cultivo.

Esta misma interrogante surge en este estudio con las especies que han mostrado incrementos en los niveles de aminoácidos de manera concomitante con la salinidad, ya que no se conoce la naturaleza (tipo de aminoácido) ni el origen de él o los aminoácidos implicados, para lo cual sería muy conveniente en estudios futuros considerar la posibilidad de realizar estas determinaciones en las especies de interés.

### 6.7.3 Glicerol

En Rh. rubra, Cr. albidus var. albidus y A. pullulans, la acumulación de glicerol como respuesta a un incremento en la salinidad es una relación lineal y directa (figura 7). La presión osmótica ejercida por la concentración de glicerol intracelular, en el caso de Rh. rubra y Cr. albidus var. albidus (tabla 10) es suficiente para contrarrestar aquella producida por la concentración de **NaCl** extracelular. Por lo tanto, aunque los otros dos metabolitos (carbohidratos y aminoácidos) ejercen una pequeña presión osmótica intracelular (no mayor al 6.5 % de la promovida por el **NaCl** extracelular) el 92 - 98% es provocada por el glicerol (que coincide con el 95 % reportado por Blomberg y Adler (1992) para Deb. hansenii). De esta forma el glicerol juega el papel principal en la osmoregulación de estas dos especies.

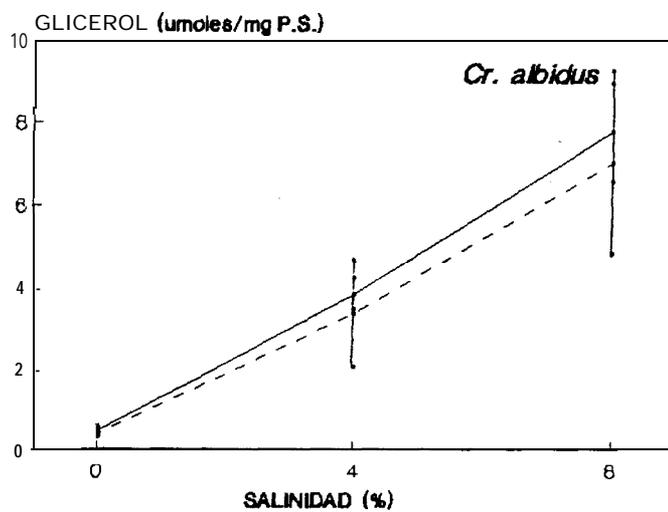
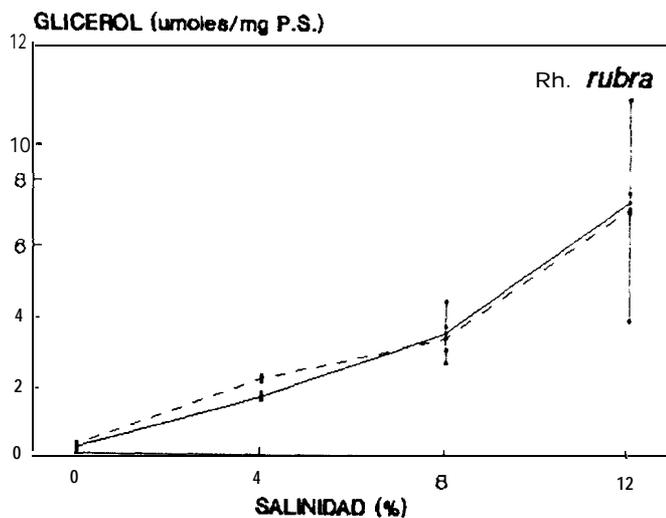
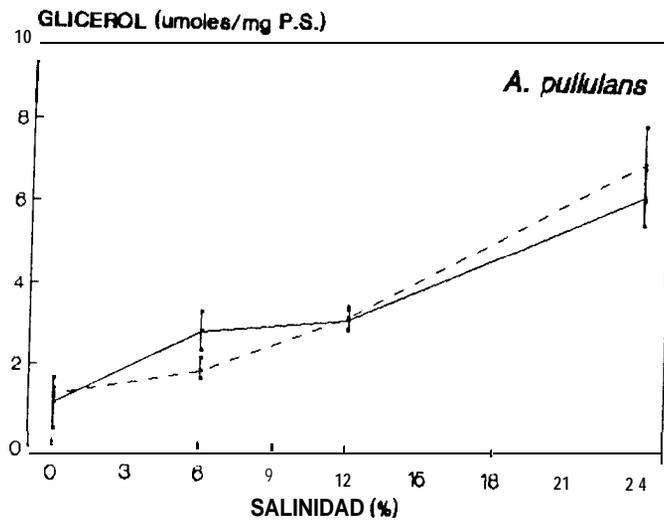
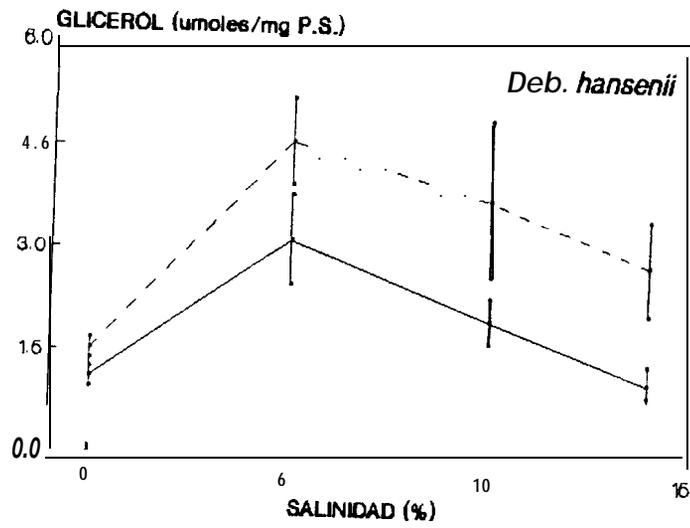
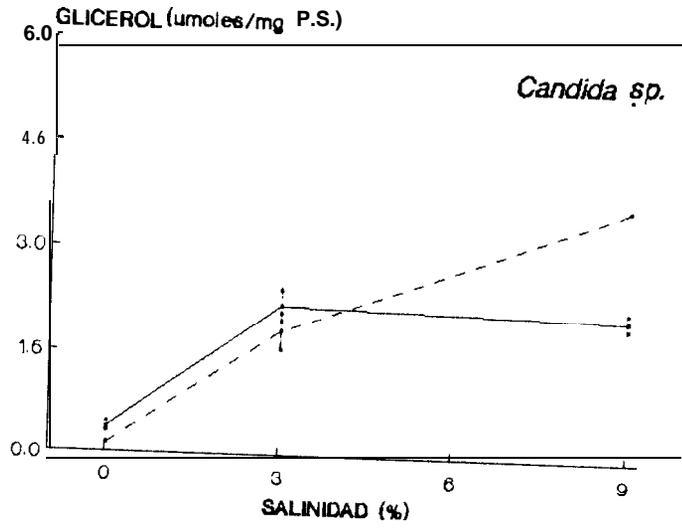


Figura 7. Efecto de la concentración de NaCl en el contenido intracelular de glicerol de las cepas consideradas en este estudio. — 20°C, . . . . 25°C y 30°C.



Aunque la relación que existe entre el contenido intracelular de glicerol y el incremento en la salinidad en A. pullulans es directa (figura 7), la presión osmótica que promueve este metabolito no es suficiente para equilibrar la presión con el medio externo. En la tabla 10, se observa que a 20°C el glicerol aporta la mayor presión osmótica. A salinidades de 3 y 24 %, el mayor porcentaje de presión es producido por el glicerol, el cual, con la participación de los otros metabolitos alcanza a cubrir del 68 al 77 % de la presión osmótica extracelular promovida por el NaCl. A salinidades del 6 y 12 %, los metabolitos monitoreados no alcanzan a balancear la presión osmótica que provoca la concentración extracelular de NaCl más allá de un 33 - 35 %, aún con la suma de los tres, lo que hace suponer que en la célula existe otro mecanismo de regulación que le permite sobrevivir y desarrollarse bajo estas condiciones de estrés salino. Al observar nuevamente la figura 3, es evidente que a estas salinidades es donde precisamente se presentó el mejor crecimiento a las temperaturas probadas. Esto soporta la idea de que los mecanismos de osmoregulación dependen en gran medida de la concentración de NaCl en la que se desarrollen las células.

En el caso de Deb. hansenii, que la bibliografía cita como la especie más estudiada en cuanto a osmoregulación, el glicerol intracelular no presenta una estrecha correlación con la concentración de NaCl (figura 7), y la presión osmótica que produce este metabolito no es suficiente para contrarrestar aquella promovida por el cloruro de sodio a las dos temperaturas ensayadas,

aunque promueve del 80 al 89 % de la presión osmótica intracelular. Para esta especie, ha sido reportado un comportamiento semejante al que se observó en Rh. rubra y Cr. albus var. albidus. Sin embargo, la cepa que se ha utilizado en los trabajos reportados en la bibliografía tiene un intervalo de tolerancia a la salinidad de 0 al 24 % de NaCl, que es sensiblemente mayor que el que se observó para la cepa con la que se realizó este trabajo (0 al 17 % de NaCl, tabla 6). Esta observación implica que no es posible generalizar aún dentro de cepas que pertenecen a la misma especie, pues las condiciones ambientales de las que se obtuvo cada cepa fueron diferentes (Norkrans, 1966, Hernández, 1990), lo cual se refleja en propiedades fisiológicas como la tolerancia a la salinidad. Podría incluso pensarse que se trata de una subespecie, sin embargo, para corroborar esto son necesarios estudios exhaustivos de taxonomía a nivel no convencional, por ejemplo de hibridación de DNA. En esta cepa, como en el caso de A. pullulans debe existir otro mecanismo de osmoregulación, pues en este caso el glicerol sólo cubre a 20°C un 14 % de la presión osmótica extracelular, y a 25°C un 36 %. No obstante que la concentración del glicerol se incrementa con el contenido de NaCl, aún faltan por cubrir entre el 64 - 70 % de la presión osmótica promovida extracelularmente por el NaCl.

Para Candida so. el contenido de **glicerol intracelular** aumenta con un incremento del 3 % en la salinidad. A 20°C el contenido de glicerol permanece constante a 9 % de NaCl, sin embargo a 25°C se eleva (figura 7). No obstante los valores observados en la gráfica, no existen diferencias significativas entre las dos condiciones de

temperatura probadas.

La participación del glicerol en la regulación de la presión osmótica en células expuestas a estrés salino, es la más importante para esta Candida sp. (tabla 10), representando del 50 al 80 %. Sin embargo, los aminoácidos tienen también una participación decisiva, contribuyendo con un 20 % de la presión osmótica intracelular. En este caso, la osmoregulación no está dada por un sólo metabolito.

#### 6.8 Discusión general.

En general, el volúmen parece ser una variable más universal que la turgencia, considerando la infinitesimalmente pequeña turgencia de las células sin pared. No obstante, en la membrana plasmática de levaduras se han identificado canales **iónicos** mecanosensitivos, y se ha observado que la actividad de estos canales está regulada por la presión de la membrana (Gustin et al., 1988), la cual está relacionada con el volúmen celular y el contenido lipídico de la membrana.

A la regulación del volúmen celular se le ha atribuido un papel en el ciclo celular como una señal de comienzo, sin embargo, la presión de turgencia es una parte esencial del potencial hídrico total de la célula, y por lo tanto debe ser medido para entender por completo la respuesta celular a las fluctuaciones en el **estatus** hídrico del medioambiente. Por lo tanto debe dársele más importancia a este tipo de características celulares, ya que la única producción de metabolitos compatibles no es suficiente para

permitir el crecimiento y reproducción de la célula.

Dentro de las estrategias para determinar el potencial osmótico intracelular se encuentran: la formación de protoplastos, el uso de osmómetros, la psicometría termoacoplada y los análisis químicos. El análisis químico de los constituyentes celulares (aminoácidos, iones, azúcares y otros metabolitos más las medidas del volumen osmótico y citoplasmático) es un buen método para determinar el potencial osmótico celular, sin embargo, puede suceder que algunos compuestos abundantes en las células sean sobrestimados, dando como resultado potenciales osmóticos altos. No obstante, este tipo de análisis dan una información muy importante acerca del balance existente de las diferentes sustancias osmoticamente activas en la célula durante el crecimiento en medios con diferentes actividades de agua (Burke y Jennings, 1990; Larsson *et al.*, 1990; Luard, 1982 a); por lo tanto se recomienda la combinación de técnicas.

Un mecanismo importante en respuesta al estrés osmótico al que es expuesta la célula es la acumulación de solutos compatibles, especialmente el glicerol. Aunque en este trabajo se encontró que en algunas especies de levaduras, los aminoácidos participan de forma importante en este mecanismo de osmoregulación. La regulación detallada de esta respuesta no se conoce bien, existen evidencias de que la regulación de los genes involucrados es a nivel transcripcional. Recientemente se ha aislado y clonado en Sacch. cerevisiae un gen que interviene en la tolerancia a la salinidad y que es inducible por NaCl, KCl y sorbitol (Gaxiola *et*

al, 1992). Se ha obtenido una sobreexpresión de este gen al exponer a la célula a altas concentraciones de NaCl, y se ha observado también que durante este fenómeno la toxicidad del Na<sup>+</sup> es contrarestanda por un aumento en la acumulación intracelular del ion K<sup>+</sup>. La proteína codificada por el gen (HAL1) interactúa con el sistema de transporte que determina la homeostasis intracelular del K<sup>+</sup>. Se presume que los cambios en la  $a_w$  del medio extracelular involucra mecanosensores (estrechamente relacionados con los cambios de volumen celular) y cascadas de fosforilación. Sin embargo, se necesitan análisis genéticos, fisiológicos y fisicoquímicos, además de análisis químicos más finos, para entender a fondo las relaciones levadura-agua. No obstante, este trabajo es una aproximación válida que nos permite conocer algunos de los cambios que sufre la célula al ser expuesta a condiciones extremas de disponibilidad de agua, lo que nos sirve de punto de partida para entender mejor, en investigaciones futuras, el complejo fenómeno de osmoregulación en levaduras.

## 7. CONCLUSIONES

1. El método de aislamiento y selección de cepas fué adecuado, pués se aislaron seis cepas de levaduras con intervalos de tolerancia al NaCl entre 0 - 9 % y 0 - 24 %.

2. En cristalizadores en donde no ha comenzado la precipitación del NaCl y la densidad del agua es menor a 1.10 gr/ml, la probabilidad de aislar levaduras halotolerantes es muy alta.

3. El tipo de levaduras que se aislaron son en las que no se observan características de reproducción sexual, clase Deuteromycetes.

4. Se observaron tres grupos de levaduras bien definidos en relación a su tolerancia al NaCl: organismos ligeramente halotolerantes (3 - 9 % de NaCl), Rhodotorula rubra, Cryptococcus albidus var. albidus y Candidasp.; organismos moderadamente halotolerantes (9 - 18 % de NaCl) Hansenula sp. y Debarvomyces hansenii; y finalmente organismos extremadamente halotolerantes (20 > 30 % de NaCl) Aureobasidium pullulans.

5. Existen también tres tipos de comportamiento en relación al crecimiento (expresado en velocidad específica de crecimiento) en diferentes temperaturas y concentraciones de NaCl, que se ajustan al modelo anterior.

6. La concentración de NaCl y la temperatura son factores estrechamente relacionados y determinantes en los procesos osmoregulatorios de levaduras. Sin embargo, no se puede generalizar

la respuesta de las levaduras a estos estímulos (salinidad y temperatura), ya que se ha comprobado que la variabilidad intra e interespecífica es muy fuerte.

7. El efecto de la concentración de **NaCl** en el volúmen celular es inversamente proporcional en la mayoría de las cepas estudiadas, sin embargo, no se puede generalizar a este respecto.

8. Para Rh. rubra el metabolito que funciona como osmoregulador es el glicerol, sin embargo, se presume que los lípidos también intervienen en la regulación de este fenómeno puesto que se incrementan sus niveles en la célula concomitantemente con la salinidad. Para esta especie los aminoácidos y los carbohidratos no tienen ninguna función osmoreguladora significativa.

9. Para Cr. albidus var. albidus se encontró que el metabolito que funciona como osmoregulador en Cr. albidus var. albidus es el glicerol, sin embargo, se presume que los lípidos también intervienen en la regulación de este fenómeno puesto que se incrementan sus niveles en la célula concomitantemente con la salinidad. Para esta especie los aminoácidos y los carbohidratos no tienen ninguna función osmoreguladora significativa.

10. En Deb. hansenii se encontró que el metabolito que funciona como osmoregulador es el glicerol, sin embargo, su concentración en la célula no es suficiente para balancear la presión osmótica extarcelular, por lo que se presume que existen otros mecanismos no considerados en este estudio que son los que le permiten subsistir y desarrollarse en medios altamente salinos.

Para esta especie los carbohidratos no tienen ninguna función osmoreguladora significativa, mientras que los aminoácidos si tienen una pequeña participación en la presión osmótica intracelular.

Aunque se presume la participación de los lípidos en el fenómeno de osmoregulación de esta especie, puesto que existe una relación inversamente proporcional entre su concentración en la célula y la salinidad del medio extracelular, no se conoce específicamente su función.

11. Para A. pullulans, en este trabajo se encontró que el metabolito que funciona como osmoregulador principal es el glicerol. Para esta especie los carbohidratos, aminoácidos y lípidos no tienen ninguna función osmoreguladora significativa.

12. En Candida sp. el metabolito que funciona como osmoregulador principal es el glicerol, sin embargo, los aminoácidos son un segundo mecanismo osmoregulatorio, mientras que se observó que los carbohidratos y los lípidos no tienen ninguna función osmoreguladora significativa.

13. La respuesta de las levaduras al estrés osmótico involucra la función integral de muchos componentes del metabolismo celular. La regulación de estos componentes no se conoce claramente, pero se sabe que hay genes involucrados que son **inducibles** por diversos estímulos, ya sea mecánicos y/o químicos, por lo que la investigación de la regulación y de los componentes participantes en este fenómeno está abierta.

## 8. RECOMENDACIONES

El análisis químico de los constituyentes celulares (aminoácidos, azúcares, lípidos y glicerol) es un buen método para determinar el potencial osmótico celular, sin embargo, es recomendable monitorear otros metabolitos y parámetros estrechamente relacionados (iones, presión de turgencia, etc..) para tener una idea más completa del fenómeno.

Se recomienda además, realizar análisis químicos más finos (composición de aminoácidos, carbohidratos, iones y lípidos), para conocer con certeza las sustancias que participan directamente en el proceso osmoregulatorio celular y así poder conocer un poco más acerca de las rutas metabólicas implicadas.

## 9. BIBLIOGRAFIA

1. Adler, L. 1986. Physiological and biochemical characteristics of the yeast Deb. hansenii in relation to salinity. In: Moss (ed.) The biology of marine fungi. 4th International Marine Mycology Symposium, Cambridge University Press, England. 81-90.
2. Adler, L., Blomberg, A. and Nilsson, A. 1985. Glycerol metabolism and osmoregulation in the salt-tolerant yeast Debaryomyces hansenii, J. Bacteriol., **162**:300-306.
3. Adler, L., Falk, K.E., and Angstrom, J. 1981. Polyol and water in the **salt tolerant** yeast Debarvomvces hansenii as studied by <sup>1</sup>H nuclear magnetic resonance, FEMS Microb. Lett., **11**:269-271.
4. Adler, L. and Gustafsson, L. 1980. Polyhydric alcohol production and intracellular aminoacid pool in relation to halotolerance of the yeast Debarvomvces hansenii, Arch. Microbiol., **124**:123-130.
5. Adler, L., Pedersen, A. and Tunbland-Johansson, I. 1982. Polyol accumulation by two filamentous fungi grown at different concentrations of NaCl, Physiol. Plant., **56**:139-142.
6. Ahearn, D.G. 1964. A comparative physiological and morphological study of terrestrial -and marine- occurring carotenigenic yeast. Thesis. University of Miami.
7. Ahearn, D.G. Roth, F.J. and Meyers, S.P. 1962. A comparative study of marine and terrestrial strains of Rh. rubra. Can. J. Microbiol., **8**:121-132.
8. Anand, J.C. and Brown, A.D. 1968. Growth rate patterns of the so called osmophilic and non osmophilic yeast in solutions of PEG. J. Gen. Microbiol., **52**:205.
9. Arredondo-Vega, B.O. and Vázquez-Duhalt R. 1991. Haloadaptation of the green alga Botryococcus braunii (race A). Phytochem., **30**(3):2919-2925.
10. Band, J.C., Arredondo-Vega B.O., Vazquez-Duhalt R. and Greppin, H. 1992. Effect of a salt-osmotic upshock on the edaphic microalga Neochloris oleoabundans. Plant Cell Environ., **15**:129-133.
11. Barnett, J.A. Payne, R.W. and Yarrow, D.Y. 1983. Yeast characteristics and identification. Cambridge University Press. London.

12. Bauer, S. and Shiloach, J. 1974. Maximal exponential growth rate yield of E. coli obtainable in a bench-scale fermentor, Biotech. Bioengineer., **16**:933-941.
13. Bayley, S.T. and Norton, R.A. Critical Review in Microbiology. Vol. VI. CRC. p.p. 151-205.
14. Blomberg, A. y Adler, L. 1989. Roles of glycerol and glycerol-3-P deshydrogenase (NAD<sup>+</sup>), J. Bacteriol., **171**:1087-1092.
15. Blomberg, A. and Adler L. 1992. Physiology on osmotolerance in fungi. Adv. Microb. Phvsiol., **33**:145-212.
16. Bonner, O.D. 1982. Osmotic and activity coeficcients of some amino acids and their hydrochloride salts at 298.15°K. J. Chem. Eng. Data. **27**:422-423.
17. Borst-Pauwels, G.W.F.H. 1981. Factors affectingthe inhibition of yeast plasma membrane ATPase by vanadate. Biochim. Biophvs. Acta, 642: 173-181.
18. Brown, A.D. 1974. Microbial water relations: features of the intracellular composition of sugar tolerant yeast. J. Bacteriol., **118**:769-777.
19. Brown, A.D. 1978. Compatible solutes and extreme water stress in eukaryotic micro-organism. In: Rose, A.H. and Morris, J.G. (Eds), Adv. Microbiol. Phvsiol., Vol. 17. Academic Press, 181-242.
20. Brown, A.D. and Edgley, M. 1980. Osmoregulation in yeast. In: Rains, D.W., Valentine, R.C. and Hollander, A. (Eds), Genetic engineerins of osmoregulation, Plenum Publishing, 75-90.
21. Brown, C.M. and Stanley, S.O. 1972. Ennvironment-mediate changes in the cellular content of the pool constituents and their associated changes in cell physiology. J. Appl. Chem. Biotechnol., **22**:363.
22. Burke, R.M. and Jennings, D.H. 1990. Effect of sodium chloride on growth characteristics of the marine yeast Debarvomvces hansenii in batch and continuos culture under carbon and potassium limitation. Mycol. Res., **94**:378-388.
23. Canh, D.S., Horák, J., Kotyk, A. and Rihová, L. 1975. Polyol transport across the plasmatic membrane. Folia Microbiol., **20**:363.

24. Combs, T.J., Guarneri, J.J. and Pisano, M.A. 1980. Effect of NaCl in the lipid content of Candida albicans. Mycologia, **60**:1232-1239.
25. Dürr, M., Boller, T. and Wiemken, A. 1975. Vacuolar solutes in yeast and fungi. Arch. Microbiol., **105**:319
26. Eddy, A.A. 1982. Flocculation characteristics of yeast. Adv. Microbial Physiol., **23**:1.
27. Gaber, R.F., Styles, C.A. and Fink, G.R. 1990. Ion affinity of yeast membranes. Mol. Cell. Biol., **10**:640.
28. Gancedo, C., Gancedo, J.M. and Sols, A. 1968. Glycerol metabolism in yeast, pathways of utilization and production, J. Biochem., **5**:165.
29. Gaxiola, R., Larrinoa, I.F., Villalba, J.M. and Serrano, R. 1992. A novel and conserved salt induced protein is an important determinant of salt tolerance in yeast. EMBO J., **11**:3157.
30. Gervais, P. 1991. Osmotic accumulation of  $\gamma$ -Decalactone by the yeast Sporidiobolus salmonicolor. J. Biotechnol., **19**:211.
31. Gimmler, H., Kaaden, R., Krychner, U. and Weyland, A. 1984. Effect of NaCl in the enzyme-substrate balance in the alga Dunaliella salina. Zeitschr. F. Pflanzenphysiol., **114**:131-150.
32. Ginzburg, M. 1987. Dunaliella: a green algae adapted to salt. In: Ginzburg, M. (Ed), Advances in botanical research, Vol. 14. Academic Press Inc, 93-183.
33. Gustin, M.C., Martinac, B., Saimi, Y., Culbertson, M.R. and Kung, C. 1986. Pressure-sensitive ion channels in yeast and Escherichia coli. Sci., **233**:1195.
34. Gustin, M.C., Zhou, X.L., Martinac, B. and Kung, C. 1988. Stretch-activated cation channels in yeast. Sci., **242**:762.
35. Gustafsson, L. and Norkrans, B. 1976. On the mechanism of salt tolerance. Production of glycerol and heat during growth of Debaromyces hansenii, Arch. Microbiol., **110**:177-183.
36. Hamada, T., Noda, F. and Hayashi, K. 1984. Structure of cell wall and extracellular mannans from Sacch. rouxii and their relationship to a high concentration of NaCl in the growth medium. Appl. Env. Microbiol., 707-712.

37. Hernández-Saavedra N. 1990. Aislamiento y caracterización de levaduras marinas en la Costa Occidental de B.C.S., México. Tesis, UNAM-ENEPI, México.
38. Hobot, J.A. and Jennings, D.H. 1981. Growth of Deb. hansenii and Sacch. cerevisiae in relation to pH and salinity. Exp. Mycol., **5**:217-228.
39. Imhoff, J, and Rodríguez-Valera, F. 1984. Betaine is the main compatible solute of halophilic bacteria. J. Bacteriol., **160**:478-479.
40. Javor, B. 1989 a. Yeast and Fungi. In: Javor, B. (Ed), Hypersaline environment: microbiology and biochemistry, Spinger-Verlag, 163-175.
41. Javor, B. 1989 b. Geology and chemistry. In: Javor, B. (Ed), Hypersaline environment: microbiology and biochemistry, Spinger-Verlag, 5-23.
42. Javor, B. 1989 b. Biology. In: Javor, B. (Ed), Hypersaline environment: microbiology and biochemistry, Spinger-Verlag, 26-41.
43. Jennings, D.H. 1984. Polyol metabolism in fungi. Adv. Microb. Phvsiol., **25**:149-193.
44. Jennings, D.H. 1987. Fungal growth in the sea. Biol. Rev., **62**:215.
45. Jimenez-Vargas, J. y Macarulla, J. 1979. Fisicoquímica fisiológica, 5<sup>o</sup> ed. Interamericana, España, 335 p.
46. Johnson, M.K., Johnson, E.J., MacElroy, R.D., Speer, H.L. and Bruff, B.S. 1968. Effect of NaCl in the metabolic functions of Dunaliella salina. J. Bacteriol., **95**:1461-1468.
47. Jones, W.G.B., Rothstein, A., Sherman, F. and Stannard, J.N. 1965. Effect of growth state on ion transport in yeast. Biochim. et Biophys. Acta, **104**:310.
48. Klöppel, R. and Höfer, M. 1976. Polyol transport in Rhodotorula glutinis. Arch. Microbiol., **107**:329.
49. Kohlmeyer, E. and J. Kohlmeyer. 1979. Marine Mycology: The higher fungi. Academic Press Inc. New York, 556-606.
50. Kreger van Rij, N.J.W. 1969. Biology of yeast. In: Rose H.A. and Harrison J.S. (Eds), The yeast Vol. 1. The Biology of yeast. Academic Press Inc., London, 40-77.

51. Kreger van Rij, N. J.W. 1983. Key to genera and species without sexual reproduction characteristics. In: Lodder, J. and N.J.W. Kreger van Rij (Eds), The yeast, a taxonomic study. 3 Th. edition. Elsevier Science Publisher, North Holland, Amsterdam, 105.
52. Larsen, H. 1986. Halophilic and halotolerant microorganisms - an overview and historical perspective. FMREE., **39**:3-7.
53. Larsson, C., Morales, C., Gustafsson, L. and Adler, L. 1990. Osmoregulation of the salt-tolerant yeast Debarvomvces hansenii in a chemostat at different salinities. J. Bacteriol., **172**:1769.
54. Le Rudulier, D.A., Strom, A.R., Dandekar, A.M., Smith, L.T. and Valentini, R.C. 1984. Molecular Biology of osmoregulation, Sci., **224**:1064-1068.
55. Lindman, B. 1981 a. Water deficit and water relations of life. In: Lindman, B (Ed), On the sugar uptake and halotolerance in yeast Deb. hansenii. Departament of Marine Microbiology, University of Goteborg, Sweden. 1-14.
56. Lindman, B. 1981 b. Influence of NaCl on the morphology and bud development of yeast differing in halotolerance. In: Lindman, B (Ed), On the sugar uptake and halotolerance in yeast Deb. hansenii. Departament of Marine Microbiology, University of Goteborg, Sweden, 20-35.
57. Lodder, J. and Kreger van Rij, N.J.W. 1983. The yeast, a taxonomic study, 3 Th. edition, Elsevier Science Publishers, North Holland, Amsterdam.
58. Lowry, O.H., Rosenbrough, N.H., Lewis F.A. and Randall, R.J. 1951. Measurement with the Folin phenol reagent, J. Biol. Chem., **193**:265-275.
59. Luard, E.J. 1982. Saline stress in fungi. J. Gen. Microbiol., **128**: 2563.
60. Lucas, C., Costa, M.D. and Van Uden, N. 1990. Osmoregulatory active sodium glycerol co-transport in the halotolerant yeast Deb. hansenii. Yeast, 187-192.
61. Mackay, M.A., Norton, R.S. and Borowitzka, L.J. 1984. Organic osmoregulatory solutes in cyanobacteria. J. Gen. Microbiol., **130**:2177-2191.
62. Martínez. J. 1989. 3<sup>er</sup> Curso Internacional de Tópicos sobre Taxonomía, Conservación y Genética de las Levaduras y su Aplicación en Biotecnología. Colección de Cultivos Microbianos, CINVESTAV- IPN, México.

63. Meyers, S.P., Ahearn, D.G. and Rith Jr. F.J. 1968. Mycological investigations of the black Sea, Bull. Mar. Sci., **173**:576-596.
64. Myers, J.S. and Jacoby, W.B. 1973. Effect of polyhydric alcohols on kinetic parameters enzymes. Biochem. Biophys. Res. Commun., **51**:631-636.
65. Niedermayer, W., Parish, G.R. and Moor, H. 1977. Effect of NaCl in the cellular volume of Saccharomyces cerevisiae. Protoplasma, **92**:177.
66. Nilsson, A. and Adler, L. 1990. Purification and characterization of glycerol-3-phosphate dehydrogenase (NAD<sup>+</sup>) in the salt-tolerant yeast Debaryomyces hansenii. Biochem. Biophys. Actas., **1034**:180-185.
67. Nilsson, A., Thomson, K.S. and Adler, L. 1989. Purification and characterization of glycerol kinase in the salt tolerant Deb. hansenii, Biochem. Biophys. Actas., **991**:296-302.
68. Nolasco, S.H. 1992. Estudio de la proteasa extracelular de la halobacteria Haloferax mediterranei. Participación de las sales en la actividad y estabilidad enzimática. IPN - ENCB. Tesis Doctoral. México D.F.
69. Norkrans, B. 1966. Studies on marine occurring yeast: growth related to pH, NaCl concentration and temperature. Arch. fur Mikrobiol., **54**:374-392.
70. Norkrans, B. 1968. Studies on marine occurring yeast: respiration, fermentation and salt tolerance. Arch. Mikrobiol., **62**:358-372.
71. Norkrans, B. and Kylin, A. 1969. Regulation of the potassium to sodium ratio and of the osmotic potential in relation to salt tolerance in yeast. J. Bacteriol., **160**:836-845.
72. Nurminen, T. and Suomalainen, H. 1971. Occurrence of long-chain fatty acids and glucolipid in the cell envelope fraction of Baker's yeast, Biochem. J., **125**:963-969.
73. Onishi, H. 1957. Studies on osmotic yeast. III Classification of osmophilic soy and miso yeast. Bull. Agric. Chem. Soc. Japan. **21**:143.
74. Onishi, H. 1963. Osmophilic yeast. Food Research, **12**:53-94.
75. Phaff, H.J. 1986. Ecology of the yeast with actual and potential value in biotechnology, Microbiol. Ecol., **12**:31-42.

76. Peña, A. 1975. Evidence of an electrochemical membrane pump in Saccharomyces cerevisiae. Arch. Biochem. Biophys., **167**:397.
77. Rheinheimer, G. 1974. Aquatic Microbiology, John Wiley and Sons. N.Y. 13-14, 59-74.
78. Rosen, H. 1957. The determination of amino acids with ninhydrin. Arch. Biochem. Biophys., **67**:10.
79. Rothstein, A. 1963. Membrane function and physiological activity microorganism. In: Hoffman, J.F. (Ed), The cellular function of membrane transport. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, **23**:39.
80. Sastry, P.S. and Kates, M. 1964. Lipid component of leaves. Galactolipids, cerebrosides and lecithin of runner-bean leaves, Biochem., **3**:1271-1279.
81. Saubenova, M.G., Mukhamedieva, U.S., Puzyrevskaya, O.M., Furyaeva, A.B., Pisman, T.I., Tushkova G.I. and Pechurkin, N.S. 1989. Physiological and biochemical properties of the yeast adapted to sodium chloride in case of continuous cultivation, Prikl. Biokhim. Mikrobiol., **25**:91-96.
82. Scott, W.J. 1957. Water relations of food spoilage microorganisms. Adv. Food Res., **7**:83.
83. Serrano, R. 1989. ATPase role in transport of yeast and fungi. Ann. Rev. Plant Mol. Biol., **40**:61.
84. Stein, W.D. 1986. Transport and diffusion across cell membranes. Academic Press Inc.
85. Tilbury, R.H. 1980. Xerotolerant (osmophilic) yeast. In: Skinner, F.A., Passmore, S.M. and Davenport R.R. (Eds), Biology and Activities of yeast. The Society for Applied Bacteriology Symposium, Series No. 9, Academic Press Inc., New York. 153-179.
86. Thevelein, J.M. 1984. Regulation of the trehalose mobilization fungi. Microbiol. Rev., **48**:42.
87. Tunbland-Johansson, I. and Adler, L. 1987. Effects of sodium chloride concentration on phospholipid fatty acid composition of yeast differing in osmotholerance. FEMS Microbiol. Lett., **43**:275-278.
88. Tunbland-Johansson, I., Andre', L. and Adler, L. 1987. The sterol and phospholipid composition of the salt tolerant yeast Debarvomyces hansenii grown at various concentrations of NaCl. Biochem. Biophys. Acta, **921**:116-123.

89. Van Eck J.H., Prior, B.A. and Brandt, E.V. 1989. Accumulation of polyhydroxy alcohols by Hansenula anomala in response to water stress. J. Gen. Microbiol., **135**:3505-3514.
90. Van Uden, N. and Fell, J.W. 1968. Marine yeast In: Droop, M.R. and Ferguson-Wood, E.J. (Eds), Advances in microbiology of the sea, Academic Press, 167-198.
92. Van der Walt, J.P. and Yarrow, J.P. 1983. Methods for the isolation, maintenance, classification and identification of yeast In: Lodder, J. and Kreger van Rij, N.J.W. (Eds), The yeast, a taxonomic study, Elsevier Science Publishers, 1-100.
92. Van Zyl, P.J. and Prior, B.A. 1990. Water relations of polyol accumulation by Zigosaccharomyces rouxii in continuous culture. Appl. Microbiol. Biotechnol., **33**:12-17.
93. Vázquez-Duhalt, D.R. and Greppin, H. 1987. Growth and production of cell constituents in batch cultures of Botryococcus sudeticus. Phytochemistry, **26**:855-889.
94. Watanabe, Y. and Takakawa, M. 1984. Effect of sodium chloride on lipid composition of Saccharomyces rouxii, Agric. Biol. Chem., **48**:2415-2422.
95. Weast, R.C. 1986. Handbook of Chemistry and physics. 66Th. Edition. C.R.C. Press. New York.
96. Wethered, J.M. and Jennings, D.H. 1985. Major solutes contributing to solute potential of Thraustochytrium aureus and T. roseum after growth in media on different salinities. Trans. Br. Mycol. Soc., **85**:439-446.
97. Yancey P.H., Clark, M.E., Hand, C.S., Bowlus, R.D. and Somero, G.N. 1982. Living with water stress: evolution of osmolyte systems. Sci., **217**:1214-1222.
98. Yemm, E.W. and Willis, J.A. 1954. Estimation of the carbohydrates in plant extracts by anthrone, Biochem. J., **57**:508-514.

## 10. APENDICES

## 10.1 Apéndice 1

Medio LH (Martínez, 1986):

Glucosa	10.0 %
Extracto de levadura	5.0 %
Cloruro de sodio	
Agua destilada	
pH 4.5 ajustado con HCl 0.1 N	

Medio M1 líquido (Hernández, 1990):

Glucosa	2.0 %
Peptona	1.0 %
Extracto de levadura	0.5 %
Agua de mar filtrada	
pH 4.5 ajustado con HCl 0.1 N.	

Medio M1 sólido (Hernández, 1990):

Medio M1 = 2 % de agar.

Medio MB (Lodder y Kreger van Rij, 1983):

Fuentes de nitrógeno;	Sulfato de amonio	3.5 g
	Asparagina	1.5 g
	Glucosa	10.0 g
Aminoácidos:	Histidina	10.0 mg
	Metionina	20.0 mg
	Triptofano	20.0 mg
Metales traza;	Ac. bórico	500.0 µg
	Sulfato de cobre	40.0 µg
	Ioduro de potasio	100.0 µg
	Cloruro férrico	200.0 µg
	Sulfato de manganeso	400.0 µg
	Molibdato de sodio	200.0 µg
	Sulfato de zinc	400.0 µg
Sales;	Fosfato <b>dibásico</b> de potasio	0.85 g
	Fosfato monobásico de potasio	0.15 g
	Sulfato de magnesio	0.10 g

Cloruro de calcio                      0.10 g

El pH del medio se ajusta a 5.5 con HCl 0.1 N y se afora a 1000 ml con agua destilada de máxima calidad.

## 10.2 Apéndice II

## Determinación de proteínas:

Método Lowry (Lowry et al, 1951).

## Reactivos:

Solución A	$\text{Na}_2\text{CO}_3$ al 2 % en NaOH 0.1 N
Solución B	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.5 %
Solución C	Tartrato de Na y K 1 %
Solución D	50 ml de la solución A + 0.5 ml de la solución B + 0.5 ml de la solución C.
Solución E	Reactivo de Folin

## Procedimiento:

- Tomar 1 ml de la muestra
- Agregar 2 ml de la solución D
- Agitar y dejar reposar 10' a temperatura ambiente
- Agregar 0.2 ml del reactivo de Folin
- Agitar y dejar reposar a temperatura ambiente y en obscuridad durante 30'
- Leer en absorbancia a 750 nm

## Estandar:

Pesar 10 mg de Albúmina Sérica Bovina y disolverla en 10 ml de agua destilada de máxima calidad (1 mg/ ml concentración). Tomar 12.5 ml de esta solución y aforar a 25 ml con agua destilada de máxima calidad para obtener una concentración final de 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Sensibilidad 25 - 250  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .

## Método micro-Lowry

## Reactivos:

Solución A	$\text{Na}_2\text{CO}_3$ al 3 % en NaOH 0.2 N
Solución B	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 2 %
Solución C	Tartrato de Na y K 4 %
Solución D	48 ml de la solución A + 1 ml de la solución B + 1 ml de la solución C.
Solución E	Reactivo de Folin

## Procedimiento:

- Tomar 200  $\mu\text{l}$  de la muestra o estándar
- Agregar 1 ml de la solución D

- c) Agitar y dejar reposar 10' a temperatura ambiente
- d) Agregar 100  $\mu$ l de la solución de Folin 2 N
- e) Agitar y dejar reposar a temperatura ambiente y en oscuridad durante 30'
- f) Leer en absorbancia a 750 nm

#### Estandar:

Pesar 10 mg de Albúmina Sérica Bovina y disolverla en 10 ml de agua destilada de máxima calidad (1 mg/ ml concentración). Tomar 12.5 ml de esta solución y aforar a 25 ml con agua destilada de máxima calidad para obtener una concentración final de 500  $\mu$ g/ml. Sensibilidad 25 - 250  $\mu$ g/ml.

#### Determinación de carbohidratos:

Método de la antrona (Yemm y Willis, 1954)

#### Reactivos:

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  
 Antrona (9,10 dihidro, 9, oxeantraceno) 2 X 10<sup>-3</sup> g/ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

#### Procedimiento:

- a) Tomar 1 ml de muestra
- b) Añadir 2 ml del reactivo de antrona tapando los tubos
- c) Agitar los tubos y sumergirlos en baño de hielo
- d) Calentar los tubos a 80°C durante 15'
- e) Enfriar en baño de hielo
- f) Leer en absorbancia a 630 nm

#### Estándar:

Pesar 12 mg de glucosa y diluirla en 100 ml de agua destilada de máxima calidad, para obtener una concentración final de 0.12 mg/ml = 120  $\mu$ g/ml. Sensibilidad 12 - 120  $\mu$ g/ml.

#### Determinación de aminoácidos totales:

Método de la ninhidrina (Rosen, 1957)

#### Reactivos:

Solución A	NaCN 0.005 M
Solución B	Bofer de acetato: A 360 g de acetato

	de sodio trihidratado en 200 ml de agua destilada se le adicionan 65.5 ml de ácido acético glacial. Aforar a 1000 ml con agua destilada. pH 5.3 - 5.4.
Solución C	NaCN 0.0001 M en bofer de acetato.
Solución D	Ninhidrina al 3 % en metilcelosolve
Solución E	alcohol isopropílico-agua destilada(1:1 v/v)

Procedimiento:

- a) Mezclar 0.5 ml de muestra + 0.5 ml de agua destilada de máxima calidad. Agitar
- b) Adicionar 0.5 ml de la solución C. Agitar
- c) Adicionar 0.5 ml de solución D. Agitar
- d) Poner los tubos (tapados) en baño María a 100°C durante 15'
- e) Sin enfriar agregar rapidamente y agitando vigorosamente 5 ml de la solución E.
- f) Dejar enfriar a temperatura ambiente. El color es estable.
- g) Leer absorbancia a 570 nm ( a 440 para prolina e hidroxiprolina)

NOTA: Si el color es demasiado obscuro agregue otros 5 ml de la solución E.

Determinación de glicerol:

Método de Sastry y Kates (1964)

Reactivos:

Solución A	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 10 N
Solución B	NaIO <sub>4</sub> 0.1 M
Solución C	Na HSO <sub>4</sub> al 10 %
Solución D	100 mg de 1,8 dihidroxinaftaleno-3,6- ácido disulfónico en 10 ml de agua, la mezcla se disuelven en 45 ml de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 24 N.

Procedimiento:

- a) A 2 ml de muestra se le agregan 0.1 ml de la

- solución A y 0.5 ml de la solución B. Se mezclan y se esperan 5'
- b) Se agregan 0.5 ml de la solución C y se mezcla.
  - c) De la solución anterior se toman 0.3 ml y se le adicionan 3 ml de la solución D. Los tubos se agitan, se tapan y se ponen en baño María a 100°C durante 135'
  - d) Los tubos se dejan enfriar 30' y se leen en absorbancia a 570 nm

Estandar:

9.210 mg de glicerol en 100 ml de agua destilada de máxima calidad, para obtener una concentración final de 92.1  $\mu\text{g/ml}$  = 1  $\mu\text{mol}$  de glicerol/ ml. Sensibilidad 0.2 - 2  $\mu\text{mol/ml}$ .

## 10.3 Apéndice III

Fórmulas que describen la relación entre la concentración (en gramos por litro) de cada metabolito citado (X) y la osmolaridad que producen en osmios por kilogramo (Y).

Datos calculados a partir de las tablas presentadas en el Handbook of Chemistry and Physics, 66 Th edition, 1985-1986 (Weast, 1986).

GLUCOSA	$Y = 2.991 \times 10^{-3} X^{0.985}$	$r = 0.95$
GLICEROL	$Y = 6.181 \times 10^{-3} X^{1.160}$	$r = 0.99$
CLORURO DE SODIO	$Y = 0.025 X^{1.053}$	$r = 0.99$

Tabla de soluciones isosmóticas (Bonner, 1982).

Lisina [M]	NaCl [M]	Factor Lis/NaCl
0.300	0.147	2.041
0.505	0.250	2.020
0.828	0.431	1.921
1.290	0.715	1.804
1.798	1.053	1.708
2.424	1.517	1.598
2.970	1.947	1.525
3.190	2.126	1.500
3.925	2.724	1.441
4.380	3.109	1.409
4.619	3.312	1.395
5.436	4.022	1.352
6.587	4.921	1.339

#### 10.4 Apéndice IV

Características fisiológicas y fisicoquímicas de las cepas contempladas en este estudio. Las características de las cepas A 18, Rh. rubra y C 11, Deb. hansenii, se encuentran en las descripciones dadas por Hernandez (1990).

#### Cryptococcus albidus var. albidus

##### Morfología colonial:

Las colonias después de 72 horas de incubación a 25°C tienen las siguientes características: son circulares, de color marfil, tiene un aspecto húmedo y un milímetro de diámetro; son lisas, convexas, de bordes enteros, textura butirosa y brillantes.

##### Morfología celular:

Después de 48 horas de incubación a temperatura ambiente las células son ovoide-esféricas y presentan gemación polar.

##### Reproducción asexual:

Se reproducen por gemación y en placas de Dalmau en medio PDA no desarrollan pseudomicelio. No producen blastosporas, ni cualquier otro tipo de esporas asexuales.

##### Crecimiento en medio líquido:

Después de 72 horas de incubación a temperatura ambiente en medio YPG líquido, no hay formación de anillo, ni película, sólo se observa la acumulación de sedimento.

Intervalo de tolerancia a la salinidad: 0.0 - 13.0 %

Fermentación: no fermenta.

Asimilación de fuentes de nitrógeno: Nitrato de potasio +

Hidrólisis de urea: +

Reacción al yodo: +

Crecimiento a 37 C: +

##### Asimilación de fuentes de carbono:

glucosa	+	galactosa	-	sacarosa	+	maltosa	+
lactosa	+	celobiosa	+	melobiosa	-	rafinosa	+
melezitosa	+	xilosa	+	arabinosa	-	ribosa	-
ramnosa	+	etanol	+	glicerol	-	manosa	+
eritritol	-	manitol	+	sorbitol	+	succinato	+
inositol	+						

Candida sp.

## Morfología colonial:

Después de 72 horas de incubación, las colonias miden de 0.75 a 1 mm de diámetro, son color crema, de superficie lisa, elevación convexa, consistencia butirosa, bordes enteros, lisas, de aspecto húmedo y forma circular.

## Morfología celular:

Después de 48 horas de incubación a 25 C, las células son ovoide-elongadas y presentan gemación multilateral.

## Reproducción asexual:

Se reproducen por gemación y en placas de Dalmat formen, después de 48 horas de incubación a temperatura ambiente, un pseudomicelio bien desarrollado en los bordes de las colonias, con abundantes blastosporas.

## Crecimiento en medio líquido:

Después de 72 horas de incubación a 25 C en medio YPG, la cepa presenta bien desarrollados anillo y sedimento, sin embargo no se observa crecimiento homogéneo ni la formación de película.

Intervalo de tolerancia a la salinidad: de 0.0 a 15.0 % de **NaCl**.

## Fermentación:

No fermenta ninguna de las fuentes de carbono ensayadas.

Asimilación de fuentes de nitrógeno: Nitrato de potasio -

Hidrólisis de urea: -

Reacción al yodo: +

Crecimiento a 37 C: -

## Asimilación de fuentes de carbono:

glucosa	+	galactosa	-	sacarosa	+	maltosa	+
lactosa	+	celobiosa	+	melobiosa	-	rafinosa	+
melezitosa	+	xilosa	+	arabinosa	-	ribosa	-
ramnosa	+	etanol	+	glicerol	-	manosa	+
eritritol	-	manitol	+	sorbitol	+	succinato	+
inositol	+						

Aureobasidium pullulans**Morfología colonial:**

Después de 96 horas de incubación a 25 C en placas de medio YPG las colonias desarrollan una coloración verde olivo, que con el incremento del tiempo de incubación se torna cada vez más oscura. Las colonias son circulares con bordes con abundante micelio, brillantes, lisas, de elevación convexa, de aspecto húmedo y textura butirosa.

**Morfología celular:**

Después de 48 horas de incubación, las células son elongadas y presentan gemación polar.

**Reproducción asexual:**

Se reproducen por gemación polar y en placas de Dalmau desarrollan abundante micelio, con escasas blastosporas.

**Crecimiento en medio líquido:**

Después de 96 horas de incubación a temperatura ambiente en medio YPG líquido, esta cepa sólo desarrolla sedimento. No se observa la formación de anillo ni película.

Intervalo de tolerancia a la salinidad: de 0.0 a 25 % de NaCl.

**Fermentación:**

No fermenta ninguna de las fuentes de carbono ensayadas.

Asimilación de fuentes de nitrógeno: Nitrato de potasio +

Hidrólisis de urea: +

**Reacción al yodo:**

Indefinida, por la coloración que presenta el cultivo.

Crecimiento a 37°C: -

**Asimilación de fuentes de carbono:**

glucosa	+	galactosa	-	sacarosa	+	maltosa	+
lactosa	+	celobiosa	+	melobiosa	-	rafinosa	+
melezitosa	+	xilosa	+	arabinosa	-	ribosa	-
ramnosa	+	etanol	+	glicerol	-	manosa	+
eritritol	-	manitol	+	sorbitol	+	succinato	+
inositol	+						

Rhodotorula rubra

Fecha de aislamiento: 0686  
 Lugar de aislamiento: Pacífico Occidental  
 Crucero: CIB-CICIMAR 8605. Buque Oceanográfico "El Puma".  
 Profundidad de aislamiento: 100 m.

## Morfología colonial:

Después de 96 horas de incubación a 25°C en placas de medio YPG las colonias desarrollan una coloración rosada, que con el incremento del tiempo de incubación se torna cada vez más intensa hasta llegar a una coloración salmón. Las colonias son circulares, con bordes enteros, brillantes, lisas, de elevación convexa, de aspecto húmedo y textura mucosoide; miden de 2 a 3 mm de diámetro.

## Morfología celular:

Después de 48 horas de incubación, las células son ovoides y se pueden presentar en pares o cadenas cortas.

## Reproducción asexual:

Se reproducen por gemación polar y en placas de Dalmau no desarrollan micelio ni pseudomicelio.

## Crecimiento en medio líquido:

Después de 96 horas de incubación a temperatura ambiente en medio YPG líquido, esta cepa desarrolla un sedimento color salmón y ocasionalmente un anillo del mismo color. No hay formación de película.

Intervalo de tolerancia a la salinidad: de 0.0 a 25 % de NaCl.

Fermentación: No fermenta.

Asimilación de fuentes de nitrógeno: Nitrato de potasio -

Hidrólisis de urea: +

Reacción al yodo: -

Crecimiento a 37°C: -

## Asimilación de fuentes de carbono:

glucosa	+	galactosa	v	sacarosa	+	maltosa	
lactosa	-	celobiosa	-	melobiosa	-	rafinosa	+
melezitosa	-	xilosa	+	arabinosa	+	ribosa	+
ramnosa	-	etanol		glicerol	v	manosa	-
eritritol	-	manitol		sorbitol	-	succinato	+
inositol	-						

Debaryomyces hansenii

Fecha de aislamiento: 0686  
 Lugar de aislamiento: Pacífico Occidental  
 Crucero: CIB-CICIMAR 8605. Buque Oceanográfico "El Puma".  
 Profundidad de aislamiento: 50 m.

## Morfología colonial:

Después de 96 horas de incubación a 25°C en placas de medio YPG las colonias desarrollan una coloración marfil. Las colonias son circulares, con bordes enteros, brillantes, son lisas, de elevación convexa, de aspecto húmedo y textura butirosa: miden de 2.5 mm de diámetro.

## Morfología celular:

Después de 48 horas de incubación, las células son esféricas y se pueden presentar en pares o rosetas.

## Reproducción asexual:

Se reproducen por gemación multilateral y en placas de Dalmau se observa un pseudomicelio más o menos desarrollado.

## Crecimiento en medio líquido:

Después de 96 horas de incubación a temperatura ambiente en medio YPG líquido, esta cepa desarrolla un sedimento cremoso, película y un anillo más o menos desarrollado.

Intervalo de tolerancia a la salinidad: de 0.0 a 25 % de NaCl.

## Fermentación:

No fermenta ninguna de las fuentes de carbono ensayadas.

Asimilación de fuentes de nitrógeno: Nitrato de potasio -

Hidrólisis de urea: -

Reacción al yodo: -

Crecimiento a 37°C: -

## Asimilación de fuentes de carbono:

glucosa	+	galactosa	+	sacarosa	+	maltosa	+
lactosa	+	celobiosa	+	melobiosa	-	rafinosa	+
melezitosa	+	xilosa		arabinosa	+	ribosa	-
ramnosa	+	etanol	+	glicerol	-	manosa	+
eritritol	+	manitol	+	sorbitol	+	succinato	+
inositol	-						