



Universidad de Concepción  
Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas  
Ingeniería en Biotecnología Marina y Acuicultura



# **Tolerancia al sodio de fungoides aislados de agua dulce y su potencial cultivo en medio alternativo**

Nikole Belén Barindelli Zenteno

Seminario de título para optar al Título de  
Ingeniera en Biotecnología Marina y Acuicultura

Concepción – Chile  
2025

FACULTAD DE CIENCIAS Y OCEANOGRÁFICAS  
INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA MARINA Y ACUICULTURA

# **Tolerancia al sodio de fungoides aislados de agua dulce y su potencial cultivo en medio alternativo**

Por

NIKOLE BELÉN BARINDELLI ZENTENO

Profesor guía

Dr. RODRIGO RENÉ GONZÁLEZ SALDÍA

SEMINARIO DE TÍTULO PARA OPTAR AL TÍTULO DE  
INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA MARINA Y ACUICULTURA

CONCEPCIÓN – CHILE

Marzo, 2025

**Universidad de Concepción**

**Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas**

Este seminario de Título ha sido realizado en el Departamento de Oceanografía, Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas.

Profesor Guía:

Dr. Rodrigo González Saldía  
Departamento de Oceanografía  
Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas  
Universidad de Concepción, Concepción

Comisión Evaluadora:

Dr. Renato Quiñones Bergeret  
Dir. Centro Interdisciplinario Investigación Acuícola (INCAR)  
Departamento de Oceanografía  
Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas  
Universidad de Concepción, Concepción

Dr. Fernando Cruzat Cruzat  
Departamento de Oceanografía  
Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas  
Universidad de Concepción, Concepción

Coordinador Seminario de Título:

Dr. Fernando Cruzat Cruzat  
Departamento de Oceanografía  
Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas  
Universidad de Concepción, Concepción

## **Agradecimientos**

Al culminar esta significativa etapa universitaria, me embarga un profundo sentimiento de gratitud hacia quienes formaron parte de este proceso. Agradezco sinceramente su compañía constante, las palabras de aliento, los gestos de cariño y el invaluable apoyo emocional que me brindaron a lo largo del camino.

En primer lugar, quiero agradecer y dedicar este trabajo de investigación a mis padres, Carmen y Johnny, y mi hermano Angelo, por ser siempre mi motor para seguir adelante. Gracias por apoyar incondicionalmente cada una de mis decisiones, por acompañarme con palabras de motivación cargadas de amor y por ser mis más grandes admiradores en cada etapa vivida a lo largo de mi carrera universitaria.

También deseo expresar mi sincero agradecimiento a mi profesor guía el Dr. Rodrigo González, por haber sido parte de mi formación tanto académica como personal. Gracias por todas las oportunidades de aprendizaje, tanto en el laboratorio como en campañas, viajes y proyectos. Agradezco profundamente su paciencia, dedicación, cariño y la confianza depositada en mí. Gracias por las charlas, las enseñanzas, las risas compartidas y sobre todo, por creer en mí en cada paso del camino.

Agradezco también a todos los miembros del laboratorio por su constante apoyo, motivación y compañerismo durante este proceso. A mis compañeras del LABBOM, Kathy, Caro y Jaque, gracias por compartir este camino con dedicación y buena disposición. En especial, a Tati, por su comprensión, cercanía y el apoyo incondicional que siempre me brindó.

A mis amigos de la carrera, Lucas, Monse y Nico, quienes siempre fueron el mejor “club del té”, gracias por ser el grupo de apoyo incondicional. Por transformar las tristezas en risas, por acompañarme en los desafíos académicos y personales, y por hacer de esta etapa una experiencia inolvidable llena de cariño y complicidad.

A la familia que no esperaba formar, a mis amigos del 201. Gracias por acompañarme en mis momentos más hiperactivos, en los de locura, en las alegrías y tristezas, por su paciencia, cariño y por convertirse en mi hogar durante este último periodo.

A mi amiga/hermana incondicional Javiera, que siempre ha estado presente en cada uno de mis procesos con su amor infinito.

A mis amigas de Santiago, que el barco nunca se hunda.

Finalmente, agradecer al Convenio con la Ilustre Municipalidad de Quillón y al Programa de Plataforma Observación Costera para la Docencia e Investigación en Ciencias del Mar, Departamento de Oceanografía, Facultad de Ciencias Naturales y oceanográficas, Universidad de Concepción, por financiar la presente tesis.

## Índice de contenidos

	Página
<b>1. Introducción</b> .....	14
<b>1.1. Rol ecológico</b> .....	14
<b>1.2. Adaptación de las levaduras a la salinidad</b> .....	15
<b>1.3. Metabolitos secundarios</b> .....	16
<b>1.4. Aplicación de los hongos marinos</b> .....	16
<b>1.4.1 Uso en acuicultura y control biológico</b> .....	16
<b>1.4.2 Nutrición animal</b> .....	17
<b>1.4.3 Salmonicultura</b> .....	17
<b>1.4.4 Producción de pigmentos naturales</b> .....	17
<b>1.4.5 Industria cosmética</b> .....	18
<b>1.4.6 Producción de enzimas para biorremediación</b> .....	19
<b>1.5. Medios de cultivos</b> .....	19
<b>2. Problema de investigación</b> .....	20
<b>3. Hipótesis</b> .....	21
<b>4. Objetivo general:</b> .....	21
<b>4.1. Objetivos específicos:</b> .....	21
<b>5. Materiales y métodos</b> .....	22
<b>5.1 Objetivo 1: Caracterizar cepas de fungoides aisladas de agua dulce mediante su contenido de carotenoides cultivados en medio comercial.</b> .....	22
<b>5.1.1 Medición de parámetros fisicoquímicos.</b> .....	22
<b>5.1.2 Toma de muestras y aislación de cepas.</b> .....	23
<b>5.1.3 Determinación de carotenoides totales (CT).</b> .....	23
<b>5.2 Objetivo 2: Determinar el crecimiento y concentración de carotenoides de fungoides aislados de agua dulce en un gradiente de salinidad desde 0 a 30 PSU.</b> .....	23
<b>5.2.1 Toma de muestra para preparación de diluciones salinas</b> .....	24
<b>5.2.2 Preparación de diluciones salinas y medios de cultivos.</b> .....	24
<b>5.2.3 Preparación de inóculo de cepa seleccionada aislada de agua dulce.</b> .....	24

5.2.4	Determinación de carotenoides totales y cinética de crecimiento celular.....	24
5.2.5	Medición de actividad enzimática de malato deshidrogenasa (MDH).....	25
5.2.6	Medición de biomasa microbiana viva (ATP).....	25
5.2.7	Extracción de ADN .....	25
5.2.8	PCR amplificación del gen 18S.....	26
5.2.9	Análisis microscópico de cepas aisladas.....	26
5.3	Objetivo 3: Determinar el crecimiento y concentración de carotenoides totales de fungoides aislados de agua dulce cultivados en glicerol p.a.....	26
5.3.1	Preparación de medio glicerol p.a. 10% (v/v) a 0 PSU.....	26
5.3.2	Determinación de concentración de carotenoides totales y cinética de crecimiento celular. ....	27
5.3.3	Análisis estadístico.....	27
6.	Resultados.....	28
6.1	Objetivo 1: Caracterizar cepas de fungoides aisladas de agua dulce mediante su contenido de carotenoides, cultivados en medio comercial.....	28
6.1.1	Parámetros fisicoquímicos .....	28
6.1.2	Concentración de nutrientes Humedal Urbano Laguna Avendaño de Quillón.....	28
6.1.3	Determinación de carotenoides totales (CT) .....	29
6.2	Objetivo 2: Determinar el crecimiento y producción de carotenoides de fungoides aislados de agua dulce en un gradiente de salinidad desde 0 a 30 PSU. ....	30
6.2.1	Preparación de inóculos cepa Q4 y Q7 .....	30
6.2.2	Crecimiento celular de cepas Q4 y Q7 en el experimento de desafío de salinidad.	31
6.2.3	Concentración de carotenoides totales (CT).....	33
6.2.4	Medición de malato deshidrogenasa (MDH), biomasa microbiana (ATP) y cinética de crecimiento.....	35
6.2.5	Identificación del microorganismo.....	38
6.3	Objetivo 3: Determinar el crecimiento y concentración de carotenoides de fungoides aislados de agua dulce cultivados en glicerol p.a. ....	44
7.	Discusión.....	47

<b>8. Conclusiones</b> .....	52
<b>9. Referencias</b> .....	53

## Índice de figuras

	Página
<b>Figura 1.</b> Mapa de muestreo del Humedal Urbano Laguna Avendaño de Quillón (Región de Ñuble, Chile).....	22
<b>Figura 2.</b> Preparación de inóculos para el experimento de desafío de salinidad. A) Curva de crecimiento celular (células/mL) de la cepa Q4 durante 65 horas hasta su fase exponencial. B) Crecimiento celular (células/mL) de la cepa Q7 durante 144 horas para preparación del inóculo hasta su fase estacionaria.	30
<b>Figura 3.</b> Curva de crecimiento celular de Q4 células/mL $\pm$ desviación estándar, expuesta a un gradiente de salinidad (0, 5, 10, 15, 20, 25 y 30 PSU) durante 216 horas.....	31
<b>Figura 4.</b> Correlación de Spearman entre el tiempo de crecimiento y la concentración celular (células/mL) en el gradiente de salinidad 0 y 30 PSU. ....	32
<b>Figura 5.</b> Curva de crecimiento celular de Q7 (células/mL $\pm$ desviación estándar) en el gradiente de salinidad (0, 5, 10, 15, 20, 25 y 30 PSU) durante 192 horas. ....	33
<b>Figura 6.</b> Concentración de carotenoides totales (CT) en ng/mg, de la cepa Q4 al final del experimento del desafío de salinidad transcurridas 216 horas.....	34
<b>Figura 7.</b> Concentración de carotenoides totales (CT) en ng/mg, para la cepa Q7 al final del experimento del desafío de salinidad, luego de 196 horas.....	34
<b>Figura 8.</b> Correlación de Spearman de la biomasa microbiana viva (ATP) al final del experimento de desafío de salinidad de la cepa Q7 y el gradiente de salinidad (PSU).....	37
<b>Figura 9.</b> Comparación de los promedios de cinética de crecimiento celular ( $\mu$ máx.(h <sup>-1</sup> ) del gradiente de salinidad (0,5,10,15,20 y 25 PSU) entre las cepas Q4 y Q7 al final del experimento del desafío de salinidad. ....	37
<b>Figura 10.</b> Regresión lineal entre la cinética de crecimiento ( $\mu$ máx.(h <sup>-1</sup> ) y la salinidad (PSU) de la cepa Q7.....	38
<b>Figura 11.</b> Electroforesis de producto de PCR 18S para control positivo de extracción de ADN animal (perro) y extracción de ADN de las cepas seleccionadas Q4 y Q7. ....	39
<b>Figura 12.</b> Imagen microscópica, tomada en un microscopio óptico con el objetivo 40x de la cepa Q4 del control (0 PSU) al término del desafío de gradiente de salinidad.....	40
<b>Figura 13.</b> Imagen microscópica, tomada en un microscopio óptico con el objetivo 40x de la cepa Q4 a 15 PSU al término del desafío de gradiente de salinidad.....	40
<b>Figura 14.</b> Imagen microscópica, tomada en un microscopio óptico con el objetivo 40x de la cepa Q4 a 30 PSU al término del desafío de gradiente de salinidad.....	41
<b>Figura 15.</b> Imagen microscópica, tomada en un microscopio óptico con el objetivo 40x de la cepa Q7 del control (0 PSU) al término del desafío de gradiente de salinidad.....	41

<b>Figura 16.</b> Imagen microscópica, tomada en un microscopio óptico con el objetivo 40x de la cepa Q7 a 5 PSU al término de desafío de gradiente de salinidad.....	42
<b>Figura 17.</b> Imagen microscópica, tomada en un microscopio óptico con el objetivo 40x de la cepa Q7 a 10 PSU al término del desafío de gradiente de salinidad.....	42
<b>Figura 18. Imagen de morfología de cepa Q7. A).</b> Imagen microscópica, tomada en un microscopio óptico con el objetivo 10x de la cepa Q7 a 15 PSU al término del desafío de salinidad. <b>B)</b> Imagen microscópica, tomada en un microscopio óptico con el objetivo 40x de la cepa Q7 a 15 PSU al término de desafío de salinidad. ....	43
<b>Figura 19.</b> Imagen microscópica, tomada en un microscopio óptico con el objetivo 40x de la cepa Q7 a 30 PSU al término de desafío de salinidad. ....	43
<b>Figura 20.</b> Curva de crecimiento celular (células/mL) de la cepa Q4 durante 96 horas hasta llegar a su fase estacionaria. ....	44
<b>Figura 21.</b> Curva de crecimiento celular (células/mL) de cepa Q4 en glicerol al 10% v/v a 0 PSU y medio control durante 96 horas hasta llegar a la fase de senescencia. ....	45
<b>Figura 22.</b> Concentración de carotenoides totales (ng/mL), determinado al final del experimento del desafío de salinidad en medio control Sabouraud y glicerol al 10% v/v a 0 PSU.....	45
<b>Figura 23.</b> Cinética de crecimiento celular de la cepa Q4 en medio control y en medio glicerol p.a. al 10% v/v a 0 PSU.....	46

## Índice de tablas

	<b>Página</b>
<b>Tabla 1.</b> Parámetros fisicoquímicos (promedios $\pm$ desviación estándar) por estaciones del año, para el Humedal Urbano Laguna Avendaño de Quillón (Región de Ñuble, Chile) durante los muestreos de invierno 2023 a invierno 2024. ....	28
<b>Tabla 2.</b> Nutrientes, nitrato, nitrito y fosfato (promedios $\pm$ desviación estándar) por estaciones de muestreo, desde el periodo de invierno 2023 a invierno 2024, obtenidas del Humedal Urbano Laguna Avendaño de Quillón .....	29
<b>Tabla 3.</b> Concentración de carotenoides totales (CT) en cepas aisladas del Humedal Urbano Laguna Avendaño de Quillón durante el invierno 2023 y el invierno 2024. ....	29
<b>Tabla 4.</b> Promedio $\pm$ desviación estándar de actividad enzimática de malato deshidrogenasa (MDH) al final del experimento de salinidad y cinética de crecimiento de la cepa Q4. ....	35
<b>Tabla 5.</b> Promedio $\pm$ desviación estándar de actividad enzimática de malato deshidrogenasa (MDH) al final del experimento de salinidad y biomasa microbiana viva (ATP) en etapa inicial y final del desafío de la cepa Q7 y cinética de crecimiento celular.....	36
<b>Tabla 6.</b> Concentración y pureza de ADN extraídos desde Q4 y Q7, tejido control. ....	39

## Resumen

La adaptación a los cambios de salinidad en levaduras se consigue mediante modificaciones fisiológicas y la expresión genética de la célula que implica la regulación en los sistemas de transporte en la membrana plasmática que afecta la turgencia celular. Debido a su capacidad para producir compuestos bioactivos, como ácidos grasos poliinsaturados y carotenoides de alto valor nutricional, estos microorganismos se han convertido en un interesante objeto de estudio. No obstante, su uso para producir estos compuestos enfrenta desafíos, como el aislamiento de cepas con características óptimas para su cultivo masivo y de bajo costo. A pesar de los estudios ya existentes en levaduras, aún se desconoce en gran medida el efecto de la salinidad sobre el crecimiento celular y la producción de metabolitos secundarios. Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo fue investigar cepas de fungoides aisladas de agua dulce y su potencial para producir carotenoides cuando son sometidas a un gradiente de salinidad. Así también, se investigó su capacidad de utilizar una fuente de carbono alternativa, distinta a los medios comerciales para proyectar el posible escalamiento del bioproceso.

Se estudiaron 17 cepas de fungoides pigmentados aisladas a fines del invierno de 2023 y 2024, desde el Humedal Urbano Laguna Avendaño (Comuna de Quillón, Región de Ñuble, Chile). De estas, se seleccionaron dos cepas (Q4 y Q7), con un alto contenido de carotenoides totales para evaluar su respuesta frente a un gradiente de salinidad (0, 5, 10, 15, 20, 25 y 30 PSU). Los resultados muestran que ambas cepas son sensibles al incremento de la concentración de sal, no obstante, el crecimiento celular de Q4 correlaciona significativamente ( $p < 0,001$ ) con el tiempo de cultivo a 0 PSU (control) y 30 PSU ( $r^2 = 0,95$ ,  $r^2 = 0,89$ , respectivamente). Para esta cepa, en las otras salinidades no se observó un crecimiento significativo. En contraste Q7 muestra un efecto inverso frente a la salinidad tipo “dosis respuesta” y logra llegar a la fase estacionaria más rápidamente (144 h) que Q4 (192 a 216 h). No obstante, en la fase estacionaria Q4 alcanza una mayor densidad celular a 30 PSU ( $56375 \pm 11136$ ), que Q7 (0PSU;  $33000 \pm 707$  células/mL). Así también, al final del experimento la cepa Q4 mostró una mayor concentración de carotenoides totales ( $p = 0,014$ ,  $p < 0,05$ ) que la cepa Q7, por lo tanto, fue la mejor candidata para explorar su crecimiento en glicerol como una fuente alternativa de carbono.

Los resultados del ensayo con glicerol p.a. para evaluar el potencial de escalamiento del cultivo de la cepa Q4 mostraron que su crecimiento promedio fue significativamente mayor ( $p < 0,05$ ), en este sustrato ( $38500 \pm 22585$  células/mL) que en medio Sabouraud ( $7075 \pm 2619$  células/mL). No obstante, al final del experimento la concentración de carotenoides totales no mostró diferencias significativas entre ambos medios.

En conclusión, el crecimiento de las cepas de levaduras aisladas de agua dulce es afectado por el incremento de la concentración de sal, sin embargo, Q4 es capaz de crecer a 30PSU como el control a 0PSU lo que demuestra que posee mecanismos de adaptación al incremento de salinidad que se activan sobre el umbral de los 25 PSU, en cambio, Q7 responde inversamente al incremento de salinidad, lo que demuestra que este tipo de organismos poseen más de un mecanismo adaptativo para enfrentar el estrés salino. Esta observación puede ser relevante en el desciframiento de la diversidad de mecanismos adaptativos de los fungoides facultativos. Así también, Q4 demostró tener el potencial de crecer en un medio alternativo, como el glicerol proveniente de la industria de biodiesel, que normalmente está contaminado con sodio. Finalmente, dado el reducido tiempo para realizar este seminario, los intentos para identificar molecularmente el tipo de microorganismo de la cepa Q4 fueron infructuosos, sin embargo, su morfología es consistente con el grupo de las levaduras. Mayor investigación al respecto debe ser realizada en este sentido.

**Palabras claves:** Fungoides marinos, fungoides de agua dulce, tolerancia a la sal, glicerol p.a, uso de medio de cultivo alternativo.

## Abstract

The adaptation to salinity changes in yeasts is achieved through physiological modifications and gene expression regulation, which involves adjustments in plasma membrane transport systems affecting cellular turgor. Due to their ability to produce bioactive compounds such as polyunsaturated fatty acids and high nutritional value carotenoids, these microorganisms have become an interesting subject of study. However, their use to produce these compounds faces challenges, such as the isolation of strains with optimal characteristics for large-scale and cost-effective cultivation. Despite existing studies on yeasts, the effect of salinity on cell growth and secondary metabolite production remains largely unknown. Therefore, the objective of this study was to investigate fungal strains isolated from freshwater and their potential to produce carotenoids when subjected to a salinity gradient. Additionally, their ability to utilize an alternative carbon source, different from commercial media, was explored to assess the feasibility of scaling up the bioprocess.

Seventeen pigmented fungal strains were isolated in late winter 2023 and 2024 from the Humedal Urbano Laguna Avendaño (Quillón Commune, Ñuble Region, Chile). Two strains (Q4 and Q7) with high total carotenoid content were selected to evaluate their response to a salinity gradient (0, 5, 10, 15, 20, 25, and 30 PSU). The results showed that both strains were sensitive to increasing salt concentrations. However, Q4's cell growth significantly correlated ( $p < 0.001$ ) with culture time at 0 PSU (control) and 30 PSU ( $r^2 = 0.95$ ,  $r^2 = 0.89$ , respectively). No significant growth was observed at other salinities for this strain. In contrast, Q7 exhibited an inverse "dose-response" effect to salinity, reaching the stationary phase more rapidly (144 h) than Q4 (192 to 216 h). However, in the stationary phase, Q4 reached a higher cell density at 30 PSU ( $56,375 \pm 11,136$  cells/mL) compared to Q7 (0 PSU;  $33,000 \pm 707$  cells/mL). Additionally, at the end of the experiment, Q4 had a higher total carotenoid concentration ( $p = 0.014$ ,  $p < 0.05$ ) than Q7, making it the best candidate for further exploration of its growth in glycerol as an alternative carbon source.

The results of the glycerol p.a. assay to evaluate the scaling potential of Q4 showed that its average growth was significantly higher ( $p < 0.05$ ) in this substrate ( $38,500 \pm 22,585$  cells/mL) than in Sabouraud medium ( $7,075 \pm 2,619$  cells/mL). However, at the end of the experiment, total carotenoid concentration showed no significant differences between the two media.

In conclusion, the growth of yeast strains isolated from freshwater is affected by increasing salt concentration. However, Q4 can grow at 30 PSU similarly to the control at 0 PSU, demonstrating its ability to activate adaptive mechanisms above the 25 PSU threshold. In contrast, Q7 exhibits an inverse response to increasing salinity, indicating that these organisms possess multiple adaptive mechanisms to cope with salt stress. This observation may be relevant to deciphering the diversity of adaptive mechanisms in facultative fungal species. Additionally, Q4 demonstrated the potential to grow in an alternative medium, such as glycerol from the biodiesel industry, which is typically contaminated with sodium. Finally, due to the limited time available for this study, attempts to molecularly identify the Q4 strain were unsuccessful. However, their morphology is consistent with the yeast group. Further research is needed in this regard.

## **1. Introducción**

Las levaduras son un tipo de hongos microscópicos eucariontes, que pueden desarrollarse en condiciones aeróbicas y anaeróbicas. Su reproducción ocurre principalmente por gemación o fisión, lo que puede dar lugar a la formación de micelio o hifas. Estas especies poseen características metabólicas destacadas, reguladas por su genómica (Chambergo & Valencia, 2016) y altamente influenciadas por las condiciones ambientales en la que se desarrollan (Kutty & Philip, 2008). Además, su capacidad para ser aisladas y cultivadas con facilidad (Dar et al., 2024), así como el manejo accesible de su ADN y ARN, las convierten en organismos modelos en estudios científicos enfocados en biotecnología y fisiología microbiana (Santacruz, 2004).

A nivel estructural, las levaduras presentan células de formas variadas, incluyendo ovaladas, esféricas o alargadas, con tamaños que oscilan entre 5 y 30 micrómetros de longitud y entre 2 y 10 micrómetros de ancho (Lozano et al., 2022). Estas células carecen de movilidad y poseen una pared celular rígida compuesta por polisacáridos (glucanos), proteínas y lípidos. Debajo de esta pared celular se encuentra la membrana citoplasmática, que envuelve el citoplasma que contiene organelos, como vacuolas, ribosomas y mitocondrias. Entre estas estructuras celulares, las mitocondrias desempeñan un papel fundamental como centro energético, donde los carbohidratos, lípidos y aminoácidos se oxidan a CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O mediante la acción del oxígeno molecular, permitiendo la síntesis de ATP (adenosina trifosfato (Kocková-Kratochvílová et al., 1990).

En la actualidad, estos microorganismos se utilizan como modelo de estudio, especialmente para dar soluciones ambientales frente a factores como la sequía y la salinidad. Estos factores reducen la actividad química del agua y afectan la turgencia celular, impactando en el metabolismo de las levaduras (Serrano et al., 1999).

### **1.1. Rol ecológico**

En los ecosistemas, las levaduras participan activamente en la descomposición de materia orgánica y en las interacciones tróficas, contribuyendo al equilibrio ambiental (Shearer et al., 2006). Tienen una amplia distribución geográfica, gracias a su capacidad de adaptación a diversos ambientes (Kutty & Philip, 2008). En el caso de las levaduras marinas, se ha demostrado su característica de proliferar en distintos hábitats acuáticos, incluyendo ríos y lagos. Lo que sugiere que, la erosión es uno de los transportes que favorecen su disposición y presencia en los cuerpos de agua (Roth et al., 1962). Además, algunas levaduras marinas, son conocidas como levaduras facultativas, las cuales se originaron en hábitats terrestres y sobreviven en ambientes marinos (Yu et al., 2023).

El ambiente marino es una de las fuentes más ricas en biodiversidad microbiana y representa un ambiente altamente competitivo, con una evolución extensa y aún poco explotada en comparación con otros hábitats terrestres (Tasdemir, 2017). Esto brinda una oportunidad significativa para el descubrimiento de nuevas cepas de hongos marinos, los cuales desempeñan roles claves dentro de las comunidades microbiológicas y pueden encontrarse en distintos nichos ecológicos como saprófitos, parásitos o simbioses (Li et al., 2014).

Por lo que el estudio de la colonización y distribución de estos microorganismos en diversos ecosistemas resulta esencial para comprender la diversidad genética de las levaduras, su biogeografía y sus interacciones. Asimismo, permite analizar su papel ecológico y su potencial biotecnológico, abriendo nuevas posibilidades para su aplicación en áreas como la producción de metabolitos de interés industrial, la biorremediación y el desarrollo de compuestos bioactivos con valor farmacéutico y ambiental (Fenner et al., 2024).

## **1.2. Adaptación de las levaduras a la salinidad**

La exposición de este tipo de microorganismos a condiciones de alta salinidad no solo representa un desafío para su supervivencia, sino que también puede influir significativamente en su metabolismo secundario, conduciendo a la síntesis de compuestos de interés biotecnológico (Pan et al., 2024). *Saccharomyces cerevisiae* fue la primera levadura cuyo genoma fue secuenciado completamente, lo que la ha convertido en un modelo de estudio ampliamente utilizado en biotecnología y microbiología. En condiciones de alta salinidad genera toxicidad iónica debido a la sensibilidad de la enzima Hal2, lo que inhibe su actividad enzimática y provoca la acumulación de pAp (3'-fosfoadenilato), un compuesto tóxico para la célula (Serrano et al., 1998). Además, el sodio interfiere en el transporte de iones catiónicos como potasio ( $K^+$ ) y calcio ( $Ca^{2+}$ ), afectando la función de los transportadores de potasio (Trk), esenciales para el equilibrio osmótico y el pH intracelular (Serrano et al., 1998). Alteraciones en los gradientes iónicos pueden comprometer el potencial electroquímico de la membrana y el balance de otros iones, particularmente en condiciones de estrés salino (Antunes & Sá-Correia, 2024).

La tolerancia al sodio en hongos de agua dulce es un aspecto poco estudiado, pero su análisis es clave para comprender su fisiología, bioquímica y expresión génica, además de sus aplicaciones en biotecnología. Por ejemplo, el cultivo de hongos en medios alternativos con distintos niveles de sodio podría facilitar la producción controlada de biomasa fúngica, permitiendo la obtención de metabolitos secundarios con alto valor industrial (Damare et al., 2012).

### 1.3. Metabolitos secundarios

Los hongos marinos han demostrado ser una fuente importante de compuestos bioactivos debido a su capacidad de sobrevivir en condiciones extremas. Han desarrollado rutas metabólicas especializadas para la producción de diversas biomoléculas, como enzimas, proteínas, sustancias bioactivas y nanopartículas (Chi et al., 2016). La producción de estos metabolitos suele activarse en respuesta a condiciones de estrés, como daños al ADN (Kamat et al., 2023).

Uno de los compuestos activos más estudiados, son los carotenoides, ya que tiene propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, anticancerígenas y su potencial como pigmentos naturales (Saubenova et al., 2024). Este tipo de compuesto juega un papel clave en la salud animal y humana. Así, la fermentación microbiana se ha posicionado como un método eficiente y sostenible para la producción de carotenoides, al ser más rápida y eficaz en comparación con otros métodos de obtención (Zhao et al., 2019)

### 1.4. Aplicación de los hongos marinos

#### 1.4.1 Uso en acuicultura y control biológico

Las levaduras marinas han sido objeto de estudio por su potencial como probióticos en la acuicultura (Makhutova et al., 2024), donde se emplean para mejorar la salud y el crecimiento de peces tanto en agua dulce como en ambiente marinos. Su uso ha sido documentado en el tratamiento de enteritis infecciosa aguda y en la prevención de trastornos asociados con el uso de antibiótico en *Thymallus baicalensis* (Makhutova et al., 2024). Este microorganismo presenta ventajas significativas, como requerimientos nutricionales simples, alta capacidad de adaptación a condiciones ambientales adversas y resistencia a una amplia gama de fungicidas (Overland et al., 2017)

Estas levaduras presentan ventajas significativas, como requerimientos nutricionales simples, se adaptan, altas capacidad de adaptación. Además, su compatibilidad con otros tratamientos químicos y físicos, junto con su nula patogenicidad y la ausencia de producción de sustancias tóxicas para los seres humanos, refuerzan su potencial como agentes biotecnológicos de interés (Gostinčar et al., 2011).

Algunas de las especies más destacadas en aplicaciones industriales incluyen *Rhodotorula glutinis*, *Candida oleophila*, *C. sake*, *Kloeckera apiculata*, *Debaryomyces hansenii*, *Cryptococcus albidus*, entre otras (Gephart et al., 2022). Sin embargo, a pesar de su potencial, sigue existiendo una limitada cantidad de estudios sobre levaduras marinas con actividad bio-controladora frente a fitopatógenos. Se ha sugerido que estas levaduras podrían tener incluso un mayor impacto agronómico que las aisladas en ambientes terrestres, ya que han demostrado capacidades inhibitorias contra patógenos como *Penicillium digitatum*,

el moho verde *Alternaria alternata* y *Monilinia fructicola*, hongos que originan enfermedades (Kutty & Philip, 2008).

#### **1.4.2 Nutrición animal**

En la industria de nutrición animal, el uso de hongos, levaduras y bacterias se ha convertido en una estrategia prometedora para suplir la creciente demanda de ingredientes clave como proteínas, fibras, aceites, vitaminas y pigmentos naturales (Kouba & Mourot, 2011). Los hongos marinos ofrecen una alternativa viable para la producción de materias primas de bajo costo y alto valor nutricional, contribuyendo a mejorar la calidad de los alimentos balanceados y la digestibilidad de ciertos nutrientes esenciales, como el fósforo (Sun et al., 2024). También, su inserción en la dieta animal puede ayudar a reducir factores anti nutricionales, mejorando la eficiencia alimentaria y promoviendo la salud de los animales (Alem, 2024).

#### **1.4.3 Salmonicultura**

La salmonicultura es uno de los sectores más activos y en constante desarrollo del sistema alimentario mundial (FAO, 2020). Sin embargo, una de las limitaciones asociadas en las dietas de los salmones (carnívoros), conocidos por su interés comercial y por contener un alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados y músculos pigmentados de color anaranjado (Makhutova et al., 2024). Los salmónidos, no tienen la capacidad de sintetizar carotenoides por sí mismos y, por lo tanto, son absolutamente dependientes de la dieta para lograr la pigmentación de color rosado-naranja. La industria del salmón desde sus inicios ha utilizado pigmentos en la formulación del alimento, ya que es la única vía posible para que los peces en cautiverio alcancen el color esperado. Para esto se utiliza astaxantina y cantaxantina, que son los carotenoides más eficientes para este fin y por lo tanto son los más utilizados en la industria del salmón (Alem, 2024).

#### **1.4.4 Producción de pigmentos naturales**

El color de los pigmentos desempeña un papel fundamental en la percepción sensorial de los consumidores, ya que está asociada con la frescura, la calidad y la seguridad del producto. En los últimos años, la industria alimentaria ha demostrado un interés creciente en el uso de pigmentos naturales como alternativa a los colorantes sintéticos, debido a los efectos adversos que estos últimos pueden generar en la salud humana (Malik et al., 2012). Los de origen natural se derivan principalmente de plantas y microalgas. Sin embargo, su producción presenta desafíos como la variabilidad en el rendimiento, la susceptibilidad a cambios de pH y temperatura, y los altos costos de cultivo. En este contexto, las

levaduras pigmentadas han surgido como una fuente alternativa prometedora para la síntesis de carotenoides, que son un grupo muy extendido de pigmentos lipofílicos de origen natural (Zhao & Li, 2022) y que son un compuesto orgánico derivado del isopreno, formados por una cadena de 40 carbonos que se caracteriza por la presencia de una larga cadena de polienos, en la que el número de enlaces puede variar de 3 a 15, la cual es responsable de la producción de los colores percibidos por el ojo humano (García-Cortés et al., 2021). Este tipo de microorganismos, pueden cultivarse en sistemas controlados, independientemente de los factores abióticos. Al mismo tiempo, sus pigmentos han demostrado una alta estabilidad a la luz, el calor y el pH, lo que los hace ideales para su aplicación en la industria alimentaria (Tibor, 2007). Por tanto, existe una necesidad urgente de pigmentos alternativos, que sean naturales, rentables y fácilmente degradables, sin producción de intermediarios (Amend et al., 2019).

Algunos de los pigmentos más utilizados en la industria alimentaria pueden clasificarse en naturales o sintéticos. Sin embargo, debido a la creciente demanda de ingredientes más seguros y sostenibles, la industria ha comenzado a explorar nuevas fuentes de colorantes naturales, entre ellas los hongos marinos. Estos microorganismos han demostrado ser una alternativa viable para la producción de pigmentos con alta estabilidad y calidad (Wessel et al., 2014).

Entre los principales pigmentos naturales obtenidos a partir de hongos se encuentran:

- Riboflavina: vitamina de color amarillo soluble en agua, producida por el hongo filamentoso *Ashbya gossypii*. Se utiliza en la formulación de alimentos para bebés, cereales, pastas, salsas, quesos procesados, entre otros productos.
- Betacaroteno: Pigmento de tonalidad naranja-amarilla, extraído del hongo filamentoso *Blakeslea trispora*, ampliamente empleado como colorante en la industria alimentaria, con propiedades antioxidantes.
- Carotenoides: Grupo de pigmentos que varían en color desde amarillo hasta rojo – anaranjado, presentes en levaduras oleaginosas como *Rhodotorula spp*, entre otras levaduras pigmentadas.

#### **1.4.5 Industria cosmética**

Los hongos marinos han captado la atención de la industria cosmética debido a su producción de compuestos bioactivos, en particular antioxidantes que ayudan a prevenir el daño celular causado por radicales libres y el estrés oxidativo (Li et al., 2014). Se ha identificado que especies del género *Rhodotorula*, *Phaffia* y *Xanthophyllomyces* producen carotenoides, los cuales tienen la capacidad antiinflamatoria y antioxidante que protegen contra la luz solar (Srilekha & Gudikandula, 2023).

#### **1.4.6 Producción de enzimas para biorremediación**

El potencial de los hongos como fuente de enzimas ha sido ampliamente estudiado, ya que estos organismos poseen una gran capacidad para degradar materia orgánica y diversidad en la producción de proteínas catalizadoras (Masis-Ramos et al., 2021). Se ha reportado que especies como *Pichia fermentans*, *Rhodotorula minuta*, *Cryptococcus dimennae*, *Yarrowia lipolytica*, *Candida glabrosa*, producen enzimas con características fisiológicas particulares, como tolerancia a alta salinidad, termoestabilidad, resistencia a diferentes presiones y actividad en bajas temperaturas (Bonugli et al., 2015). Estas características hacen que sean de gran interés en aplicaciones industriales, especialmente en la biorremediación de ambientes contaminados.

#### **1.5. Medios de cultivos**

Para optimizar la utilización de fuentes alternativas con alto potencial biotecnológico, es fundamental que el sustrato de cultivo y la cepa sean compatibles (Masis-Ramos et al., 2021). Algunas levaduras de uso común, como *Saccharomyces cerevisiae*, pueden reproducirse eficientemente en medios con salinidad moderada; sin embargo, su crecimiento se ve inhibido cuando las concentraciones de cloruro de sodio superan 2,5% p/v (Warwas et al., 2023). En contraste, las cepas marinas han desarrollado mecanismos adaptativos que les permiten tolerar condiciones salinas y producir compuestos valiosos, como carotenoides lípidos, enzimas y polisacáridos (Poontawee et al., 2023).

Estas levaduras marinas pueden acumular grandes cantidades de lípidos cuando se cultivan en medios con alto contenido de carbono, como el glicerol crudo, un subproducto del proceso de producción de biodiesel (Polburee et al., 2015). Sin embargo, la composición química del glicerol crudo varía en función del tipo de catalizador utilizado en la saponificación, la eficiencia del intercambio de esteres y la presencia de impurezas, tales como jabones, lípidos, metanol, agua, metales y sales, lo que incrementa los costos de procesamiento (Murakawa et al., 2022).

Las sales de cloruro presentes en el glicerol crudo derivado del biodiesel pueden afectar la producción de dihidroxiacetona (DHA), también conocida como glicerina. La contaminación por sales impacta directamente en el proceso de oxidación del glicerol, dificultando su conversión en biocombustibles o productos químicos de interés (Jittjang et al., 2019). Por otra parte, los catalizadores de metanólisis, los ácidos grasos libres y la materia orgánica contenida en el glicerol crudo inhiben el crecimiento de la mayoría de los microorganismos, por lo que se recomienda utilizar glicerol purificado en la producción microbiana de compuestos de interés (Murakawa et al., 2022).

Otra alternativa para el cultivo de levaduras es el uso de medios comerciales diseñados específicamente para el crecimiento de hongos y levaduras. Entre ellos, el agar Dextrosa Sabouraud, es el medio que se

utiliza para el cultivo de diversas especies fúngicas. No obstante, el uso de medios comerciales presenta desventajas, como su elevado costo y la variabilidad en su composición, lo que puede afectar tanto el crecimiento de los microorganismos como la calidad del producto final.

Ante estas limitaciones, la investigación biotecnológica ha avanzado en el desarrollo de nuevas estrategias para el cultivo de hongos marinos, lo que abre la posibilidad de emplear cepas provenientes de ecosistemas marinos aun poco explotados. Estas innovaciones no solo permiten optimizar los procesos de producción, sino que también favorecen la generación de aplicaciones biotecnológicas más sostenibles y eficientes (Hasan et al., 2015).

## **2. Problema de investigación**

Hasta el momento, los estudios genéticos relacionados con las relaciones entre los cuerpos de agua y los hongos, han recibido poca atención, lo que ha limitado la comprensión de su adaptación y características de su metabolismo en distintos ambientes (Blomberg & Adler, 1992). Esta falta de información representa un obstáculo para el aprovechamiento biotecnológico de estos microorganismos en diversas industrias.

En particular, la industria alimentaria enfrenta la creciente demanda de materias primas para la producción de compuestos de alto valor nutricional. Aunque los ingredientes de origen vegetal han reemplazado progresivamente estos requerimientos, su alto costo y la variabilidad en su elaboración dificulta su implantación a gran escala. Ante esta problemática, la investigación y el desarrollo de nuevas tecnologías son fundamentales para garantizar fuentes alternativas que sean sostenibles, rentables y de alta calidad.

En este contexto, los hongos marinos han sido estudiados como una opción prometedora debido a su capacidad para sintetizar compuestos bioactivos de interés industrial, como los carotenoides. Alternativamente la exploración de levaduras provenientes de hábitats dulceacuícolas ha sido poco estudiada, por lo que se desconoce su potencial para su adaptación a distintos ambientes, incluido los bioprocesos que permiten la obtención de sustancias de interés comercial. Al respecto, conocer su respuesta adaptativa a distintas salinidades, es un paso clave, no solo para dilucidar los mecanismos fisiológicos, bioquímicos y moleculares involucrados, sino que también para su uso en bioprocesos que contengan algún grado de salinidad mayor al del agua dulce.

### **3. Hipótesis**

Preámbulo: Actualmente hay pocos estudios sobre la adaptación de los fungoides de agua dulce al incremento de la salinidad del medio, que les permite, por ejemplo, habitar en ambientes estuarinos del océano costero o ser usados en bioprocesos que contengan concentraciones crecientes de sal como producto del mismo proceso o contaminantes de los sustratos de bajo costo que se utilizan para este fin. Por lo tanto, se puede plantear la siguiente hipótesis:

*“Los fungoides provenientes de agua dulce, poseen la capacidad facultativa de tolerar el equivalente a un medio estuarino de al menos 15 PSU de salinidad “*

### **4. Objetivo general:**

Determinar la capacidad de tolerancia al sodio de fungoides pigmentados aislados de agua dulce y su potencial crecimiento celular en glicerol p.a.

#### **4.1. Objetivos específicos:**

1. Caracterizar cepas de fungoides aisladas de agua dulce mediante su contenido de carotenoides cultivados en medio comercial Sabouraud.
2. Determinar el crecimiento celular y concentración de carotenoides de fungoides aislados de agua dulce en un gradiente de salinidad desde 0 a 30 PSU.
3. Determinar el crecimiento celular y concentración de carotenoides de fungoides aislados de agua dulce cultivados en glicerol p.a.

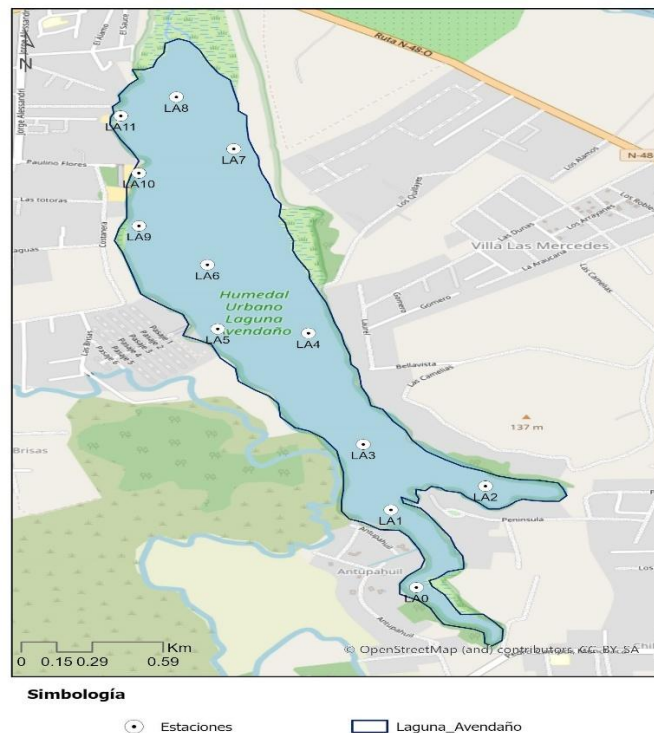
## 5. Materiales y métodos

### 5.1 Objetivo 1: Caracterizar cepas de fungoides aisladas de agua dulce mediante su contenido de carotenoides cultivados en medio comercial.

#### 5.1.1 Medición de parámetros fisicoquímicos.

Se realizaron muestreos estacionales desde el invierno 2023 a invierno 2024 y se midieron parámetros fisicoquímicos de salinidad, pH y temperatura con la sonda de multiparámetro YSI (Professional Series D-I-G-I-T-A-L YSI a xylem Brand 23J106700), en doce estaciones de muestreo del Humedal Urbano Laguna Avendaño de Quillón (Región de Ñuble, Chile) (Fig. 1).

Además, se determinó la concentración de nutrientes: nitrato, nitrito y fosfato, empleando el uso de Checker HC de Nitrato marino de rango bajo – HI781, el cual utiliza el método colorimétrico, el Checker de Nitrito marino rango bajo – HI764, que determina la concentración de nutriente a través del método de EPA (agencia de protección ambiental) diazotización. También se requirió del Checker HC para fosfato marino de rango ultra bajo – HI774. Este trabaja en la adaptación de los métodos estándar para el examen de aguas residuales, 20ª edición, método ácido ascórbico. La medición de estos Checkers se realiza a través del fotómetro que mide a una longitud de onda específica, lo que permite cuantificar la concentración de los nutrientes.



**Figura 1.** Mapa de muestreo del Humedal Urbano Laguna Avendaño de Quillón (Región de Ñuble, Chile)

### **5.1.2 Toma de muestras y aislación de cepas.**

Se recolectaron muestras de agua superficial en tubos falcón de 50 ML. Para el aislamiento selectivo de fungoides marinos, se aplicó el método de Gaertner (1966), el cual utiliza polen de pino como cebo. A las muestras se le añadieron 200  $\mu$ L de penicilina-estreptomicina, mezcla de antibiótico para prevenir contaminación bacteriana. Dado que el agua del Humedal contenía naturalmente polen de pino, no fue necesario añadirlo en la primera etapa del proceso de aislación.

Las muestras fueron incubadas durante 7 días a temperatura ambiente y en ausencia de luz para evitar el crecimiento de microalgas. Transcurrido el tiempo, se verificó la adherencia de los fungoides al polen de pino mediante microscopio óptico. Posteriormente, se transfirió una gota con el cebo positivo a un nuevo medio líquido con agua dulce del Humedal filtrada con filtros de éster de celulosa mixto (Millipore 0,22  $\mu$ m) con 200  $\mu$ L de penicilina-estreptomicina y 200  $\mu$ L de polen de pino. Se repitió el proceso de incubación y el clon se traspasó a placas Petri con medio comercial Sabouraud, se almacenaron a temperatura ambiente en ausencia de luz durante 10 días, hasta obtener cepas pigmentadas.

Las placas con fungoides pigmentados, fueron sembrados y traspasados a nuevas placas Petri, hasta obtener colonias sin contaminación.

### **5.1.3 Determinación de carotenoides totales (CT).**

Obtenidas las colonias de levaduras libres de contaminación, se extrajeron 50 mg de biomasa de cepas de agua dulce. La biomasa fue pesada en tubos eppendorf de 1,5 mL en balanza analítica. A cada una de las muestras se le añadieron 1000  $\mu$ L de acetona y se homogenizó utilizando Ultra Turrax durante 1 minuto. Luego las muestras fueron incubadas a 37°C durante 10 minutos. Finalizado este proceso, fueron centrifugadas a 14.000 rpm por 10 minutos. Finalmente, el sobrenadante obtenido fue cuantificado en un espectrofotómetro a 450 nm.

Para calcular la concentración de carotenoides totales, se realizó una curva de calibración de dicromato de potasio por el método descrito por Rodher (1966), considerando 0,036% de dicromato de potasio igual a 0,0026 mg/mL de carotenoides totales a partir de una solución madre de 3,6 mg/mL. Se realizaron diluciones seriadas y se midió la absorbancia en un espectrofotómetro a 450 nm.

### **5.2 Objetivo 2: Determinar el crecimiento y concentración de carotenoides de fungoides aislados de agua dulce en un gradiente de salinidad desde 0 a 30 PSU.**

Para realizar el objetivo 2, se seleccionaron dos cepas por su concentración de carotenoides totales aisladas en el objetivo 1. Estas fueron transferidas desde placas Petri a medio líquido y expuestas a un gradiente de salinidad de 0 a 30 PSU.

### **5.2.1 Toma de muestra para preparación de diluciones salinas**

Se recolectaron 6 muestras de agua desde la orilla de la playa desde la localidad de Ramuntcho en la península de Hualpén (Biobío- Chile), utilizando botellas de 1L previamente esterilizadas en autoclave a 120°C por 15 minutos. Las muestras fueron filtradas con filtros de membrana de ésteres de celulosa mixto (Millipore 0,22 µm). Posterior al proceso, se esterilizó en autoclave el agua de mar y se guardó en un refrigerador a 4°C.

### **5.2.2 Preparación de diluciones salinas y medios de cultivos.**

Se prepararon soluciones con agua destilada y agua de mar filtrada, ajustando las concentraciones de salinidad de 0, 5, 10, 15, 20, 25 y 30 PSU con la sonda de multiparámetro YSI. A las botellas con las diluciones correspondientes se les añadieron medios comerciales, formulados con 7 gr de medio Peptona y 21 gr de medio Dextrosa, ajustados a pH 7. Posteriormente, los medios fueron esterilizados en autoclave y almacenados a 4°C.

### **5.2.3 Preparación de inóculo de cepa seleccionada aislada de agua dulce.**

Se traspasaron 10 µL de fungoides con un asa de 10 µL a matraces de 100 mL, cada uno con 25 mL de medio de cultivo control (0 PSU). Las muestras fueron incubadas en un agitador orbital, monitoreando su crecimiento celular con una cámara de Neubauer por horas. Preparado el inóculo, se traspasaron 1000 µL de inóculo de cepa cultivada en medio líquido y se traspasaron a matraces de 100 mL con 25 mL de medio de cultivo a diferentes concentraciones de salinidad preparados previamente. Se incubaron en un agitador orbital.

### **5.2.4 Determinación de carotenoides totales y cinética de crecimiento celular.**

Se determinó la concentración de carotenoides totales al final del experimento para cada concentración de salinidad. En un tubo eppendorf de 1,5 mL se añadieron 1000 µL de cada gradiente de salinidad y se centrifugaron a 14.000 rpm por 10 minutos, se descartó el sobrenadante y se pesó en pesa analítica. Posterior a esto se continuo con la determinación de carotenoides totales, metodología descrita en el objetivo 1.

También al final del experimento, se determinó la cinética de crecimiento celular por cuantificación de células en cámara de Neubauer, a partir de alícuotas de 10 µL, comenzando el conteo de células al inicio de la inoculación. Luego se realizaron los cálculos de cinética de crecimiento, utilizando la siguiente fórmula:

$$\mu_{max} (h^{-1}) = \frac{\Delta biomass}{\Delta time (h)} = \frac{(\ln x - \ln x_0)}{\Delta t} = \frac{\ln 2}{td}$$

**X: producción de biomasa en un tiempo determinado**

**X<sub>0</sub>: producción inicial de biomasa**

**t(h): tiempo de cultivo**

### **5.2.5 Medición de actividad enzimática de malato deshidrogenasa (MDH)**

Al término del experimento se determinó la actividad enzimática de las células a través del análisis de la enzima malato deshidrogenasa. Se procesó la biomasa obtenida de los cultivos líquidos. Se tomaron 1000  $\mu\text{L}$  de cada cultivo y se transfirieron a tubos eppendorf de 1,5 mL, se centrifugaron a 14.000 rpm por 10 minutos. El sobrenadante se descartó y se añadió buffer fosfato a 200 mM. Se homogenizó la muestra con Ultra turrax durante 1 minuto y se repitió el proceso de centrifugación para obtener un nuevo sobrenadante.

Para la medición de MDH, se preparó una mezcla de reacción compuesta por 20 mM de buffer fosfato y se ajustó pH a 7,4, 1,5 mM de cloruro de magnesio, 0,1 mM de NADH y 0,2 mM de oxalacetato, empleando el método modificado descrito por Childress y Somero (1979) y Vetter (1994). Realizada la mezcla, en cubetas de 1 mL se añadieron 990  $\mu\text{L}$  de mix de reacción y 10  $\mu\text{L}$  de sobrenadante.

Se midió la absorbancia en un espectrofotómetro a 540 nm.

### **5.2.6 Medición de biomasa microbiana viva (ATP)**

La determinación de biomasa microbiana viva (ATP), se realizó en dos etapas a través del método descrito por Holm-Hansen & Booth (1966). Se llevo a cabo una extracción de ATP mediante un baño de ebullición con 3 mL de buffer Tris, pH 7.7 y 1000  $\mu\text{L}$  de cultivo al inicio y al final del desafío. Se preparó la enzima FLE-250 para la medición de ATP y se determinó la concentración por medio de una curva de calibración con solución estándar de ATP.

### **5.2.7 Extracción de ADN**

La extracción de ADN se realizó utilizando el kit Promega Wizard Genomic DNA purification, siguiendo el protocolo de tejido animal. Se pesaron 100 mg de cultivo puro de cepa aisladas en placas Petri, descrito en el objetivo 1.

La concentración y pureza del ADN fueron determinados mediante un espectrofotómetro NanoDrop 2000. Para evaluar la calidad del ADN se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 2%, teñido con RedGel, aplicando un voltaje de 100 volteos durante 45 minutos.

### **5.2.8 PCR amplificación del gen 18S**

Se realizó una reacción en cadena de polimerasa para la amplificación del gen 18s, utilizando los cebadores EukA (5'-AACCTGGTTGATCCTGCCAGT-3') y EukB (5'-TGATCCTTCTGCAGGTTACCTAC-3'), diseñados para la identificación de células eucariontes.

La mezcla de reacción incluyó 2 µL Taq polimerasa 5x, 2 µL de cada cebador a una concentración de 0,5 µM y 2 µL de muestra de extracción de ADN en un volumen final de 10 µL. Las condiciones de amplificación fueron; desnaturalización inicial a 95°C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos de amplificación. Cada ciclo consistió en desnaturalización a 95°C por 30 segundos, annealing a 55°C por 30 segundos y extensión a 72°C por 150 segundos y una última amplificación a 72°C por 420 segundos. Finalmente, los productos de PCR se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%, teñido con RedGel, aplicando un voltaje de 100 volteos durante 45 minutos.

### **5.2.9 Análisis microscópico de cepas aisladas**

Se realizaron micrografías de las cepas aisladas y cultivadas en el gradiente de salinidad al finalizar el experimento de crecimiento celular, utilizando un microscopio óptico Zeiss Stemi 508 junto con una axiocam 208.

Para el análisis morfológico, se realizaron cortes de la biomasa aglomerada obtenida, los cuales fueron visualizados en el microscopio, permitiendo la obtención de imágenes detalladas de las cepas.

## **5.3 Objetivo 3: Determinar el crecimiento y concentración de carotenoides totales de fungoides aislados de agua dulce cultivados en glicerol p.a.**

Para llevar a cabo el objetivo 3, se seleccionó la cepa Q4, identificada como la mejor candidata según las características descritas en el objetivo 2. Posteriormente, la cepa fue traspasada a un medio con glicerol p.a. y se determinó su crecimiento celular y concentración de carotenoides totales (CT).

### **5.3.1 Preparación de medio glicerol p.a. 10% (v/v) a 0 PSU.**

Se preparó el medio de cultivo con glicerol p.a. 10% (v/v), 7g de peptona, 7g de extracto de levadura, 300 µL de penicilina-estreptomicina y agua destilada en una botella de 1L autoclavada. Se esterilizó en autoclave a 120°C por 15 minutos y se almaceno a 4°C.

Se preparó el inóculo de la cepa seleccionada, utilizando la metodología descrita en el objetivo 2. Se traspasaron 1000 µL del inóculo a matraces de 100 mL en duplicado con 25 mL de medio glicerol p.a. y al medio control Sabouraud. Se dejaron incubar en un agitador orbital a temperatura ambiente y se realizó conteo de células en una cámara de Neubauer hasta llegar a la fase de senescencia.

### **5.3.2 Determinación de concentración de carotenoides totales y cinética de crecimiento celular.**

Se utilizó la metodología descrita en el objetivo 2, para determinar la concentración de carotenoides totales y cinética de crecimiento celular.

### **5.3.3 Análisis estadístico.**

Se realizó un análisis estadístico de los resultados obtenidos en el objetivo 2 y 3, para cada una de las cepas seleccionadas (Q4 y Q7).

Se realizó una prueba de datos no paramétricos (prueba de Kruskal-Wallis) y correlaciones de Spearman de los resultados obtenidos de crecimiento celular (células/mL), concentración de carotenoides totales (CT), cinética de crecimiento celular, actividad enzimática (MDH) y biomasa microbiana viva (ATP). Además, se realizó una prueba de análisis Wilcoxon, prueba no paramétrica para la cepa Q4. Todos los análisis se realizaron utilizando el software estadístico DATAtab.

## 6. Resultados

### 6.1 Objetivo 1: Caracterizar cepas de fungoides aisladas de agua dulce mediante su contenido de carotenoides, cultivados en medio comercial

#### 6.1.1 Parámetros fisicoquímicos

Se obtuvieron datos durante el periodo de muestreo desde el invierno 2023 al invierno 2024 en el Humedal Urbano Laguna Avendaño (Quillón, Región de Ñuble, Chile). Los parámetros fisicoquímicos obtenidos en la laguna arrojaron un rango de salinidad entre los 0,08 y 0,06 PSU, de pH entre los 7,7 y 9,2 y la temperatura entre 9,3 y 26,2 °C. Los promedios de las mediciones de los parámetros fisicoquímicos de agua superficial de la laguna por muestreo estacional se encuentran en la tabla 1.

**Tabla 1.** Parámetros fisicoquímicos (promedios  $\pm$  desviación estándar) por estaciones del año, para el Humedal Urbano Laguna Avendaño de Quillón (Región de Ñuble, Chile) durante los muestreos de invierno 2023 a invierno 2024.

Promedio parámetros fisicoquímicos			
Muestreos	Salinidad (PSU)	pH	Temperatura °C
Invierno 2023	0,08 $\pm$ 0,01	7,7 $\pm$ 0,17	12,4 $\pm$ 0,95
Primavera 2023	0,08 $\pm$ 0,01	8,2 $\pm$ 0,22	16,5 $\pm$ 0,64
Verano 2024	nd	9,2 $\pm$ 0,15	26,2 $\pm$ 1,44
Otoño 2024	0,07 $\pm$ 0,02	7,8 $\pm$ 0,30	13,0 $\pm$ 0,86
Invierno 2024	0,06 $\pm$ 0,02	7,8 $\pm$ 0,19	9,3 $\pm$ 0,35

#### 6.1.2 Concentración de nutrientes Humedal Urbano Laguna Avendaño de Quillón.

De acuerdo con las mediciones de nutrientes obtenidos para los muestreos estacionales, se observa un rango de 2,4 a 4,6  $\mu$ M de nitrato, para nitrito fue de 0,25 a 17,86  $\mu$ M y de fosfato entre 0,03 a 2,89  $\mu$ M. Los valores más altos para todos los nutrientes se presentaron en el invierno 2024. Los promedios y las desviaciones estándar están presentes en la tabla 2.

**Tabla 2.** Nutrientes, nitrato, nitrito y fosfato (promedios  $\pm$  desviación estándar) por estaciones de muestreo, desde el periodo de invierno 2023 a invierno 2024, obtenidas del Humedal Urbano Laguna Avendaño de Quillón

<b>Promedio nutrientes Humedal Laguna Avendaño</b>			
<b>Muestréos estacionales</b>	<b>Nitrato <math>\mu\text{M}</math></b>	<b>Nitrito <math>\mu\text{M}</math></b>	<b>Fosfato <math>\mu\text{M}</math></b>
Invierno 2023	2,4 $\pm$ 1,57	0,25 $\pm$ 0,03	0,03 $\pm$ 0,03
Primavera 2023	4,01 $\pm$ 1,58	0,23 $\pm$ 0,01	0,01 $\pm$ 0,01
Verano 2024	0,07 $\pm$ 0,05	0,02 $\pm$ 0,00	0,18 $\pm$ 0,04
Otoño 2024	nd	nd	0,90 $\pm$ 0,52
Invierno 2024	4,64 $\pm$ 8,92	17,86 $\pm$ 44,40	2,89 $\pm$ 2,10

### 6.1.3 Determinación de carotenoides totales (CT)

La determinación de carotenoides totales en las 17 cepas aisladas (Tabla 3) mostró una variabilidad en su contenido. La concentración más alta se registró en la cepa Q4 (112,2 ng/mL), seguida de Q7 (104,4 ng/mL). En contraste, la cepa con menor concentración de carotenoides totales fue Q17 (68,5 ng/mL). En general, el rango de concentración de carotenoides totales de las cepas aisladas fluctuó entre 68,5 ng/mL y 112,2 ng/mL, con un promedio estimado de  $64,8 \pm 28,3$  ng/mL.

**Tabla 3.** Concentración de carotenoides totales (CT) en cepas aisladas del Humedal Urbano Laguna Avendaño de Quillón durante el invierno 2023 y el invierno 2024.

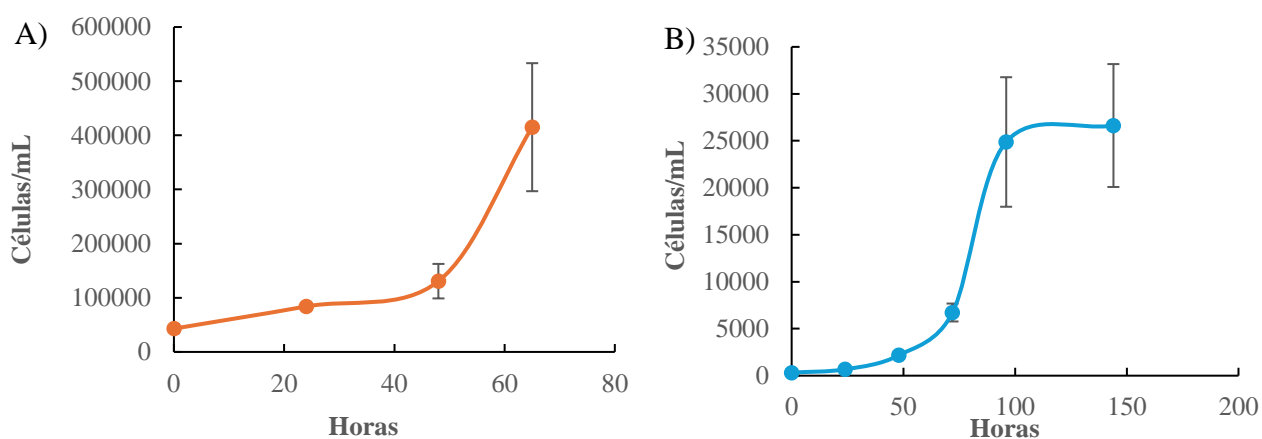
<b>Cepas</b>	<b>Carotenoides totales (ng/mL)</b>
Q1	27,9
Q2	88
Q3	90,4
Q4	112,2
Q5	94,5
Q6	30,6
Q7	104,4
Q8	48,6
Q9	60,9

Q10	53,8
Q11	56,4
Q12	69,6
Q13	50,2
Q14	68,5
Q15	79,5
Q16	59,4
Q17	6,04

**6.2 Objetivo 2: Determinar el crecimiento y producción de carotenoides de fungoides aislados de agua dulce en un gradiente de salinidad desde 0 a 30 PSU.**

### 6.2.1 Preparación de inóculos cepa Q4 y Q7

Una vez identificadas las cepas con mayor concentración de carotenoides totales, se seleccionaron las cepas Q4 y Q7, de acuerdo con los resultados obtenidos en el objetivo 1 y se prepararon los inóculos para el experimento de desafío de salinidad. Las curvas de crecimiento de cada inóculo se presentan en la figura 3.



**Figura 2.** Preparación de inóculos para el experimento de desafío de salinidad. A) Curva de crecimiento celular (células/mL) de la cepa Q4 durante 65 horas hasta su fase exponencial. B) Crecimiento celular (células/mL) de la cepa Q7 durante 144 horas para preparación del inóculo hasta su fase estacionaria.

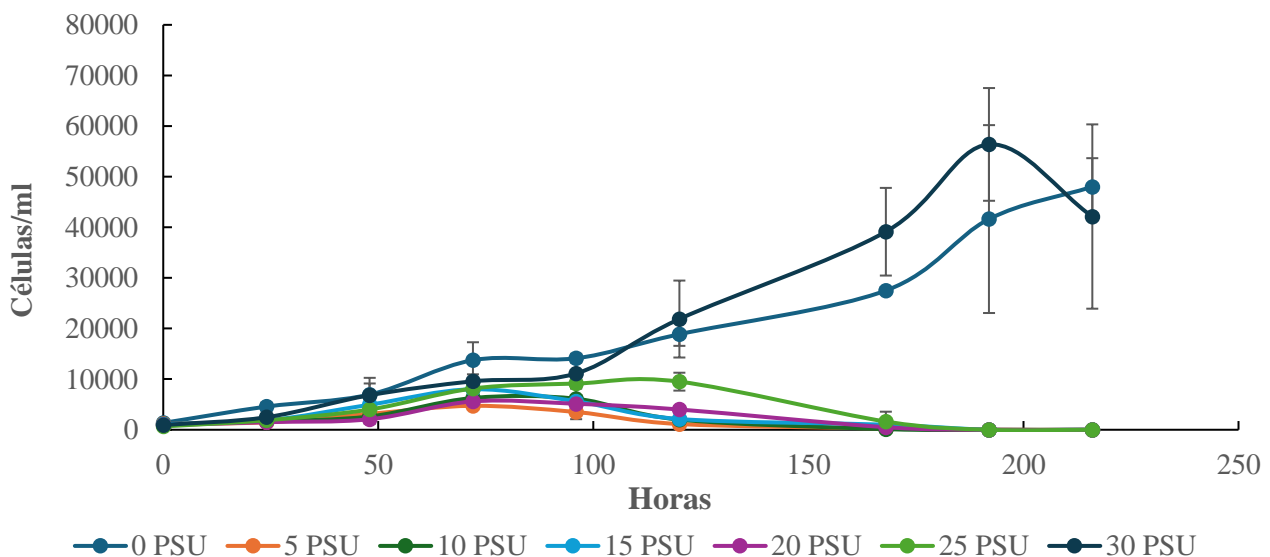
Los resultados obtenidos del crecimiento celular (células/mL) para la preparación de los inóculos, se observa que la cepa Q4 comienza su fase exponencial entre las 45 y 50 horas, alcanzado su máximo

crecimiento a las 65 horas (Fig. 2A). Caso contrario ocurre para la cepa Q7, en la cual se observa un crecimiento celular más lento, alcanzando su fase exponencial entre las 72 y 96 horas. Posterior a las 96 horas alcanza su fase estacionaria (Fig. 2B). Luego de alcanzado las fases de mayor crecimiento, estos inóculos de las cepas en medio líquido fueron transferidas al gradiente de salinidad (0, 5, 10, 15, 20, 25 y 30 PSU).

### 6.2.2 Crecimiento celular de cepas Q4 y Q7 en el experimento de desafío de salinidad.

#### Cepa Q4

A partir de los resultados obtenidos, se determinó el crecimiento celular a diferente concentración de salinidad. La evolución del crecimiento celular en función de estas condiciones se presenta en la figura 4.

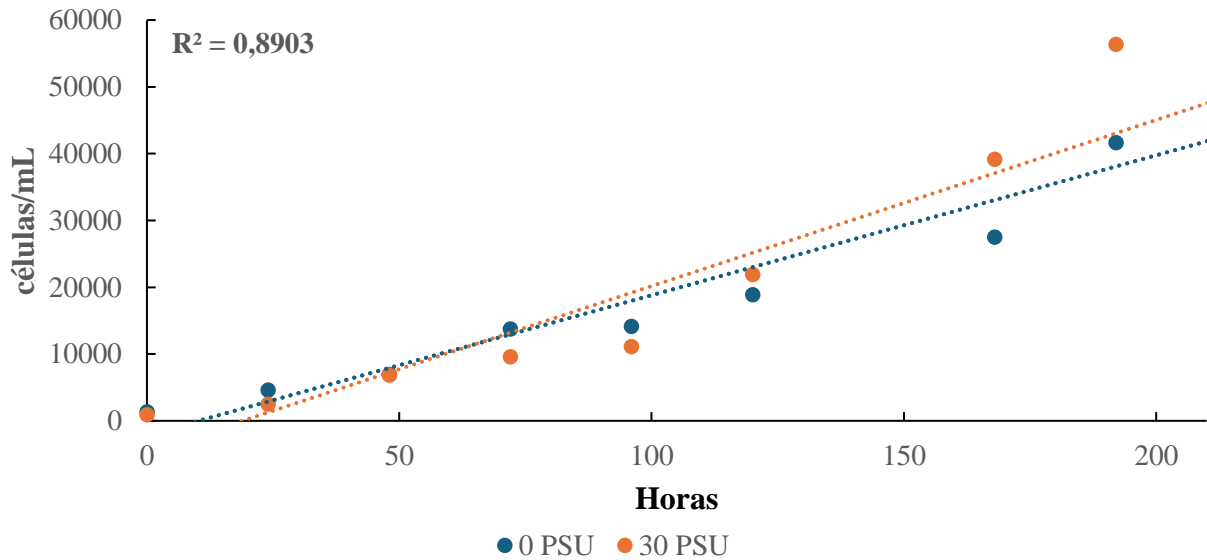


**Figura 3.** Curva de crecimiento celular de Q4 células/mL  $\pm$  desviación estándar, expuesta a un gradiente de salinidad (0, 5, 10, 15, 20, 25 y 30 PSU) durante 216 horas.

Durante las primeras 50 horas (Fig. 3), la concentración celular se mantiene en la fase de adaptación de lento crecimiento en todas las salinidades ensayadas. Posteriormente, se observa un incremento en el crecimiento celular de la cepa Q4, alcanzando los valores más altos en la fase estacionaria entre las 160 y 200 horas en las condiciones de 0 y 30 PSU.

En contraste, en las salinidades intermedias (5, 10, 15, 20, 25 PSU), la concentración celular se mantiene baja a lo largo del tiempo en comparación con el control y 30 PSU. La fase de senescencia se presenta a partir de las 100 horas en algunas condiciones intermedias de salinidad (5, 10, 15 y 20 PSU), para 25

PSU se tarde un poco más, comenzando esta fase después de las 120 horas. Sin embargo, en las condiciones de 0 y 30 PSU, esta fase comienza después de las 200 horas.

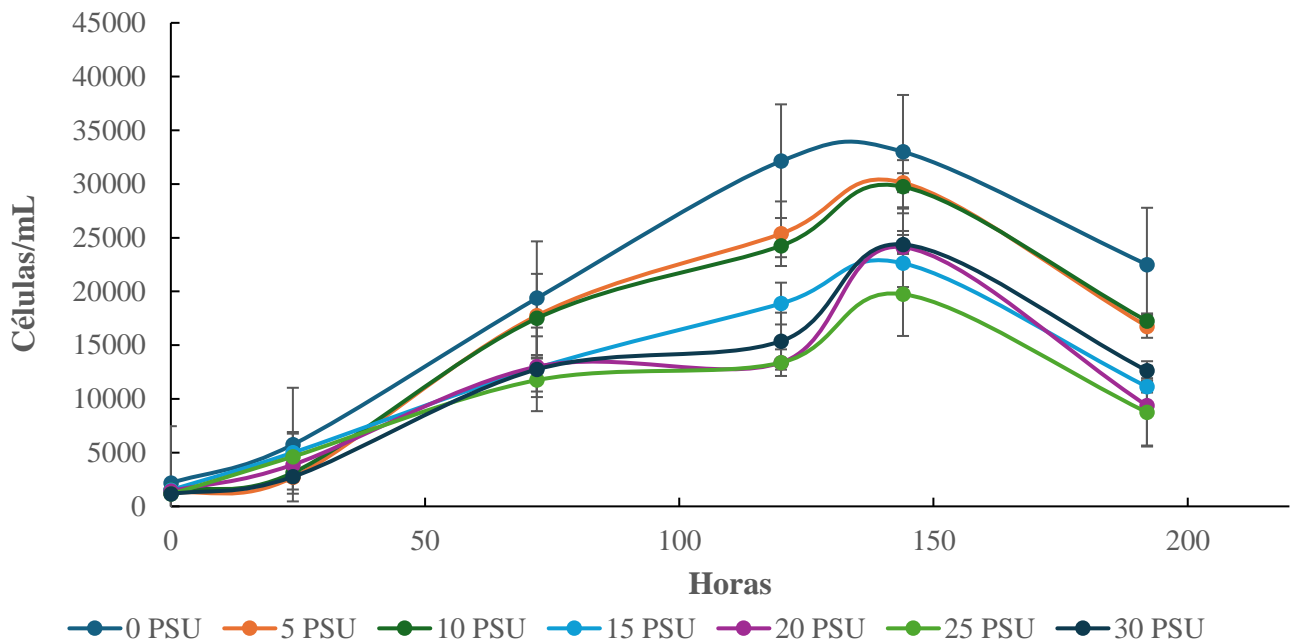


**Figura 4.** Correlación de Spearman entre el tiempo de crecimiento y la concentración celular (células/mL) en el gradiente de salinidad 0 y 30 PSU.

En la figura 4, se observa la correlación de Spearman realizada entre el crecimiento celular (células/mL) del control (0 PSU) ( $R^2= 0,9$ ;  $p< 0,001$ ) y 30 PSU ( $R^2= 0,89$ ;  $p< 0,001$ ) con el tiempo del experimento, obteniendo datos significativos.

### Cepa Q7

Preparado el inóculo de la cepa Q7 y transferido al experimento de desafío de salinidad, se obtuvo la curva de crecimiento celular (células/mL).



**Figura 5.** Curva de crecimiento celular de Q7 (células/mL  $\pm$  desviación estándar) en el gradiente de salinidad (0, 5, 10, 15, 20, 25 y 30 PSU) durante 192 horas.

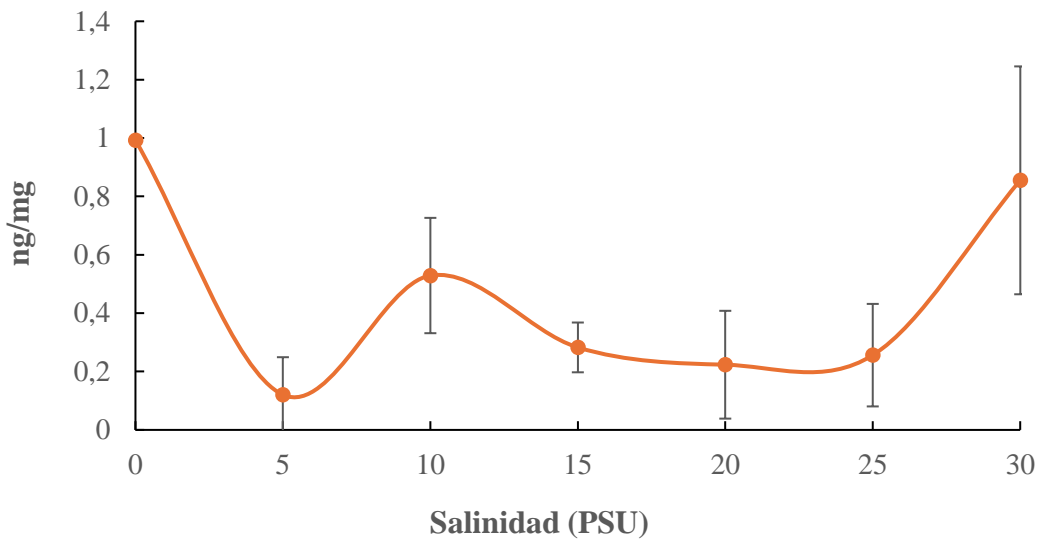
Los resultados obtenidos sobre el crecimiento celular de la cepa Q7 a lo largo del tiempo bajo condiciones de salinidad (Fig. 5). Durante las primeras 50 horas, se observa que la cepa atraviesa la fase de adaptación por su crecimiento lento ( $< 10.000$  células/mL). A partir de las 60 horas, se observa un crecimiento celular lineal en todas las salinidades, alcanzando su punto máximo a las 120 horas. Posteriormente, la cepa entra en la fase estacionaria hasta las 144 horas para todo el gradiente de salinidad. Finalmente, entre las 150 horas y 216 horas se observa el decaimiento de la curva de crecimiento, evidenciando la fase de senescencia.

### 6.2.3 Concentración de carotenoides totales (CT).

Cepa Q4 y Q7.

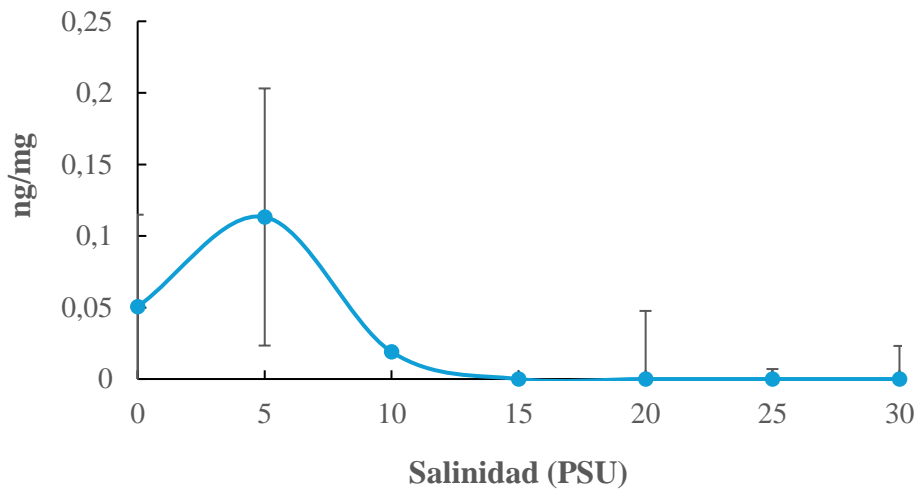
Se obtuvieron los resultados de la concentración de carotenoides totales presentes en ambas cepas (Q4 y Q7) al final del experimento del desafío de salinidad.

Q4



**Figura 6.** Concentración de carotenoides totales (CT) en ng/mg, de la cepa Q4 al final del experimento del desafío de salinidad transcurridas 216 horas.

Q7



**Figura 7.** Concentración de carotenoides totales (CT) en ng/mg, para la cepa Q7 al final del experimento del desafío de salinidad, luego de 196 horas.

La concentración de carotenoides totales en la cepa Q4 se determinó en peso húmedo de la célula bajo distintas salinidades (Fig. 6). Los valores más altos de concentración se obtuvieron del control (0 PSU;  $0,99 \pm 0,01$  ng/mg) y 30 PSU ( $0,86 \pm 0,39$  ng/mg). En las salinidades intermedias se obtuvo una concentración de carotenoides totales entre  $0,12 \pm 0,13$  ng/mg (5 PSU) siendo la más baja y la más alta de  $0,53 \pm 0,20$  ng/mg (10 PSU), el resto de las salinidades oscilaron entre  $0,28 \pm 0,09$  ng/mg y  $0,26 \pm 0,18$  ng/mg. No así para la cepa Q7, en la cual el contenido de carotenoides totales (Fig. 7) disminuyó en

las salinidades intermedias (15, 20, 25 y 30 PSU), obteniendo mayor concentración de CT en 5 PSU ( $0,11 \pm 0,09$  ng/mg), seguido del control (0 PSU;  $0,05 \pm 0,06$  ng/mg) y 10 PSU ( $0,019 \pm 0,001$  ng/mg). Para comparar el contenido CT entre ambas cepas, se realizó un análisis estadístico, cuyos resultados indicaron que la concentración de carotenoides totales en la cepa Q4 es significativamente mayor que la cepa Q7 ( $p = 0,014$ ;  $p < 0,05$ ).

#### 6.2.4 Medición de malato deshidrogenasa (MDH), biomasa microbiana (ATP) y cinética de crecimiento.

Se realizaron mediciones de actividad enzimática (MDH) a diferentes concentraciones de salinidad. Los resultados se observan en las Tablas 4 y 5 para las cepas Q4 y Q7, respectivamente.

**Tabla 4.** Promedio  $\pm$  desviación estándar de actividad enzimática de malato deshidrogenasa (MDH) al final del experimento de salinidad y cinética de crecimiento de la cepa Q4.

Q4	MDH	Cinética de crecimiento
Salinidad PSU	$\mu\text{mol min}^{-1} \text{ g ww}^{-1}$	$\mu \text{ máx.}(\text{h}^{-1})$
0	0,371	215,97
5	2,438	49,65
10	1,017	54,43
15	0,397	96,18
20	0,874	65,28
25	1,526	52,68
30	1,081	288,8

La tabla 4, muestra la actividad enzimática de la malato deshidrogenasa (MDH) y la cinética de crecimiento de la cepa Q4. Se puede observar que la actividad enzimática varía entre salinidades, el valor más alto se registró a 5 PSU ( $2,438 \mu\text{mol min}^{-1} \text{ g ww}^{-1}$ ) en comparación con el control 0 PSU, resultado más bajo registrado ( $0,371 \mu\text{mol min}^{-1} \text{ g ww}^{-1}$ ), en salinidades intermedias (10, 15 y 20 PSU) la MDH disminuyó y luego mostró un incremento en las salinidades de 25 y 30 PSU ( $1,526$  y  $1,081 \mu\text{mol min}^{-1} \text{ g ww}^{-1}$ , respectivamente). Con respecto a la cinética de crecimiento celular tiene relación con la concentración celular (células/mL) y los resultados más altos se obtuvieron en el control y 30 PSU

(215,97  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{ g ww}^{-1}$  y 288,8  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{ g ww}^{-1}$ , respectivamente). Los datos no correlacionan significativamente para esta cepa a diferencia de Q7.

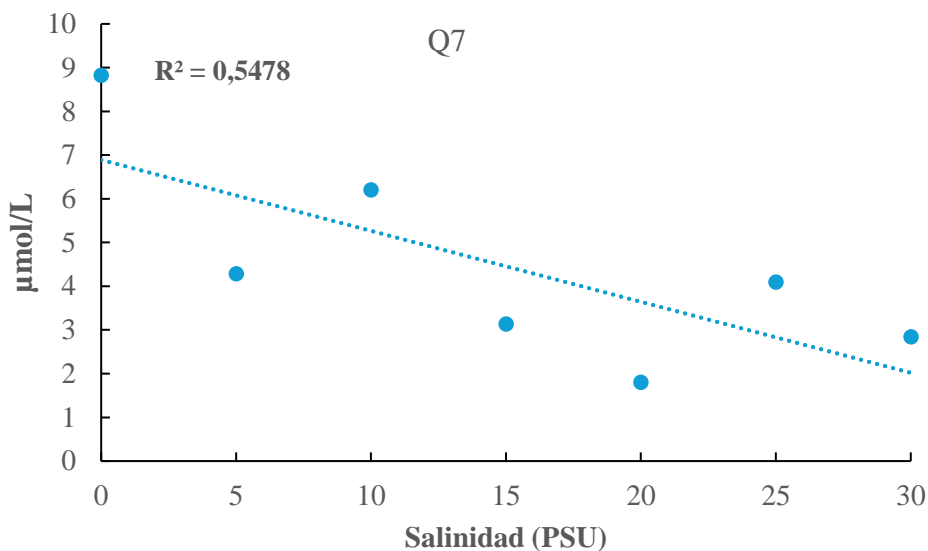
**Tabla 5.** Promedio  $\pm$  desviación estándar de actividad enzimática de malato deshidrogenasa (MDH) al final del experimento de salinidad y biomasa microbiana viva (ATP) en etapa inicial y final del desafío de la cepa Q7 y cinética de crecimiento celular.

Q7	MDH	ATP		Cinética de crecimiento
		Inicial $\mu\text{mol/L}$	Final $\mu\text{mol/L}$	$\mu\text{máx.}(\text{h}^{-1})$
Salinidad PSU	$\mu\text{mol min}^{-1} \text{ g ww}^{-1}$			
0	$2,04 \pm 1,31$	$23,957 \pm 31,491$	$8,822 \pm 1,500$	214,06
5	$1,304 \pm 0,94$	$3,270 \pm 0,128$	$4,285 \pm 3,256$	200,69
10	$2,830 \pm 2,92$	$3,202 \pm 1,149$	$6,204 \pm 7,693$	195,83
15	$0,596 \pm 0,39$	$5,222 \pm 0,335$	$3,134 \pm 3,352$	146,53
20	$0,827 \pm 0,09$	$4,455 \pm 0,271$	$1,802 \pm 0,447$	157,64
25	$0,647 \pm 0,16$	$5,854 \pm 1,101$	$4,093 \pm 1,325$	129,17
30	$0,782 \pm 0,09$	$4,737 \pm 0,798$	$2,841 \pm 0,064$	161,28

Para el caso de la cepa Q7, los datos obtenidos para la actividad enzimática (Tabla 5) muestran que a mayor concentración de salinidad (15, 20, 25 y 30 PSU) los valores son más bajos en comparación a lo que se observa en las salinidades de 0 PSU ( $2,04 \pm 1,31 \mu\text{mol min}^{-1} \text{ g ww}^{-1}$ ), 5 PSU ( $1,304 \pm 0,94 \mu\text{mol min}^{-1} \text{ g ww}^{-1}$ ) y 10 PSU ( $2,830 \pm 2,92 \mu\text{mol min}^{-1} \text{ g ww}^{-1}$ ) los cuales son más altos.

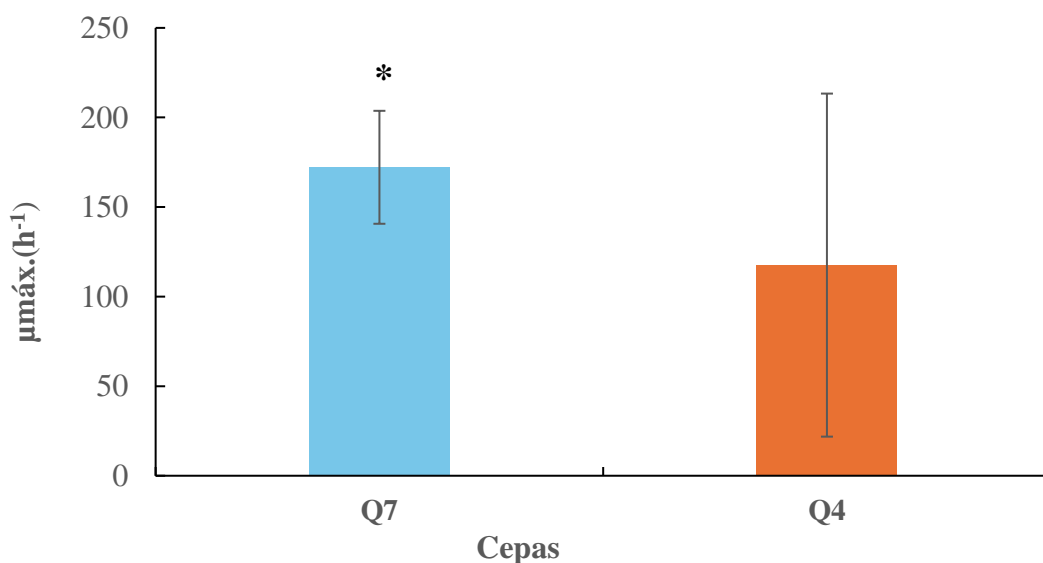
Los resultados obtenidos del contenido de biomasa microbiana viva (ATP), indica que a 0 PSU se observa disminución de ATP en el experimento de salinidad (inicial  $23,957 \pm 31,491 \mu\text{mol/L}$ , final  $8,822 \pm 1,500 \mu\text{mol/L}$ ). En cambio, para las concentraciones de 5 PSU (inicial  $3,270 \pm 0,128 \mu\text{mol/L}$ , final  $4,285 \pm 3,256 \mu\text{mol/L}$ ) y 10 PSU (inicial  $3,202 \pm 1,149 \mu\text{mol/L}$ , final  $6,204 \pm 7,693 \mu\text{mol/L}$ ) se observa el efecto contrario. Mientras que en las salinidades altas (15, 20, 25 y 30 PSU) disminuye.

Finalmente, para los resultados obtenidos de cinética de crecimiento, se obtuvieron valores similares en todas las salinidades oscilando entre  $214,06 \mu \text{máx.}(\text{h}^{-1})$  (Control 0 PSU) y  $129,17 \mu \text{máx.}(\text{h}^{-1})$  (25 PSU).



**Figura 8.** Correlación de Spearman de la biomasa microbiana viva (ATP) al final del experimento de desafío de salinidad de la cepa Q7 y el gradiente de salinidad (PSU)

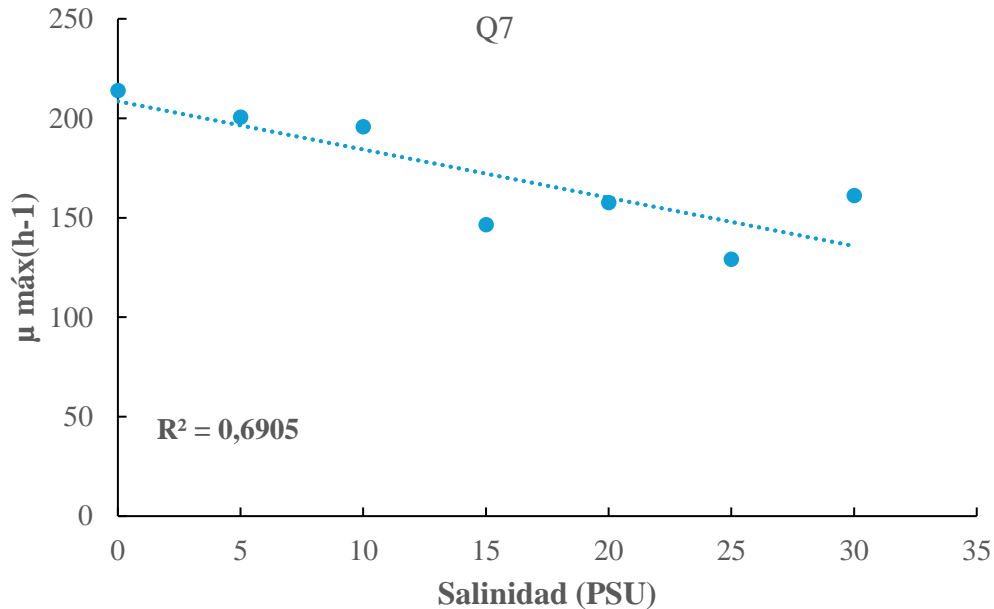
Los datos obtenidos de la correlación de Spearman de la biomasa microbiana viva (ATP) al final del experimento y el gradiente de salinidad, se obtuvieron resultados significativos ( $p < 0,05$ ) (Fig. 8)



**Figura 9.** Comparación de los promedios de cinética de crecimiento celular ( $\mu$  máx. ( $\text{h}^{-1}$ )) del gradiente de salinidad (0,5,10,15,20 y 25 PSU) entre las cepas Q4 y Q7 al final del experimento del desafío de salinidad.

En la figura 9 se observa la comparación entre ambos promedios de cinéticas de crecimiento celular de las cepas aisladas (Q4 y Q7). En todas las salinidades (0 a 30 PSU) no existe correlación significativa.

entre ambas cepas. No obstante, al realizar el análisis sin la salinidad de 30 PSU, se obtiene una correlación positiva ( $p < 0,05$ ), por lo que se asume que Q7 tiene mayor cinética de crecimiento celular ( $\mu \text{ máx.}(\text{h}^{-1})$ ) que Q4.



**Figura 10.** Regresión lineal entre la cinética de crecimiento ( $\mu \text{ máx.}(\text{h}^{-1})$ ) y la salinidad (PSU) de la cepa Q7.

Para Q7 los datos cinética de crecimiento celular ( $\mu \text{ máx.}(\text{h}^{-1})$ ) se ajustan a un modelo de regresión lineal significativo con respecto a las salinidades ensayadas ( $p < 0,05$ ) (Fig.10)

### 6.2.5 Identificación del microorganismo

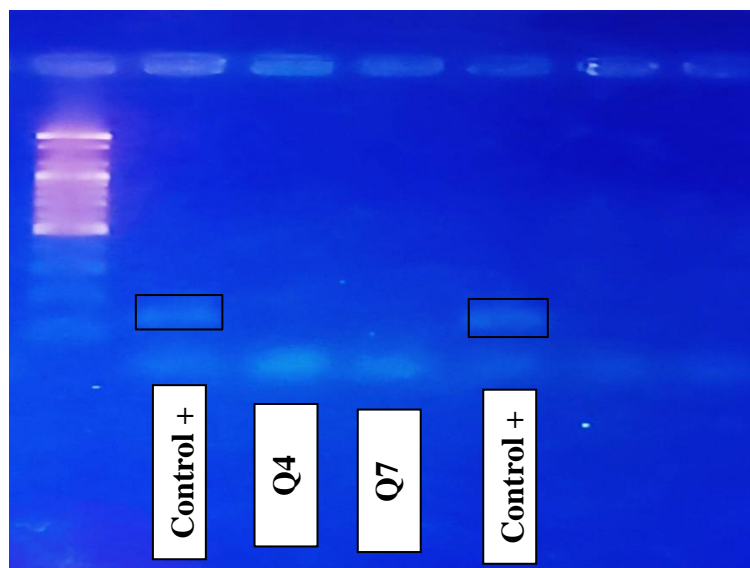
Se obtuvieron concentraciones ( $\text{ng}/\mu\text{L}$ ) elevadas de ADN y sin contaminación de las cepas Q4, Q7 y del control positivo (perro) (Tabla 6).

**Tabla 6.** Concentración y pureza de ADN extraídos desde Q4 y Q7, tejido control.

<b>Extracción de ADN</b>	<b>Concentración (ng/μL)</b>	<b>260/280</b>	<b>260/230</b>
Q4	72,3	1,8	0,64
Q7	502,1	1,83	1,21
Control (Perro)	28,09	1,87	0,66

### 6.2.5.1 Reacción en cadena de polimerasa (PCR)

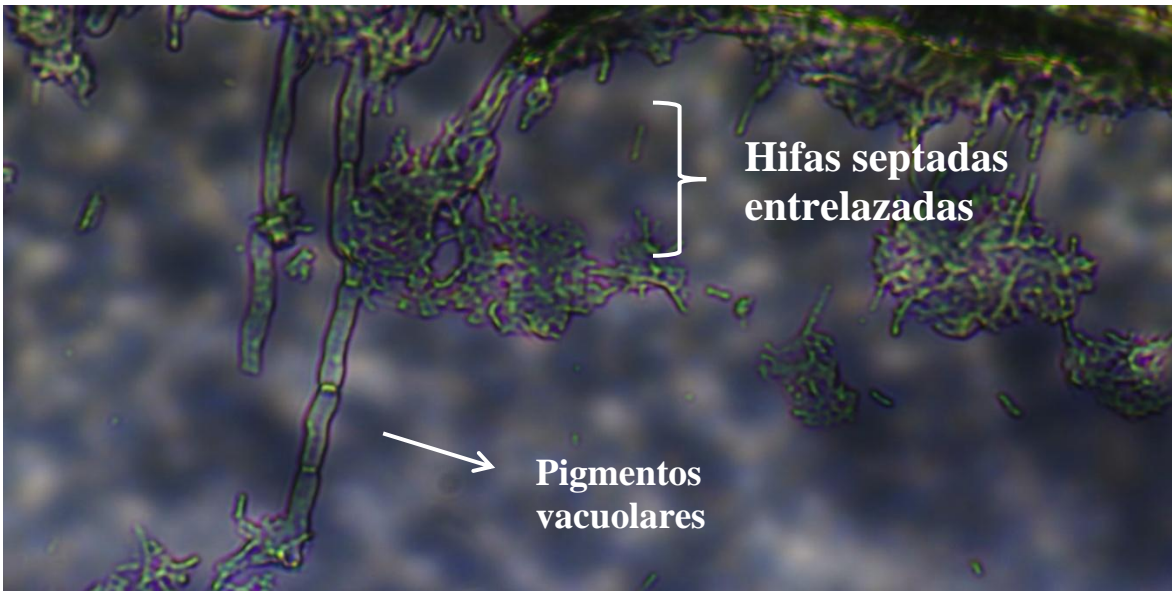
En la figura 11, se presenta el análisis de electroforesis de los productos de PCR utilizado para evaluar la amplificación de las muestras. De izquierda a derecha, se observa el marcador de peso molecular tipo 100 pares de bases (pb), seguido del control positivo (perro) que muestra una banda correspondiente a 1700 pb. Continuando con las muestras de las cepas Q4 y Q7, de las cuales no se evidencian amplificación. Finalmente, se muestra la amplificación del control positivo.



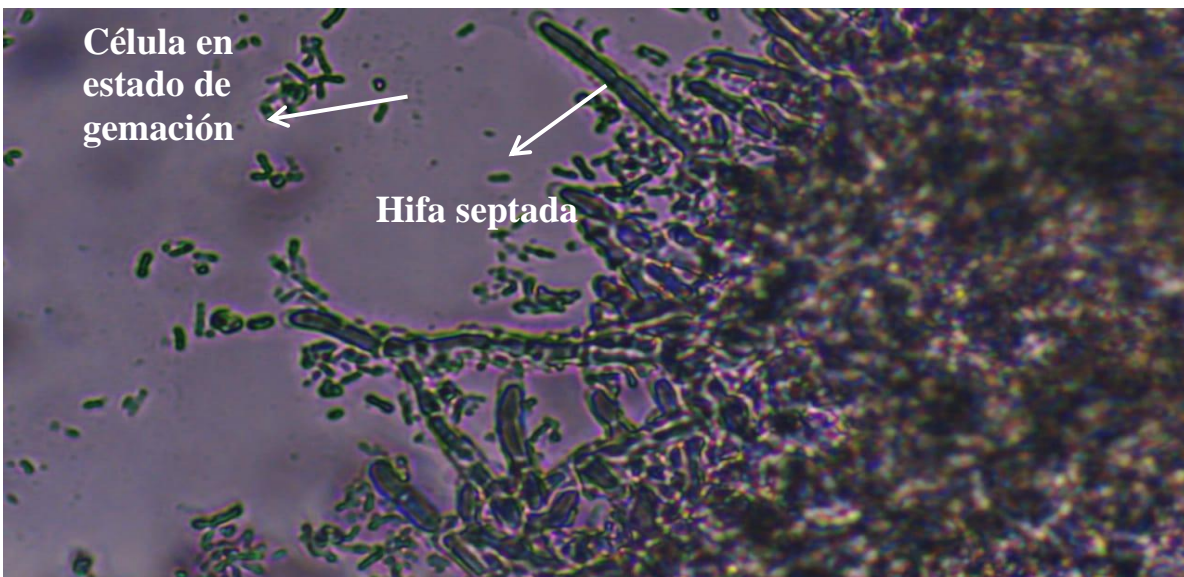
**Figura 11.** Electroforesis de producto de PCR 18S para control positivo de extracción de ADN animal (perro) y extracción de ADN de las cepas seleccionadas Q4 y Q7.

### 6.2.5.2 Morfología de las cepas

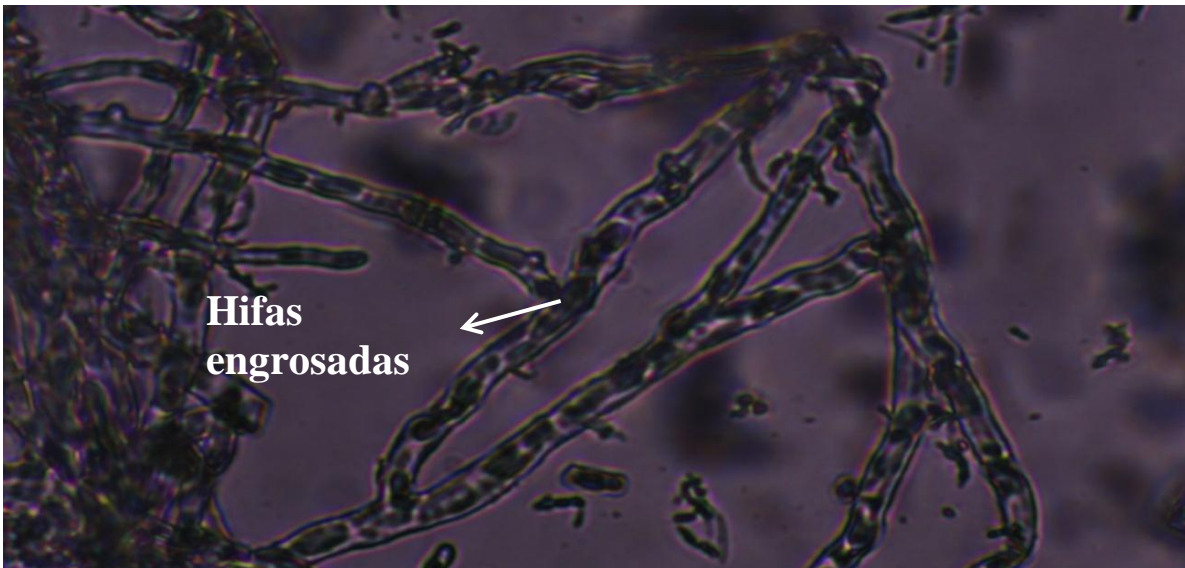
Se tomaron micrografías de las cepas Q4 y Q7 al término del crecimiento celular en un microscopio óptico para obtener imágenes detalladas de la morfología (Figura 12 a la 19).



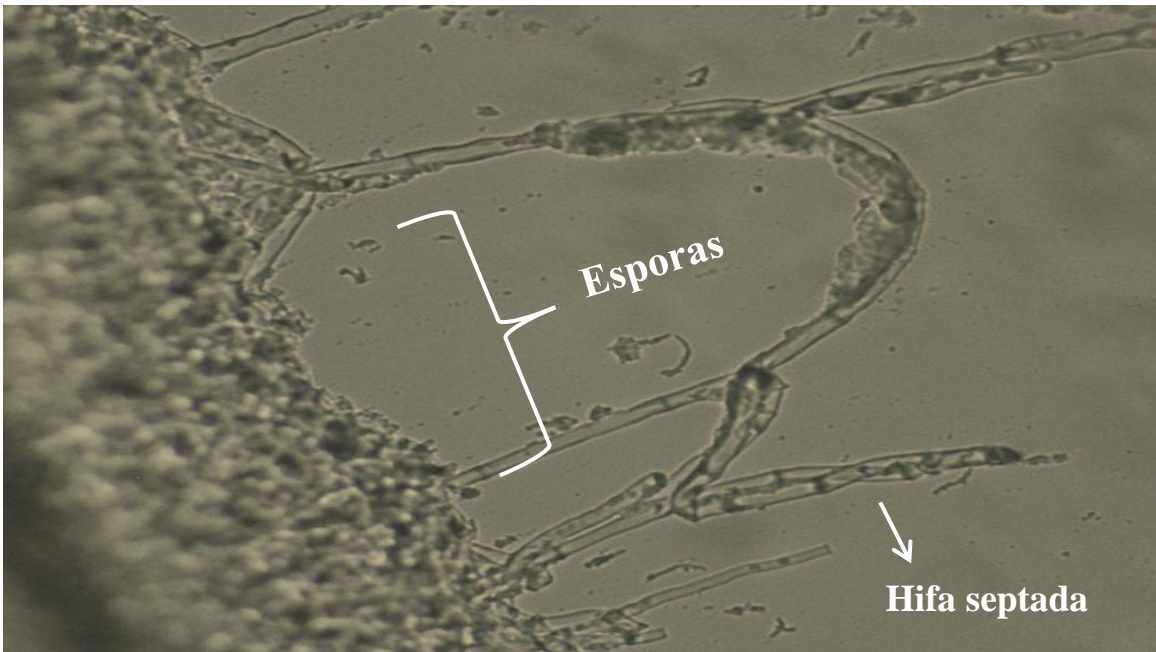
**Figura 12.** Imagen microscópica, tomada en un microscopio óptico con el objetivo 40x de la cepa Q4 del control (0 PSU) al término del desafío de gradiente de salinidad.



**Figura 13.** Imagen microscópica, tomada en un microscopio óptico con el objetivo 40x de la cepa Q4 a 15 PSU al término del desafío de gradiente de salinidad.



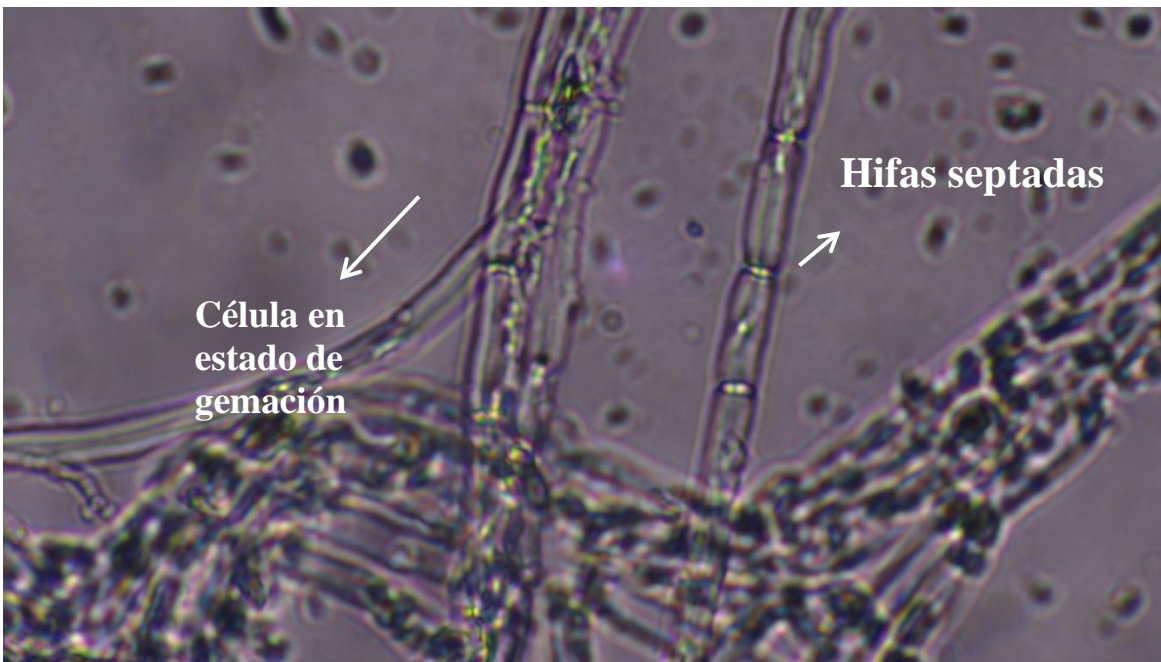
**Figura 14.** Imagen microscópica, tomada en un microscopio óptico con el objetivo 40x de la cepa Q4 a 30 PSU al término del desafío de gradiente de salinidad.



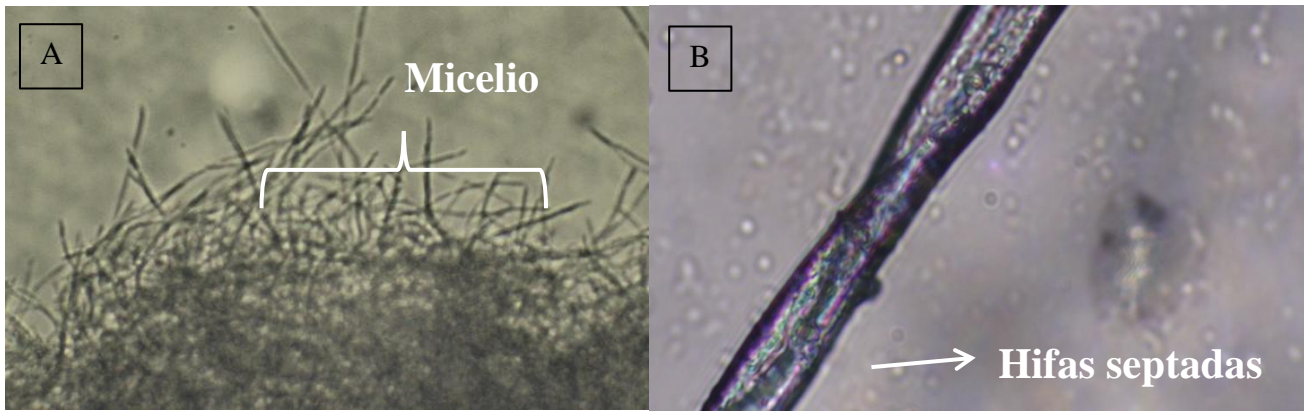
**Figura 15.** Imagen microscópica, tomada en un microscopio óptico con el objetivo 40x de la cepa Q7 del control (0 PSU) al término del desafío de gradiente de salinidad.



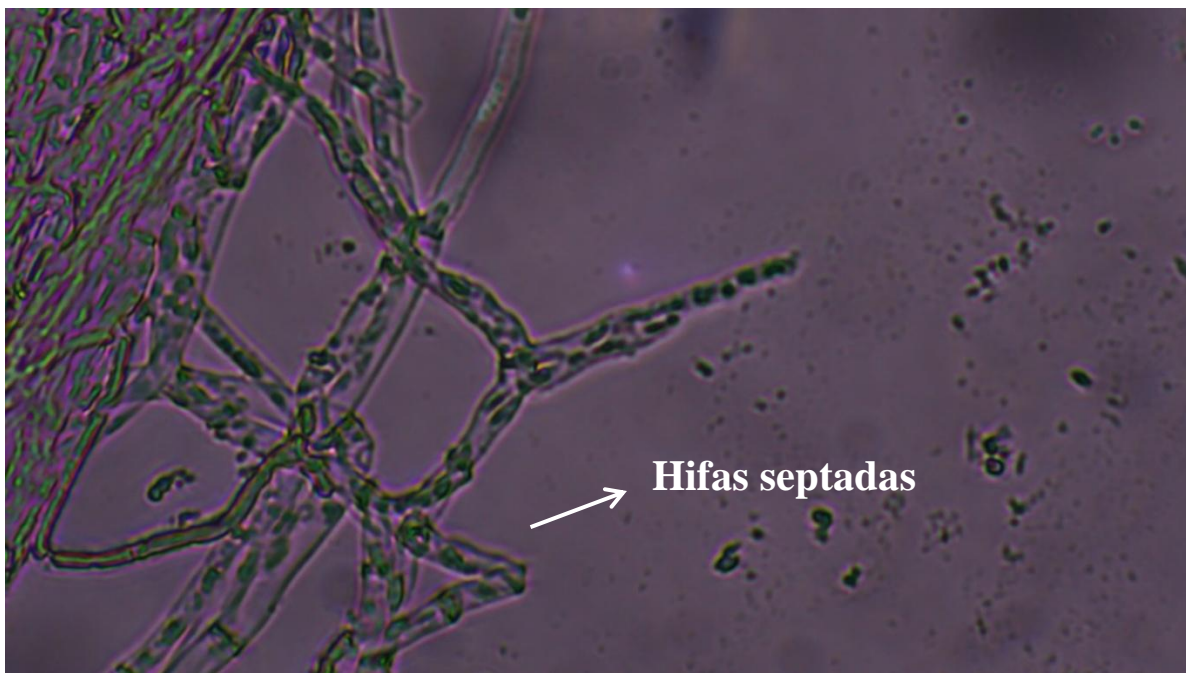
**Figura 16.** Imagen microscópica, tomada en un microscopio óptico con el objetivo 40x de la cepa Q7 a 5 PSU al término de desafío de gradiente de salinidad.



**Figura 17.** Imagen microscópica, tomada en un microscopio óptico con el objetivo 40x de la cepa Q7 a 10 PSU al término del desafío de gradiente de salinidad.



**Figura 18. Imagen de morfología de cepa Q7.** A). Imagen microscópica, tomada en un microscopio óptico con el objetivo 10x de la cepa Q7 a 15 PSU al término del desafío de salinidad. B) Imagen microscópica, tomada en un microscopio óptico con el objetivo 40x de la cepa Q7 a 15 PSU al término de desafío de salinidad.



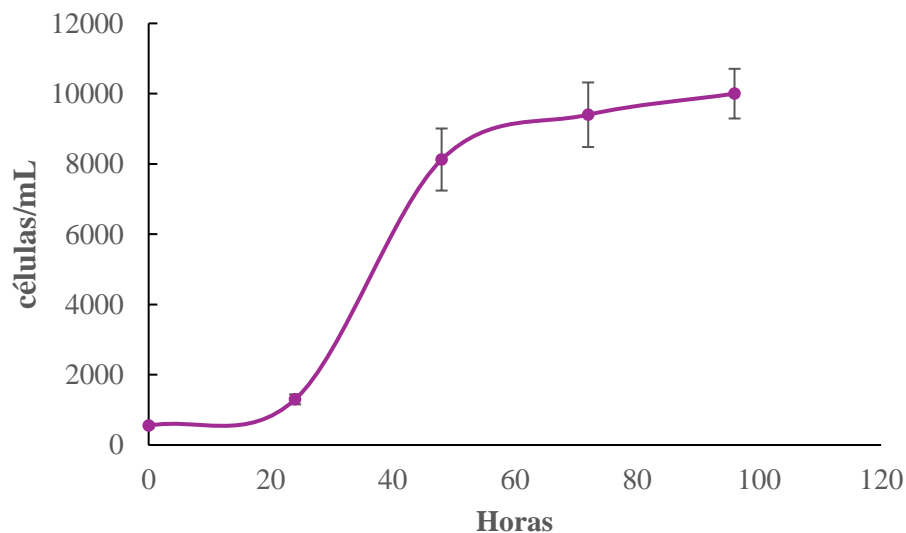
**Figura 19.** Imagen microscópica, tomada en un microscopio óptico con el objetivo 40x de la cepa Q7 a 30 PSU al término de desafío de salinidad.

En las imágenes obtenidas a través del microscopio óptico de las cepas Q4 y Q7, se pueden observar la morfología de las cepas, evidenciando como en ambos controles (Fig. 12, Fig. 15, respectivamente) se ven hifas septadas definidas. Para la cepa Q4 se observa en la salinidad 15 PSU la separación de las hifas (Fig. 13). A 30 PSU se visualiza un cambio en la morfología, observando cambios en las hifas (Fig. 14). Para la cepa Q7 en la salinidad 5 PSU, se observan hifas delgadas septadas con fíbulas (Fig. 16). En 10

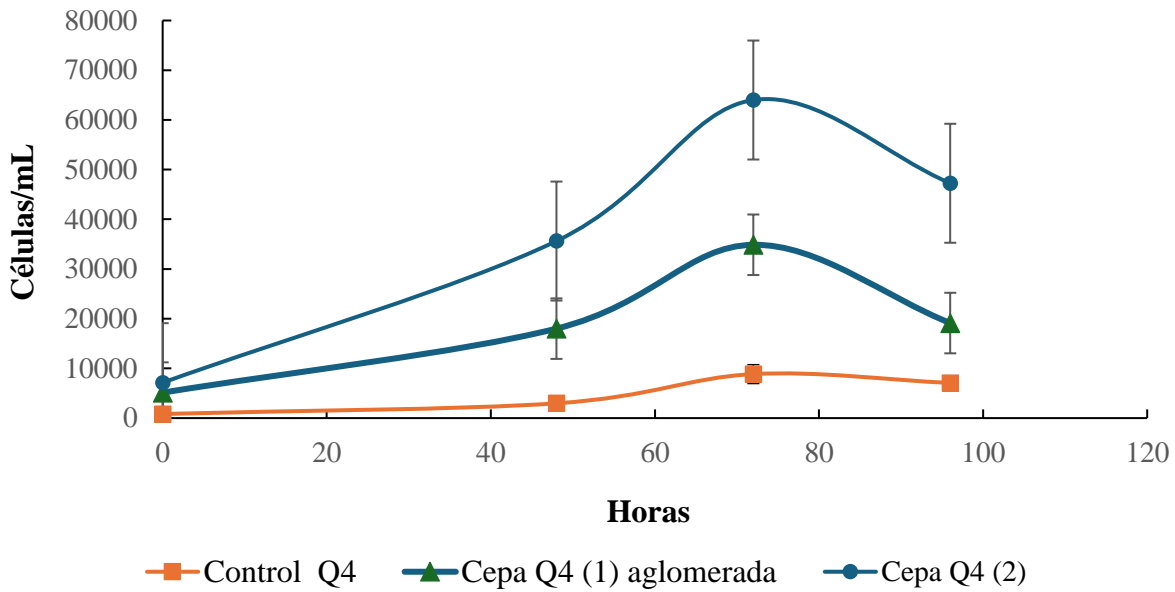
PSU, se observan hifas de mayor tamaño septadas (Fig. 17). En la figura 18A, para la salinidad 15 PSU, se puede observar un conjunto de hifas que forman el micelio y en la figura 18B se observa un tabique (hifas). En la figura 19, se observan los cambios en el tamaño de la pared de las hifas.

### 6.3 Objetivo 3: Determinar el crecimiento y concentración de carotenoides de fungoides aislados de agua dulce cultivados en glicerol p.a.

Los resultados del ensayo mostraron que la cepa Q4 era la mejor candidata para evaluar el escalamiento del cultivo en un medio alternativo. Se preparó el inóculo en un periodo de tiempo de 96 horas, hasta llegar a la fase estacionaria (Fig. 20).

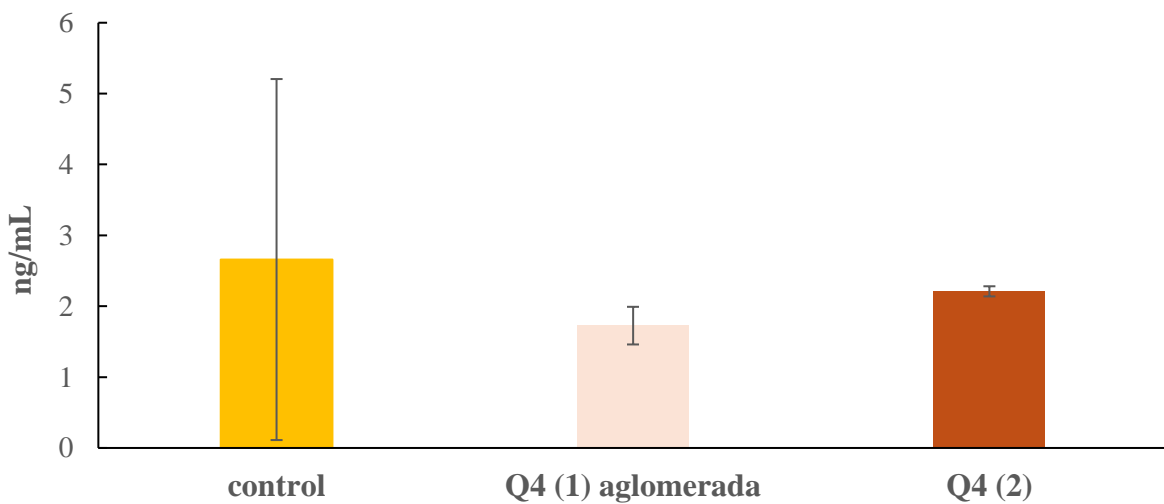


**Figura 20.** Curva de crecimiento celular (células/mL) de la cepa Q4 durante 96 horas hasta llegar a su fase estacionaria.



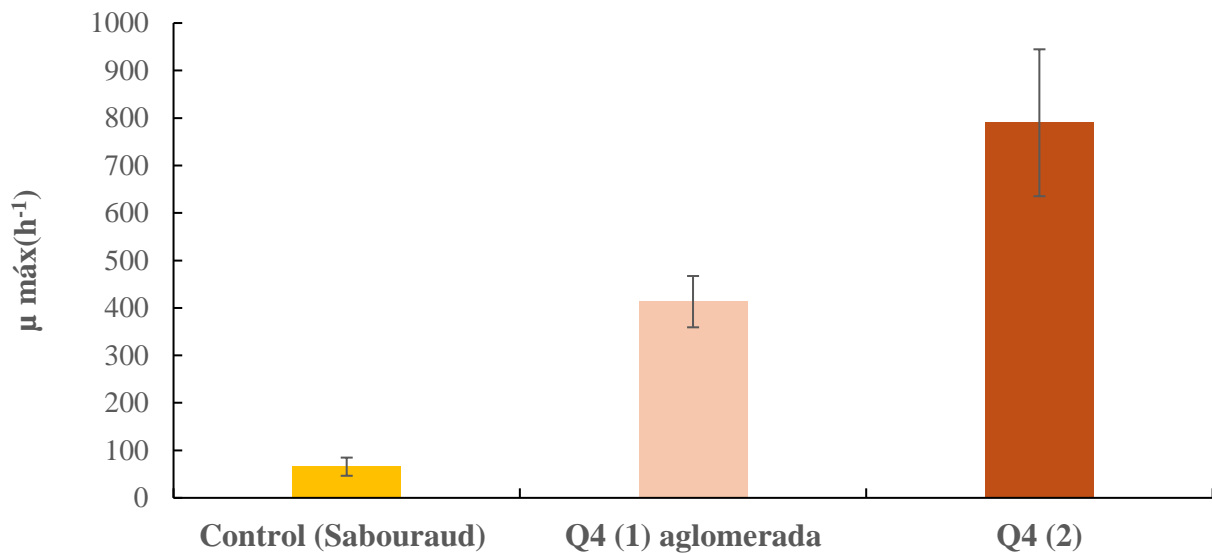
**Figura 21.** Curva de crecimiento celular (células/mL) de cepa Q4 en glicerol al 10% v/v a 0 PSU y medio control durante 96 horas hasta llegar a la fase de senescencia.

Desde el inicio en la curva de crecimiento celular (células/mL) se puede observar que las cepas cultivadas en glicerol aumentaron su concentración celular, incrementándose en la fase exponencial, tanto la cepa Q4 (1) aglomerada y Q4 (2) no aglomerada en comparación con el control Q4 en medio Sabouraud. A las 72 horas la cepa alcanza la fase estacionaria tanto el control como en medio glicerol. Posterior a dicha fase, comienza la muerte celular (Fig. 21).



**Figura 22.** Concentración de carotenoides totales (ng/mL), determinado al final del experimento del desafío de salinidad en medio control Sabouraud y glicerol al 10% v/v a 0 PSU.

Al final del experimento del desafío de salinidad en la fase de senescencia, se obtuvieron resultados de la concentración de carotenoides totales (Fig. 22). En medio control se obtuvieron concentraciones de CT de  $3,39 \text{ ng/ml} \pm 1,50$ , para las cepas cultivadas en glicerol Q4 (1) aglomerada, se obtuvo una concentración de  $1,726 \pm 0,26 \text{ ng/mL}$  y para Q4 (2) no aglomerada  $2,21 \pm 0,07$ . Se realizó una prueba estadística y la correlación entre todas las concentraciones de carotenoides en ambos medios de cultivos fueron significativa ( $p < 0,05$ ).



**Figura 23.** Cinética de crecimiento celular de la cepa Q4 en medio control y en medio glicerol p.a. al 10% v/v a 0 PSU.

Los resultados obtenidos de la cinética de crecimiento celular demuestran que Q4 (2) cultivada en medio glicerol p.a. al 10% sin aglomeramiento tiene mayor valor en comparación con la cepa que se aglomera y el medio control (Fig. 23).

## 7. Discusión

En los últimos años, ha existido una creciente demanda de productos naturales, lo que ha impulsado a los investigadores y la industria a buscar procesos más sostenibles (Mussagy et al., 2024). El alto potencial de mercado por los carotenoides, ha interesado a los científicos en la búsqueda de nuevas cepas de microorganismos capaces de sintetizar un amplio espectro de este tipo de pigmentos (Sereti et al., 2024). De acuerdo con los resultados obtenidos en el objetivo 1, de los microorganismos aislados del Humedal Urbano Laguna Avendaño, un cuerpo de agua dulce con poca variación en la salinidad (Tabla 1), muestran una ligera disminución en su concentración durante el otoño e invierno. Este cambio podría estar relacionado con el aumento en la entrada de agua y las precipitaciones registradas en 2024. Así mismo, la temperatura y el pH fluctúan a lo largo del año debido a los cambios estacionales, los procesos fotosintéticos y la descomposición de la materia orgánica. En el caso de la concentración de nutrientes (Tabla 2), se observó que la baja concentración de nitrato en verano podría favorecer la síntesis de metabolitos secundarios (Lu et al., 2016), mientras que el aumento en los niveles de fosfato durante el otoño e invierno podría estimular la síntesis de ATP y procesos metabólicos para algunos microorganismos presentes en ecosistemas de agua dulce (Lu et al., 2016).

De las 17 cepas de levaduras aisladas, se observaron colores que variaban entre amarillo y naranja intenso, lo que demostró un alto contenido de carotenoides totales (Tabla 3). Se escogió la técnica del cebo de polen de pino (Gaertner, 1966), ya que, este tipo de microorganismos aislados con dicho método son potenciales productores de sustancias de interés comercial (Yamasaki et al., 2006). Resultados similares han sido reportados para cepas de levaduras aisladas desde medio marino, sin embargo, los valores de CT obtenidos en el presente trabajo son alrededor de un orden de magnitud más bajo que los reportados para las levaduras marinas (Pino et al., 2015, 2021). Al respecto se debe considerar, que las cepas marinas fueron cultivadas en condiciones óptimas de crecimiento en un biorreactor estandarizado, lo que sugiere que la cepa Q4 y Q7 podrían aun tener el potencial de producir más carotenoides en condiciones óptimas. Especies de los géneros *Rhodotorula* y *Rhodospiridium* producen carotenoides, con colonias que presentan coloración naranja rojiza y fucsia, similares a los colores de las cepas estudiadas. La intensidad de pigmentos varía dependiendo a la presencia de pigmentos como la astaxantina (Andrewes et al., 1976).

En la preparación del inóculo se observa una fase de adaptación (Fig. 2), que no se muestra en los experimentos de desafío de salinidad de Q4 y Q7 (Fig. 3 y Fig. 5, respectivamente). Esto posiblemente se debe a que en la preparación del inóculo las células pasaron de un medio sólido a un medio líquido, vale decir, de un fenotipo sésil a un fenotipo planctónico. A pesar de esto, en las curvas de crecimiento del desafío a la salinidad de ambas cepas, igualmente se observa un periodo de adaptación al gradiente

de salinidad, pero mucho menor al observado en la preparación del inóculo. Posterior a esto las cepas entran en una fase de crecimiento lineal hasta la fase estacionaria. Esto se asocia a los cambios en la dinámica del ciclo celular, siendo más lenta la fase de G0 (Palomba et al., 2024).

Los resultados destacan la presencia de una variabilidad metabólica entre las cepas aisladas ensayadas, destacando su capacidad de adaptarse ante estrés salino en diferentes concentraciones. Para la cepa Q4 su crecimiento celular responde a un estímulo tipo umbral, pudiendo ser comparada con el crecimiento que presenta la levadura *Debaryomyces hansenii*, que en presencia de concentraciones altas de NaCl o KCl el crecimiento celular es mayor que en un medio sin sal, ya que las células acumulan altas concentraciones de cationes como sodio y potasio, además, poseen una gran habilidad para intercambiar tanto  $\text{Na}^+$  como  $\text{K}^+$  por el catión opuesto, característica por la cual pueden soportar altas concentraciones de sales (Santacruz, 2004). En cambio, la cepa Q7 responde inversamente tipo “dosis-respuesta”, lo que indica que, a mayor concentración de salinidad, menor es su crecimiento celular (Fig. 10). Los resultados sugieren que existen estos dos mecanismos, no obstante, el crecimiento celular promedio de Q7 es mayor al de Q4 hasta 25 PSU (Fig. 9), a 30 PSU es Q4 quien tiene el mayor crecimiento celular (Fig. 3). Para estos tipos de microorganismos se ha descrito que, ante estrés osmótico, posee tres mecanismos básicos los cuales protegen a las células. Primero se tiene los transportadores moleculares que regulan la actividad celular (Serrano et al.,1999). Un ejemplo de estudio es la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, que responde al estrés osmótico y la presencia de sal, mediante una serie de mecanismos regulados por proteínas y genes específicos. Se activan dos proteínas de la membrana plasmática, Sln1p y Sho1, los cuales actúan como sensores cuando hay un aumento moderado de sal o pérdida de agua dentro de la célula (Serrano et al.,1999). Estas proteínas activan una vía de señalización llamada Hog1, que se encarga de iniciar mecanismos de defensa, el cual activa la MAP quinasa Pb2SP (Maeda et al., 1995) lo que permite que se expresen genes diana de defensa para la respuesta ante el estrés osmótico como ENA1, encargada de expulsar el exceso de sodio (Nevoigt & Stahl, 1997). También se activa la proteína calcineurina, la cual depende del calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), también activa ENA1, a través de un grupo de proteínas llamadas Hal8 (Serrano et al.,1999). El segundo mecanismo que se activa para defender a la célula del estrés salino son los mecanismos de transporte iónico, en el cual se regula la entrada de sodio que depende del potencial eléctrico de la membrana, que está regulada por dos proteínas Pma1 (bomba de protones) y Trk1,2 (transportadores de potasio), trabajan juntos para regular la carga eléctrica y evitar la entrada excesiva de sodio (Serrano et al.,1999). Los transportadores Trk1 y Trk2 facilitan la absorción de potasio en los canales  $\text{K}^+$  los cuales regulan la homeostasis iónica y la ATPasa ENA1 y el anti portador NHA1, son los encargados de la expulsión del sodio. El tercer mecanismo, es la activación de los cationes dentro de las vacuolas, la cual mantiene el pH intracelular para las reacciones enzimáticas (Illarionov et al., 2021) funcionando como sensor de sodio. La respuesta

de las levaduras a los cambios en el potencial hídrico externo debe implicar la detección y la transducción de la señal recibida. (Nevoigt & Stahl, 1997).

También se obtuvieron resultados de la actividad enzimática (MDH) de estas cepas ensayadas, lo que demostró que Q4 responde ante estrés salino, incrementado la actividad de malato deshidrogenasa (Tabla 4). En contraste con Q7, se obtiene actividad enzimática en bajas concentraciones de salinidad (Tabla 5). Estos datos reflejan un aumento en el flujo metabólico a través del ciclo de Krebs como una forma de sobrevivencia de la levadura frente al estrés osmótico (Paton & Jennings, 1988). Para los resultados obtenidos de la medición de biomasa microbiana viva (ATP) en etapa inicial y final del experimento para Q7 (Fig. 8), respalda la respuesta de la levadura ante estrés salino, ya que, a través de la activación de la ATPasa, enzima encargada de romper el ATP (adenosin trifosfato) para liberar energía y ayudar en la membrana plasmática, encargada de regular la homeostasis iónica. Esta enzima junto con la proteína calcineurina permiten a las levaduras adaptarse y sobrevivir en condiciones de alta salinidad (Nakayama et al., 2004). Esto se ve afectado en actividades fisiológicas, como la velocidad de crecimiento celular, el bombeo de protones y la acumulación de  $K^+$ , el cual es el catión más abundante al interior de todas las células y tiene muchas influencias en las reacciones de enzimas y funciones mitocondriales, que se requieren para su funcionamiento, también participa en la regulación de la presión osmótica y en el equilibrio ácido-básico, por lo que se ve afectado a altas concentraciones de sodio (Uribe et al., 1991).

El estrés osmótico induce la biosíntesis de varios carotenoides a través de la vía del ácido mevalónico (Hagi et al., 2015), lo que la actividad de la vía de biosíntesis de metabolitos secundarios podría ser modulada por factores abióticos (Zhao & Li, 2022), como el estrés salino. De los resultados obtenidos del objetivo 2, demostraron que Q4 a altas salinidades, obtiene alta concentración de carotenoides, similares a las obtenidas en medio control (Fig. 6). Por el contrario, para el caso de la cepa Q7 de la cual solo se observó producción de carotenoides en salinidades bajas (Fig. 7), obteniendo concentraciones más bajas que la cepa Q4. Los datos obtenidos de ambas cepas experimentales, demuestran que la fisiología responsable de la adaptación al estrés salino es diferente y mucho más dinámica que la de las células completamente adaptadas (Blomberg & Adler, 1992). En la actualidad existe poca investigación sobre el efecto del estrés salino en el contenido de carotenoides (Li et al., 2014). Lo que significa que las dos cepas se pueden manipular, sin que pierdan su potencial de crecimiento, lo que las hace cepas interesantes para ser estudiadas para cultivar en medios alternativos y optimizar su producción de carotenoides.

Los resultados obtenidos del objetivo 3, se evidenció que la cepa Q4 presentó mayor crecimiento celular en medio glicerol p.a. en comparación con el medio comercial Sabouraud (Fig. 21). Asimismo, su cinética de crecimiento celular fue superior en el medio con glicerol que al del medio comercial (Fig.

23). Estos resultados son consistentes con los estudios en la especie de *Rhodotorulas sp*, donde se ha demostrado que el glicerol crudo puede ser utilizado como una fuente alternativa de carbono, permitiendo tanto el crecimiento celular como la producción simultánea de lípidos y carotenoides (Pino et al., 2021). Por otro lado, el trabajo también demostró que la cepa aglomerada tiene menor crecimiento celular. Este resultado concuerda con investigaciones realizadas en *Saccharomyces cerevisiae*, en las que se ha demostrado que la aglomeración celular puede ser influenciada tanto por factores genéticos de la cepa como por las condiciones ambientales. En particular, cuando los niveles de oxígeno disuelto son limitantes en el fermentador, se ha observado un aumento en la aglomeración del cultivo de *Saccharomyces cerevisiae* (Guinard et al., 1993). Este fenómeno puede influir en la calidad del producto final y la eficiencia de los procesos de producción (De Moraes Borba et al., 1999). La utilización de este tipo de fuentes alternativas como el glicerol induce la producción y acumulación de osmolitos, lo que conlleva al reajuste del volumen celular y la presión de turgencia (Blomberg & Adler, 1992).

Otro ejemplo comparable con los resultados obtenidos es el que se realizó con *Saccharomyces cerevisiae*, la cual en presencia de glicerol lo utiliza como principal osmolito, que le permite regular la presión interna, cuando el ambiente tiene un estrés o altas concentraciones de sales. Esta acción, está controlada por la vía de osmosensing y señalización HOG (High Osmolarity Glycerol – Glicerol de alta osmolaridad), que transmite una señal a través de un módulo de quinasa MAP (proteína activada por mitógeno) a genes diana, lo que le permite a la levadura adaptarse a los cambios en osmolaridad. La vía funciona a través de una serie de proteínas que detectan el aumento de la concentración de solutos en el medio y activan una respuesta de adaptación. Los cuales mediante las proteínas Sln1p, Ypd1p y el homólogo regulador de respuesta Ssk1p, detectan los cambios en la osmolaridad y activa la producción de glicerol a través de los genes GPD1 y GPP2, permitiendo a la célula mantener su equilibrio interno (Maeda et al., 1995).

Además, se determinó la concentración de carotenoides totales, demostrando que no existen diferencias significativas en su producción entre el medio comercial y el medio con glicerol (Fig. 22). Estos resultados sugieren que el glicerol puede ser una fuente de carbono adecuada para la síntesis de estos compuestos bioactivos, ofreciendo una fuente de carbono alternativa viable para su producción (Pino et al., 2021).

Una vez aislado el microorganismo, es posible sugerir su género, pero la determinación de la especie requiere el uso de métodos moleculares complementarios, junto con análisis morfológicos, fisiológicos y genotípicos (Mendoza et al., 2005). Para este estudio, se realizó una reacción en cadena de polimerasa (PCR) (Fig. 11), utilizando cebadores específicos para células eucariontes y trabajando con diferentes concentraciones de muestra para optimizar la amplificación de las cepas Q4 y Q7. A pesar del control

positivo fue amplificado correctamente con los partidores EukA y EukB universales para eucariontes, no se logró obtener productos amplificados de las cepas estudiadas, impidiendo la identificación del microorganismo mediante este método molecular. La imposibilidad de amplificar las cepas estudiadas mediante los marcadores universales de eucariontes puede deberse a que estos microorganismos posean secuencias ligeramente distintas que impidan el alineamiento de los partidores. Otra posible causa de la falta de la amplificación por PCR puede deberse también a otros factores, por ejemplo, cuando el PCR no funciona correctamente, pueden generar productos inespecíficos de diferentes tamaños, que aparecen como una escalera difusa en el gel de electroforesis, o incluso no formarse productos amplificados (Lorenz et al., 2012). Además, la presencia de inhibidores en el ADN puede afectar la lisis celular durante la extracción del material genético, interfiriendo en la amplificación (Wilson et al., 1997). La contaminación es otro factor a considerar, ya que el PCR es una técnica altamente sensible y la presencia de ADN exógeno puede comprometer los resultados (Jia et al., 1992).

De las micrografías obtenidas de Q4 y Q7, revelaron una morfología filamentosa por la presencia de hifas septadas (Fig. 12, Fig. 15, respectivamente), también se observó la estructura del micelio definida (Fig. 16, Fig. 18A). Este tipo de crecimiento es característico en levaduras y propone una posible transición entre fenotipos unicelulares y filamentosos en respuesta a condiciones ambientales específicas (Ramage et al., 2008). Además, se observó una distribución heterogénea de las estructuras celulares, con zonas donde predominan células individuales (Fig. 13, Fig. 17). Este comportamiento sugiere que la cepa Q4 y Q7 podría estar experimentando un proceso de diferenciación celular, lo que puede influir en su capacidad de adhesión a superficies y su tolerancia a condiciones ambientales extremas (Wessel et al., 2014),

En las imágenes obtenidas de Q4 (Fig. 14) y Q7 (Fig. 19) en alta salinidad, se observa una morfología filamentosa con presencia de hifas septadas. Sin embargo, se pueden notar las diferencias en la organización estructural, Q4 presenta hifas entrecruzadas, con estructuras más compactas y ramificadas. Esta morfología puede ser indicativa de una mayor capacidad celular, lo que ha sido reportado en especies de levaduras marinas que forman estructuras multicelulares en respuesta a estrés salino (Kutty & Philip, 2008). En contraste, Q7 muestra hifas más alargadas y menos entrelazadas, lo que podría reflejar un crecimiento más disperso o una menor resistencia al estrés salino.

Adicionalmente, la formación de hifas septadas en ambas cepas indica la presencia de mecanismos adaptativos similares a los descritos en hongos dismórficos como, *Candida albicans*, donde el cambio de morfología es clave para la colonización de ambientes extremos (Gostinčar et al., 2011).

## 8. Conclusiones

1. Las diferencias en la producción de carotenoides entre las 17 cepas aisladas del Humedal Urbano Laguna Avendaño de Quillón, puede atribuirse a factores que afectan diferencialmente la síntesis de carotenoides entre cepas distintas, como la respuesta al estrés, la adaptación genética y la regulación de la síntesis de carotenoides bajo condiciones de salinidad baja. Estos resultados resaltan la importancia de comprender los mecanismos moleculares involucrados en este proceso, lo que permitirá desarrollar estrategias para optimizar la producción de carotenoides a partir de microorganismos aislados de nuevos cuerpos de agua.
2. Las cepas Q4 y Q7 presentaron dos mecanismos distintos de respuesta ante el experimento de desafío de salinidad. Mientras Q4 muestra un mecanismo tipo “umbral” sobre los 25 PSU, Q7 muestra un mecanismo tipo “dosis-respuesta” inverso. La existencia de estos dos mecanismos sugiere que la adaptación de las levaduras de agua dulce al incremento de salinidad no es única. La evaluación de cepas como estas, con mayor tolerancia a la salinidad y el análisis de su estabilidad genética y fisiológica en condiciones variables permitirán comprender mejor sus capacidades adaptativas. Estos hallazgos abren nuevas oportunidades en la biotecnología microbiana, indicando que ciertas levaduras de agua dulce pueden ser explotadas en ambientes salinos para la producción de compuestos de alto valor comercial, como los carotenoides.
3. La identificación molecular de las cepas Q4 y Q7 sigue siendo un desafío, ya que la amplificación de ADN mediante PCR con partidores universales de eucariontes no fue exitosa. Esto resalta la necesidad de realizar estudios adicionales utilizando nuevos partidores como el 26S para identificación de levaduras generales. Esta limitación plantea una oportunidad para futuras investigaciones dirigidas a caracterizar de manera más precisa estos microorganismos y su potencial biotecnológico.
4. Este trabajo aporta tanto en el área de ecología del ecosistema como también en la parte biotecnológica, por sus mecanismos de acción y su tolerancia al sodio.

## 9. Referencias

- Alem, W. T. (2024). Effect of herbal extracts in animal nutrition as feed additives. *Heliyon*, *10*(3), e24973. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e24973>
- Amend, A., Burgaud, G., Cunliffe, M., Edgcomb, V. P., Ettinger, C. L., Gutiérrez, M. H., Heitman, J., Hom, E. F. Y., Ianiri, G., Jones, A. C., Kagami, M., Picard, K. T., Quandt, C. A., Raghukumar, S., Riquelme, M., Stajich, J., Vargas-Muñiz, J., Walker, A. K., Yarden, O., & Gladfelter, A. S. (2019). Fungi in the Marine Environment: Open Questions and Unsolved Problems. *mBio*, *10*(2), 10.1128/mbio.01189-01118. <https://doi.org/doi:10.1128/mbio.01189-18>
- Andrewes, A. G., Phaff, H. J., & Starr, M. P. (1976). Carotenoids of *Phaffia rhodozyma*, a red-pigmented fermenting yeast. *Phytochemistry*, *15*(6), 1003-1007. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)84390-3](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)84390-3)
- Antunes, M., & Sá-Correia, I. (2024). The role of ion homeostasis in adaptation and tolerance to acetic acid stress in yeasts. *FEMS Yeast Research*, *24*, foae016. <https://doi.org/10.1093/femsyr/foae016>
- Blomberg, A., & Adler, L. (1992). Physiology of Osmotolerance in Fungi | This review is dedicated to Professor Birgitta Norkrans who introduced us to this field of science. In A. H. Rose (Ed.), *Advances in Microbial Physiology* (Vol. 33, pp. 145-212). Academic Press. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0065-2911\(08\)60217-9](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0065-2911(08)60217-9)
- Chambergo, F. S., & Valencia, E. Y. (2016). Fungal biodiversity to biotechnology. *Appl Microbiol Biotechnol*, *100*(6), 2567-2577. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7305-2>
- Chi, Z., Liu, G.-L., Lu, Y., Jiang, H., & Chi, Z.-M. (2016). Bio-products produced by marine yeasts and their potential applications. *Bioresource Technology*, *202*, 244-252. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.12.039>
- Damare, S., Singh, P., & Raghukumar, S. (2012). Biotechnology of marine fungi. *Prog Mol Subcell Biol*, *53*, 277-297. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-23342-5\\_14](https://doi.org/10.1007/978-3-642-23342-5_14)
- Dar, R. A., Tsui, T.-H., Zhang, L., Tong, Y. W., Sharon, S., Shoseyov, O., & Liu, R. (2024). Fermentation of organic wastes through oleaginous microorganisms for lipid production - Challenges and opportunities. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *195*, 114328. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.rser.2024.114328>
- Fenner, E. D., Bressan, S. K., Santos, A. A. D., Giehl, A., Minussi, G. D. A., Teixeira, E. A. A., Da Costa Diniz, M., Werlang, L., Fogolari, O., Rosa, C. A., Treichel, H., Da Costa Cabrera, L., & Júnior, S. L. A. (2024). Ethanol and 2-phenylethanol production by bee-isolated *Meyerozyma caribbica*

strains. *Preparative biochemistry & biotechnology*, 1-11.  
<https://doi.org/10.1080/10826068.2024.2414094>

Garcia-Cortes, A., Garcia-Vásquez, J. A., Aranguren, Y., & Ramirez-Castrillon, M. (2021). Pigment Production Improvement in *Rhodotorula mucilaginosa* AJB01 Using Design of Experiments. *Microorganisms*, 9(2), 387. <https://www.mdpi.com/2076-2607/9/2/387>

Guinard, J., y Lewis, M. (1993). Estudio del fenómeno de aglomeración en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of The Institute of Brewing*, 99, 487-503. <https://doi.org/10.1002/J.2050-0416.1993.TB01189.X>.

Hagi, T., Kobayashi, M., & Nomura, M. (2015). Aerobic conditions increase isoprenoid biosynthesis pathway gene expression levels for carotenoid production in *Enterococcus gilvus*. *FEMS Microbiology Letters*, 362(12), fnv075.

IllarionovA, LahveePAG, KumarR, 2021. Caracterización del estrés por sales de potasio y sodio en las levaduras *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces marxianus* y *Rhodotorula toruloides*. *Appl Environ Microbiol* 87:e03100-20.

<https://doi.org/10.1128/AEM.03100-20>

Jia, Z., McCullough, N., Martel, R., Hemmingsen, S., & Young, P. (1992). Gene amplification at a locus encoding a putative Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter confers sodium and lithium tolerance in fission yeast. *The EMBO Journal*, 11. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1992.tb05209.x>

Kamat, S., Kumar, S., Philip, S., & Kumari, M. (2023). Chapter 10 - Secondary metabolites from marine fungi: current status and application. In A. Kumar, M. Bilal, L. F. R. Ferreira, & M. Kumari (Eds.), *Microbial Biomolecules* (pp. 181-209). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-323-99476-7.00001-6>

Kouba, M., & Mourot, J. (2011). A review of nutritional effects on fat composition of animal products with special emphasis on n-3 polyunsaturated fatty acids. *Biochimie*, 93(1), 13-17. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biochi.2010.02.027>

Kutty, S., & Philip, R. (2008). Marine yeasts—a review. *Yeast*, 25. <https://doi.org/10.1002/yea.1599>

Li, C., Zhang, N., Li, B., Xu, Q., Song, J., Wei, N., Wang, W., & Zou, H. (2017). Increased torulene accumulation in red yeast *Sporidiobolus pararoseus* NGR as stress response to high salt conditions. *Food Chemistry*, 237, 1041-1047. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.06.033>

- Li, X., Li, X.-M., Xu, G.-M., Li, C.-S., & Wang, B.-G. (2014). Antioxidant metabolites from marine alga-derived fungus *Aspergillus wentii* EN-48. *Phytochemistry Letters*, 7, 120-123. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.phytol.2013.11.008>
- Lorenz, T. (2012). Reacción en cadena de la polimerasa: protocolo básico más solución de problemas y estrategias de optimización. *Revista de Experimentos Visualizados : JoVE*. <https://doi.org/10.3791/3998>.
- Lu, N., Chen, J., Wei, D., Chen, F., & Chen, G. (2016). Global Metabolic Regulation of the Snow Alga *Chlamydomonas nivalis* in Response to Nitrate or Phosphate Deprivation by a Metabolome Profile Analysis. *International Journal of Molecular Sciences*, 17. <https://doi.org/10.3390/ijms17050694>.
- Maeda, T., Takekawa, M., & Saito, H. (1995). Activation of yeast PBS2 MAPKK by MAPKKKs or by binding of an SH3-containing osmosensor. *Science*, 269(5223), 554-558.
- Maeda, T., Wurgler-Murphy, S. M., & Saito, H. (1994). A two-component system that regulates an osmosensing MAP kinase cascade in yeast. *Nature*, 369(6477), 242-245. <https://doi.org/10.1038/369242a0>
- Maiani, G., Periago Castón, M. J., Catasta, G., Toti, E., Cambrodón, I. G., Bysted, A., Granado-Lorencio, F., Olmedilla-Alonso, B., Knuthsen, P., & Valoti, M. (2009). Carotenoids: actual knowledge on food sources, intakes, stability and bioavailability and their protective role in humans. *Molecular nutrition & food research*, 53(S2), S194-S218.
- Makhutova, O. N., Zuev, I. V., Mashonskaya, Y. O., Andrushchenko, P. Y., & Sulstonov, S. A. (2024). Diets that do not let benthivorous salmonid fish, *Thymallus baicalensis*, realize their potential for accumulating large content of omega-3 PUFAs in muscle tissue. *Food Webs*, 38, e00337. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fooweb.2024.e00337>
- Mendoza<sup>1</sup>, Mireya. (2005). Importancia de la identificación de levaduras. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 25(1), 15-23. Recuperado en 11 de marzo de 2025, de [http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1315-25562005000100004&lng=es&tlng=es](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-25562005000100004&lng=es&tlng=es).
- Murakawa, N., Sakamoto, T., Kanoh, M., Park, S.-B., Kishino, S., Ogawa, J., & Sakuradani, E. (2022). Microbial production of hydroxy fatty acids utilizing crude glycerol. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 39, 102286. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bcab.2022.102286>
- Mussagy, C. U., Dias, A. C. R. V., Santos-Ebinuma, V. C., Shaaban Sadek, M., Ahmad, M., de Andrade, C. R., Haddad, F. F., dos Santos, J. L., Scarim, C. B., Pereira, J. F. B., Floriano, J. F., Herculano, R. D., & Mustafa, A. (2024). Is the carotenoid production from *Phaffia rhodozyma* yeast

- genuinely sustainable? a comprehensive analysis of biocompatibility, environmental assessment, and techno-economic constraints. *Bioresource Technology*, 397, 130456. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biortech.2024.130456>
- Nakayama, H., Yoshida, K., & Shinmyō, A. (2004). Yeast plasma membrane Ena1p ATPase alters alkali-cation homeostasis and confers increased salt tolerance in tobacco cultured cells. *Biotechnology and Bioengineering*, 85. <https://doi.org/10.1002/bit.20021>.
- Nevoigt, E., & Stahl, U. (1997). Osmoregulation and glycerol metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Reviews*, 21(3), 231-241. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0168-6445\(97\)00058-2](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0168-6445(97)00058-2)
- Norbeck, J., Pählman, A.-K., Akhtar, N., Blomberg, A., & Adler, L. (1996). Purification and characterization of two isoenzymes of DL-glycerol-3-phosphatase from *Saccharomyces cerevisiae*: Identification of the corresponding GPP1 and GPP2 genes and evidence for osmotic regulation of Gpp2p expression by the osmosensing mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 271(23), 13875-13881.
- Overland, M., y Skrede, A. (2017). Levadura derivada de biomasa lignocelulósica como recurso alimentario sostenible para su uso en acuicultura. *Revista de la ciencia de la alimentación y la agricultura*, 97, 3, 733-742. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8007>
- Palomba, E., Chiusano, M., Monticolo, F., Langella, M. C., Sanchez, M., Tirelli, V., De Alteriis, E., Iannaccone, M., Termolino, P., Capparelli, R., Carteni, F., Incerti, G., & Mazzoleni, S. (2024). Extracellular Self-DNA Effects on Yeast Cell Cycle and Transcriptome during Batch Growth. *Biomolecules*, 14. <https://doi.org/10.3390/biom14060663>
- Pan, C., Yin, J., Ma, B., Wen, J., & Luo, P. (2024). Whole-genome sequence and characterization of a marine red yeast, *Rhodospiridium sphaerocarpum* GDMCC 60679, featuring the assimilation of ammonia nitrogen. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 137(2), 85-93. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2023.12.007>
- Paton, F. M., & Jennings, D. H. (1988). Effect of sodium and potassium chloride and polyols on malate and glucose 6-phosphate dehydrogenases from the marine fungus *Dendryphiella salina*. *Transactions of the British Mycological Society*, 91(2), 205-215. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0007-1536\(88\)80206-7](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0007-1536(88)80206-7)
- Polburee, P., Yongmanitchai, W., Lertwattanasakul, N., Ohashi, T., Fujiyama, K., & Limtong, S. (2015). Characterization of oleaginous yeasts accumulating high levels of lipid when cultivated in glycerol and their potential for lipid production from biodiesel-derived crude glycerol. *Fungal Biology*, 119(12), 1194-1204. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.funbio.2015.09.002>

- Poontawee, R., Lorliam, W., Polburee, P., & Limtong, S. (2023). Oleaginous yeasts: Biodiversity and cultivation. *Fungal Biology Reviews*, 44, 100295. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fbr.2022.11.003>
- Pino, N., Socias, C., & González, R. R. (2015). Fungoides marinos productores de DHA, EPA y carotenoides provenientes del ecosistema marino de Chile central y sur-austral. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 50(3), 507-520
- Roth, F., Ahearn, D., Fell, J., Meyers, S., & Meyer, S. (1962). ECOLOGY AND TAXONOMY OF YEASTS ISOLATED FROM VARIOUS MARINE SUBSTRATES<sup>1</sup>. *Limnology and Oceanography*, 7, 178-185. <https://doi.org/10.4319/LO.1962.7.2.0178>
- Saubenova, M., Rapoport, A., Venkatachalam, M., Dufossé, L., Yermekbay, Z., & Oleinikova, Y. (2024). Production of Carotenoids by Microorganisms. *Fermentation*. <https://doi.org/10.3390/fermentation10100502>
- Sereti, F., Alexandri, M., Papadaki, A., Papapostolou, H., & Kopsahelis, N. (2024). Carotenoids production by *Rhodospiridium paludigenum* yeasts: Characterization of chemical composition, antioxidant and antimicrobial properties. *Journal of Biotechnology*, 386, 52-63. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2024.03.011>
- Serrano, R., Mulet, J. M., Rios, G., Marquez, J. A., de Larrinoa, I. F., Leube, M. P., Mendizabal, I., Pascual-Ahuir, A., Proft, M., Ros, R., & Montesinos, C. (1999). *A glimpse of the mechanisms of ion homeostasis during salt stress*. **Journal of Experimental Botany**, 50(Special Issue), 1023-1036. Oxford University Press.
- Shearer, C., Descals, E., Kohlmeyer, B., Kohlmeyer, J., Marvanová, L., Padgett, D., Porter, D., Raja, H., Schmit, J., Thornton, H., & Voglymayr, H. (2006). Fungal biodiversity in aquatic habitats. *Biodiversity and Conservation*, 16, 49-67. <https://doi.org/10.1007/s10531-006-9120-z>
- Srilekha, V., & Gudikandula, K. (2023). Chapter 23 - Antioxidant potential of carotenoids derived from marine bacteria and their applications. In S.-K. Kim, K.-H. Shin, & J. Venkatesan (Eds.), *Marine Antioxidants* (pp. 311-315). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-323-95086-2.00007-2>
- Sun, X., Dou, Z., Shurson, G. C., & Hu, B. (2024). Bioprocessing to upcycle agro-industrial and food wastes into high-nutritional value animal feed for sustainable food and agriculture systems. *Resources, Conservation and Recycling*, 201, 107325. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2023.107325>
- Warwas, N., Vilg, J. V., Langeland, M., Roques, J. A. C., Hinchcliffe, J., Sundh, H., Undeland, I., & Sundell, K. (2023). Marine yeast (*Candida sake*) cultured on herring brine side streams is a

- promising feed ingredient and omega-3 source for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 571, 739448. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2023.739448>
- Wen, Z., Zhang, S., Odoh, C. K., Jin, M., & Zhao, Z. K. (2020). Rhodosporidium toruloides-A potential red yeast chassis for lipids and beyond. *FEMS Yeast Research*, 20(5), foaa038.
- Wilson, I. (1997). Inhibición y facilitación de la amplificación de ácidos nucleicos. *Microbiología Aplicada y Ambiental*, 63, 3741 - 3751. <https://doi.org/10.1128/aem.63.10.3741-3751.1997>.
- Yamasaki, T., Aki, T., Shinozaki, M., Taguchi, M., Kawamoto, S., & Ono, K. (2006). Utilization of Shochu distillery wastewater for production of polyunsaturated fatty acids and xanthophylls using thraustochytrid. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 102(4), 323-327. <https://doi.org/https://doi.org/10.1263/jbb.102.323>
- Yu, W.-J., Chung, D., Bae, S. S., Kwon, Y., Cho, E.-S., & Choi, G. (2023). Characterization and Biological Activities of Yeasts Isolated from Marine Environments. *Microbiology Research*. <https://doi.org/10.3390/microbiolres14040134>
- Zhao, D., & Li, C. (2022). Multi-omics profiling reveals potential mechanisms of culture temperature modulating biosynthesis of carotenoids, lipids, and exopolysaccharides in oleaginous red yeast *Rhodotorula glutinis* ZHK. *LWT*, 171, 114103. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.114103>
- Zhao, Y., Guo, L., Xia, Y., Zhuang, X., & Chu, W. (2019). Isolation, Identification of Carotenoid-Producing *Rhodotorula* sp. from Marine Environment and Optimization for Carotenoid Production. *Marine Drugs*, 17. <https://doi.org/10.3390/md17030161>