

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE ECUADOR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
ESCUELA DE BIOLOGÍA

Caracterización e identificación de levaduras presentes en el tracto intestinal de escarabajos pasálidos (Coleoptera: Passalidae) colectados en dos localidades del Ecuador.

Disertación previa a la obtención del título de Licenciado en Ciencias Biológicas

DANIEL ALEJANDRO CHAMORRO ENCALADA

QUITO, 2017

Certifico que la disertación de Licenciatura en Ciencias Biológicas del Sr. Daniel Alejandro Chamorro Encalada ha sido concluida de conformidad con las normas establecidas; por lo tanto, puede ser presentada para la calificación correspondiente.

Dr. Javier Carvajal Barriga, PhD.

Director de la Disertación

Quito, 17 de octubre del 2017

DEDICATORIA:

*“All that is gold does not glitter,
not all those who wander are lost;
the old that is strong does not wither,
deep roots are not reached by the frost.*

*From the ashes a fire shall be woken,
A light from the shadows shall spring;
Renewed shall be blade that was broken,
The crownless again shall be king.”*

- J. R. R. Tolkien

A mis padres amados, pilares fundamental de mi vida.

A mi hermana Emily, por ser mi inspiración, mi fortaleza y mi orgullo.

AGRADECIMIENTOS:

A mi Poder Superior, por ser mi providencia en los momentos de mayor necesidad.

Al Movimiento Internacional 24 Horas de Alcohólicos Anónimos, por ser mi conducto de vida.

Al Dr. Javier Carvajal por permitirme ser parte de su equipo, por haber confiado en mí y haberme guiado dentro del camino de la ciencia.

A la Msc. Patricia Portero por su paciencia y tolerancia. Por su gran ayuda y su bondad para enseñar.

Al Ing. Renato Naranjo por ser un fuerte apoyo y no olvidar la fraternidad colegial.

A todos mis amigos del CNIB: Berni, Miguel, Yeanina, Melanie, Pamela, Juany, JFC y Luchín.

A mis eternos amigos: Salomón, Isaac, Andrés, Rebequita, Fernanda y Michu que me han acompañado la mitad de mi vida, con quienes espero poder compartir muchas más experiencias

Un agradecimiento especial y a manera de homenaje personal a Alicia Freire, mi inspiración por la ciencia.

A Mishel Yáñez, la mejor amiga que pude haber tenido, por ser parte fundamental de mi vida y por ser mi cómplice y enseñarme el arte de vivir:

TABLA DE CONTENIDOS

1. RESUMEN.....	1
2. ABSTRACT.....	2
3. INTRODUCCIÓN.....	3
4. OBJETIVOS.....	12
4.1 Objetivo General.....	12
4.2 Objetivos Específicos.....	12
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	13
5.1 Colecta de Escarabajo Pasálidos y Recuperación de Levaduras.....	13
5.2 Aislamiento de Levaduras.....	13
5.3 Preservación de Aislados.....	14
5.4 Caracterización Morfológica y Fisiológica.....	15
5.5 Evaluación Fisiológica de Asimilación y Fermentación en Diferentes Fuentes de Carbono.....	15
5.6 Caracterización Molecular e Identificación de Especies de Levaduras.....	16
5.6.1 Extracción de ADN nuclear	16
5.6.2 Amplificación de la Región ITS mediante PCR (ITS-PCR).....	16
5.6.3 Polimorfismo de Longitud de Fragmentos de Restricción (RFLP).....	17
5.6.4 Amplificación del Dominio D1/D2 del segmento 26S de ADN ribosomal mediante PCR.....	17
5.6.5 Purificación de ADN	18
5.6.6 Secuenciación de Muestras y Análisis Bioinformático.....	19
5.7 Cálculo del Índice de Abundancia (I_a) e Índice de Especialización (S_i).....	20
5.7.1 Índice de Abundancia (I_a).....	20
5.7.2 Índice de Especialización (S_i).....	20

5.8 Evaluación de Aislados Fermentadores de Xilosa.....	21
5.8.1 Selección de aislados fermentadores de xilosa.....	21
5.8.2 Inoculación de Levaduras en Medios con Xilosa.....	21
5.8.2.1 Obtención de Biomasa.....	21
5.8.2.2 Cálculo de unidades formadoras de colonias (UFC).....	22
5.9 Cromatografía Líquida de Alta Precisión (HPLC).....	22
5.9.1 Diseño experimental.....	23
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	23
6.1 Recuperación y aislamiento de levaduras en intestinos de escarabajos.....	23
6.2 Caracterización morfológica.....	23
6.2.1 Caracterización Macroscópica.....	23
6.2.2 Caracterización Microscópica.....	24
6.3 Caracterización Fisiológica (Asimilación y Fermentación).....	28
6.4 Identificación de especies y Caracterización Molecular.....	29
6.5 Índice de Abundancia (I_a) e Índice de Especialización (S_i) de las especies de levaduras encontradas.....	31
6.6 Evaluación de Aislados Fermentadores de Xilosa.....	32
7. CONCLUSIONES.....	34
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	35
9. FIGURAS.....	50
10. TABLAS.....	54
11. ANEXOS.....	63

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Esquema de la obtención de biomasa para pruebas fisiológicas	50
Figura 2:	Porcentajes de asimilación que presentó cada azúcar.....:	50
Figura 3:	Porcentaje de fermentación que presentó cada azúcar.....	51
Figura 4:	Árbol filogenético formado a partir de las secuencias obtenidas del dominios D1/D2 del segmento 26S del ARN ribosomal	52
Figura 5:	Curva de adaptabilidad de las especies de levaduras en el Ecuador	53

LISTA DE TABLAS

Tabla 1:	Características morfológicas de las colonias recuperadas luego de siete días a 25 °C.....	54
Tabla 2:	Características morfológicas microscópicas de las especies identificadas	55
Tabla 3:	Perfiles de asimilación de azúcares aislados de los intestinos de los escarabajos.....	56
Tabla 4:	Perfiles de fermentación de azúcares aislados de los intestinos de los escarabajos	57
Tabla 5:	Resumen del análisis de los productos de PCR del dominio D1/D2 del segmento 26S del RNA ribosómico de los aislados.. ..	61
Tabla 6:	Incidencia de especies de levaduras colectadas en diferentes ecosistemas y diferentes sustratos en Ecuador (incluidas 4 islas de Galápagos) y cálculo de I_a y S_i	61
Tabla 7:	Análisis estadístico de los porcentajes (g/L) obtenidos de la cromatografía (HPLC).	60

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1:	Proceso de formación de ascosporas en levaduras Ascomicetas teleomorfas63	63
Anexo 2:	Tipos de división celular en levaduras Ascomicetas anamorfos.....63	63
Anexo 3:	Formación de esporas externas sobre un basidio en levaduras basidiomicetas, alternado con un estado unicelular con gemación haploide64	64
Anexo 4:	Origen del estado anamorfo haploide mediante la germinación de basidiosporas haploides64	64
Anexo 5:	Esquema de las regiones del ADN ribosomal utilizadas para la identificación molecular de levaduras.....65	65
Anexo 6:	Características morfológicas macroscópicas utilizadas en la Colección de Levaduras Quito-Católica (CLQCA) para su catalogación.....66	66
Anexo 7:	Escarabajo de la familia Passalidae67	67
Anexo 8:	Zonas de colecta. Se realizaron en las estribaciones de la cordillera de los Andes.....67	67
Anexo 9:	Obtención de las excretas de los escarabajos en cajas estériles in situ.....68	68
Anexo 10:	Inoculación de excretas en YPD (yeast peptone dextrose) caldo.....68	68
Anexo 11:	Identificación de posibles colonias de levaduras. Se confirmaron las colonias mediante observaciones en microscopio.....69	69
Anexo 12:	Diferentes tipos de colonias antes de ser aisladas individualmente.....69	69
Anexo 13:	Características utilizadas en la Colección de Levaduras Quito-Católica (CLQCA) para su catalogación.....69	69
Anexo 14:	Documentación fotográfica de los 40 aislados identificados.....71	71
Anexo 15:	Ecosistemas y sustratos muestreados por el grupo de investigadores de la CLQCA desde el año 2006.....79	79
Anexo 16:	Perfiles agrupados por especie de la digestión por	

Polimorfismo de Fragmentos de Restricción del segmento interno de transcripción (ITS-RFLP)	80
Anexo 17: Resultados del análisis de los tratamientos con xilosa en diferentes cepas de la especie <i>Scheffersomyces xylosifermentans</i>	86

1. RESUMEN

Actualmente las levaduras son los microorganismos más utilizados en el área de la biotecnología. En el Ecuador se han descrito nueve especies nuevas en los últimos años, y se conservan más de 3000 aislados de las regiones naturales del Ecuador en la Colección de Levaduras Quito-Católica, de la Escuela de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Se han usado algunas de estas levaduras en diferentes campos de la biotecnología. Sin embargo, la cantidad de levaduras con potenciales usos en la ciencia aplicada sigue siendo inmenso. En este estudio se encontraron levaduras que habitan el tracto intestinal de escarabajos pasálidos (Passalidae, Coleoptera) aisladas de sus excretas. Las colectas se realizaron en dos localidades del Ecuador: en Gualea-Pichincha y en Lumbaquí-Sucumbíos. Se encontraron 40 aislados de levaduras, las cuales fueron caracterizadas mediante su morfología macroscópica (colonias) y microscópica, además se realizaron pruebas fisiológicas con nueve diferentes fuentes de carbono, con el fin de obtener perfiles de asimilación y fermentación. Posteriormente se realizó la identificación de especies mediante dos técnicas moleculares: la primera fue el uso de enzimas de restricción (RFLPs) en productos de amplificación (PCR) del segmento de transcripción interno (ITS), y la segunda fue la secuenciación del dominio D1/D2 del segmento 26S del ADN ribosómico. De esta caracterización se lograron identificar 14 especies, de las cuales 8 son nuevos registros para el Ecuador. Se identificaron dos posibles nuevas especies pertenecientes al género *Wickerhamomyces*. También se identificaron aislados capaces de fermentar xilosa, de los cuales se evaluó las capacidades fermentativas para potenciales usos biotecnológicos, esta evaluación se la realizó en medio líquido con tres concentraciones de xilosa (2,5%; 5%; 10%) y el análisis de productos de fermentación se lo efectuó mediante cromatografía líquida de alta precisión (HPLC) obteniendo dos cepas capaces de ser utilizadas en futuros estudios.

Palabras clave: escarabajos, fermentación, intestinos, levaduras, Passalidae.

2. ABSTARACT

Currently, the yeasts are the most used microorganisms in the biotechnology field. In Ecuador, a well-known country because of its biodiversity, nine novel yeast species have been described up to date. Moreover, more than 3000 isolates from the Ecuador`s natural environments are preserved at The Catholic University Yeast Collection in Quito. In this study yeasts species that inhabit the guts of passalid beetles (Passalidae, Coleoptera) were isolated from its feces. The beetles herein reported were collected in two localities of Ecuador, namely: Gualea and Lumbaquí in Pichincha and Sucumbíos provinces, respectively. Forty isolates were recovered and characterized by their macro-morphology (colonies) and their microscopic morphology. In addition, physiological tests were performed with nine different carbon sources to obtain profiles of assimilation and fermentation of each isolate. Subsequently, species identification was performed by using two molecular techniques: the first was through the use of Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLPs) using restriction enzymes on the amplification products of the Internal Transcribed Spacer (ITS); the second was the sequencing of the D1/D2 domain of the 26S segment of the ribosomal DNA. Fourteen species were identified, of which eight were new records for Ecuador. There has been identified two potentially hitherto non described yeast species from the *Wickerhamomyces* genus. Xylose fermenting yeasts were found among the isolates recovered in the beetle`s gut. Xylose fermentation trials were performed by testing three increasing concentrations of xylose in liquid culture medium (2,5%; 5%; 10%w/v). Measurements of fermentation products as well as sugar content was determined by HPLC.

Keywords: beetles, fermentation, guts, Passalidae, yeast.

3. INTRODUCCIÓN

Las levaduras son descritas como organismos microscópicos unicelulares inmóviles capaces de formar hifas o pseudohifas. Es un grupo polifilético perteneciente al reino Fungi, y se encuentran distribuidas en los phyla Ascomycota y Basidiomycota, dentro el clado Dikarya. (Kurtzman y Fell, 1998; Morais, Pagnocca y Rosa, 1994; Beijerinck, 1989; Stajich, Berbee, Blackwell Hibbett, James, Spatafora y Talor, 2009).

Las levaduras del phylum Ascomycota, forman un grupo monofilético de alrededor de 100 especies divididos en cuatro clases: Neoelectomyces, Pneumocytidomycetes, Schizosaccharomycetes y Taphrinomycetes (Roberts y Oliver, 2010). Son típicamente haploides y morfológicamente simples. Pueden presentar dos estados reproductivos: un estado reproductivo sexual o teleomorfo en el cual se producen ascosporas inmóviles en sacos distintivos llamados ascas (Anexo 1); y un estado reproductivo asexual o anamorfo (predominante en toda su vida), donde no se forman ascosporas (Anexo 2) (Abdel-Azeem, 2010).

En su estado anamorfo, las levaduras ascomicetas han sido clasificadas de acuerdo al tipo de división celular y en ocasiones a la aparición de morfologías celulares únicas (ojivales, butiformes, baciliformes, entre otras). Dentro de esta clasificación se han observado tres tipos de división celular: polar o bipolar, multipolar o multilateral y por fisión, la particularidad de esta última, es que la nueva pared celular se forma sin constricción de la pared celular parental como sucede en la formación de yemas (Anexo 2) (Daniel, Lachance y Kurtzman, 2014).

Por otro lado, las levaduras basidiomicéticas se distribuyen en tres diferentes subphylum: Pucciniomycotina, Agaricomycotina y Exobasidiomycetes (Kurtzman, Fell y Boekhout, 2011). Y se diferencian de las levaduras ascomicetas principalmente por la formación de esporas externas sobre basidios o esterigmas (Ochoa y Vázquez, 2004). Morfológicamente presentan, en su mayoría, un estado unicelular con gemación haploide alternado con un estado hifal dicariótico (dos núcleos), el cual resulta del apareamiento de células compatibles (cariogamia), este estado se presenta en la mayoría de taxa teleomórficos (Anexo 3) (Bandoni, 1995; Flegel, 1977).

En algunas especies pueden hallarse estados anamórficos diploides, aneuploides y haploides. Este último empieza normalmente con la germinación de una basidiospora haploide en un holometabasidium (metabasidio unicelular) y termina con la conjugación de basidiosporas haploides (estado teleomórfico) originando su estado dicariota (Anexo 4) (Boekhout, Fonseca, Sampaio, Bandoni, Fell y Kwon-Chung, 2011; Lin, y Heitman, 2005; Tschärke, Lazera, Chang, Wickes y Kwon-Chung, 2003).

El estado teleomórfico de las levaduras se conoce solamente por observaciones realizadas en medios de cultivos y además no se lo ha descubierto en todas las especies, por lo que no se sabe mucho acerca de este comportamiento en la naturaleza, a excepción de especies parásitas de importancia económica. Tampoco está claro si un estado teleomorfo es la misma especie que un anamorfo en particular, por lo que las levaduras (y hongos en general) solían tener dos nombres científicos válidos (Kurtzman et al., 2011). Sin embargo en la Declaración de Amsterdam de Nomenclatura Fúngica se reconoció la necesidad del uso de un solo nombre científico, por lo que se acordó que se debe dar prioridad al primer nombre con el que se describió el hongo (incluidas levaduras) (Hawksworth, Crous, Redhead, Reynolds, Samson, Seifert, Taylor, Wingfield, Aime, Ahmet, Feng-Yan, de Beer, Begerow, Berikten, Boekhout, Buchanan, Burgess, Buzina, Cai, Cannon, Crane, Damm, Daniel, van Diepeningen, Druzhinina, Dyer, Eberhardt, Fell, Frisvad, Geiser, Geml, Glienke, Gräfenhan, Groenewald, Groenewald, de Gruyter, Guého-Kellermann, Guo, Hibbett, Hong, de Hoog, Houbraken, Huhndorf, Hyde, Ismail, Johnston, Kadaifciler, Kirk, Kõljalg, Kurtzman, Lagneau, Lévesque, Liu, Lombard, Meyer, Miller, Minter, Najafzadeh, Norvell, Ozerskaya, Öziç, Pennycook, Peterson, Pettersson, Quaedvlieg, Robert, Ruibal, Schnürer, Schroers, Shivas, Slippers, Spierenburg, Takashima, Taşkın, Thines, Thrane, Uztan, van Raak, Varga, Vasco, Verkley, Videira, de Vries, Weir, Yilmaz, Yurkov y Zhang, 2011), por lo tanto, hoy en día se toma en cuenta el primer nombre con el que se ha descrito a una levadura, sin importar su estado.

En resumen, las levaduras, ya sean ascomicetas o basidiomicetas, son generalmente diferenciadas de hongos superiores por su gemación o fisión como primera vía de reproducción asexual, y su reproducción sexual no se da en cuerpos fructíferos complejos (Boekhout et al., 2011). Esta diferenciación se la ha realizado históricamente mediante la caracterización e identificación de sus propiedades genotípicas y fisiológicas, las cuales se basan en una vasta gama de pruebas estandarizadas de caracterización morfológica de la

colonia y células (gemación); pruebas de fermentación de azúcares, de asimilación de varias fuentes de carbono y sustratos nitrogenados, respuestas a requerimientos vitamínicos, ensayos de crecimiento a diferentes temperaturas y en presencia de varias concentraciones de azúcar o sal (NaCl) (Kurtzman, Boekhout, Robert, Fell y Deak, 2003; Kurtzman, 2006).

Sin embargo, Kurtzman y Robnett (1998) mencionan que estas pruebas pueden presentar ambigüedades o imprecisiones, principalmente porque se puede manifestar una alta variabilidad entre cepas de la misma especie, por lo tanto muchas de estas pruebas pueden ser imprácticas en la identificación taxonómica, empero su principal importancia es proporcionar información para la selección de especies biotecnológicamente importantes (Kurtzman et al., 2011). Además, cabe mencionar que la identificación de especies de levaduras no se apega al concepto biológico de especie porque en la naturaleza no se encuentra con facilidad en su estado teleomórfico, es decir, no existe una sexualidad en la cual se pueda aplicar el concepto biológico de especie por lo que la taxonomía de levaduras es particularmente problemática (Libkind, 2008). Por esto hoy en día las comparaciones moleculares son la vía más usada en la identificación de levaduras y sus relaciones filogenéticas. Para esto se ha desarrollado numerosas técnicas para la identificación, clasificación y detección de levaduras, como es la secuenciación de nueva generación, que hoy en día se cuenta como una de las técnicas más rápidas de identificación que llevan solo algunas horas (Fell, Scorzetti, Connel y Craig, 2006; Kurtzman y Fell, 2006; Kurtzman et al., 1998; Kurtzman et al. 2003; van der Vossen, Rahaoui, de Nus; Hartog, 2003, Tan y cols., 2015).

Entre las técnicas de identificación rápida se cuentan el uso de kits desechables rápidos, pero su uso se restringe principalmente a laboratorios clínicos y se los ha desarrollado exclusivamente para 40 o 60 especies de interés médico (Deák. 1993). Sin embargo existen otras técnicas moleculares como la secuenciación de regiones de la subunidad corta (SSU) y la subunidad larga (LSU) de genes del ARN ribosomal (ARNr); y la secuenciación del complejo espaciador interno de transcripción (ITS) del ARNr (Fell et al., 2006, Kurtzman et al., 2006; Kurtzman et al., 1998; Scorzetti, Fell, Fonseca, y Statzell-Tallman, 2002).

Estudios han demostrado que la región variable y no codificante del complejo (ITS), y el gen codificante y conservado 5.8S del ARNr son útiles para medir las relaciones

genéticas de hongos cercanos puesto que exhiben diferencias interespecíficas mucho mayores que los genes 18S y 25S del ARNr (Anexo 5a) (Cai, Roberts y Collins 1996; James, Collins y Roberts, 1996; Kurtzman, 1992, 1993).

Estas regiones ribosómicas (ITS) evolucionan de manera concertada, por lo que muestran un bajo polimorfismo intraespecífico y una gran variabilidad interespecífica (Li, 1997). Dichas propiedades se utilizaron inicialmente en la clasificación de especies del género *Saccharomyces*, mostrando una gran fiabilidad en su identificación (Huffman, Molina y Jong, 1992; Molina, Inoue y Jong, 1992; Valente, Gouveia, de Lemos, Pimentel, van Elsas, Mendona-Hagler y Hagler, 1996; Wyder y Puhán, 1997) Por lo que actualmente este método permite reconocer y comparar, incluso entre especies anamórficas y teleomórficas, de modo que surgió la creación de filogenias de diferentes grupos de levaduras mediante la comparación de secuencias de su ITS, pero estos estudios solo se enfocan ya sea en un género en particular, previamente seleccionado, o sobre un número relativo pequeño de especies ampliamente divergentes. En cualquier caso, las relaciones son muchas veces incomprensibles porque el número de taxones utilizados es pequeño. Entonces, para tener una perspectiva amplia sobre las relaciones de las especies, hoy se comparan alrededor de 600 nucleótidos secuenciados a partir de los dominios D1/D2 de la LSU del DNAr (Anexo 5b) (Guadet, Julien, Lafey y Brygoo, 1989). Si las variaciones encontradas al comparar dos secuencias muestran alrededor del 1% de sustituciones, se puede decir que probablemente se tratan de especies diferentes, y cepas con 0 a 3 nucleótidos diferentes pueden tratarse de especies hermanas (Guadet et al., 1989). La información obtenida de estas secuencias es de acceso público, y se las encuentra en bases de datos como el GenBank. Dichas secuencias han sido determinadas tanto para levaduras ascomicetas como para levaduras basidiomicetas (Fell et al., 2006, Kurtzman et al., 2006; Kurtzman et al., 1998; Scorzetti et al., 2002).

Estas técnicas moleculares han permitido la identificación de un gran número de nuevas especies en las últimas décadas, y desde la primera edición de “*The Yeast, a taxonomic study*”, las especies descritas ha crecido de 164 en el año 1952 y 700 en el año 1998 a más de 1400 para el 2011 (Kurtzman et al., 2011). Este número podría ser sobrepasado fácilmente si se toma en cuenta que aún hoy en día existen ambientes naturales en los que no se han buscado levaduras, y además se cuenta con nuevas técnicas de identificación como la secuenciación de nueva generación (NGS: Next-Generation

sequencing), que ha sido adaptada para la búsqueda y caracterización de patógenos, entre estas el estudio de microbiota (incluidas las levaduras). (Kurtzman et al., 1998; González-Hernández y Peña, 2002; Linkind et al., 2006; Orbegozo et al., 2008; Farfán, 2015).

Se han encontrado levaduras ascomicetas especialistas en sustratos calcáreos, incluidas las conchas de moluscos y arrecifes cnidarios. Otras más se han reportado como responsables de infecciones en humanos (Kurtzman et al., 1998; Murdoch, Reif, Mazzoil, McCulloch, Fair y Bossart, 2008; Morris, Johnson, Bossart, Adams, Reif y Fair, 2010). También se han hallado levaduras ascomicetas y basidiomicetas en profundidades marinas infectando varios invertebrados o degradando compuestos de hidrocarburo en derrames y filtraciones submarinas (Davies y Westlake, 1979). Otras levaduras han sido halladas en sustratos específicos como las descubiertas en desiertos o en zonas congeladas. (Starmer, Aberdeen y Lachance, 2006, Kurtzman et al., 1998; Blackwell, 2011).

Las levaduras además han logrado diversificarse y ocupar una amplia variedad de ambientes, debido principalmente a características que les confieren ventajas sobre otros microorganismos, como la capacidad de tolerar amplios rangos de estrés físico y pH, altas presiones osmóticas, temperaturas inusuales de frío o calor, elevada concentración de metales, baja cantidad de oxígeno, y requerimientos mínimos de carbono (Kurtzman et al., 1998; Gonzales-Hernández et al., 2002; Linkind et al., 2006; Orbegozo et al., 2008). Éstas características han sido aprovechadas por la humanidad en un vasto campo de aplicaciones desde su domesticación hace 5000 años (Querol y Fleet, 2006).

Hoy por hoy, y gracias a los avances biotecnológicos recientes ha aumentado nuestra dependencia hacia las levaduras por su rol en la producción de productos farmacéuticos o la producción en masa de productos bioquímicos como el ácido acético; en la elaboración de numerosos productos industriales (incluyen proteínas celulares (SCP), probióticos, saborizantes y enzimas industriales); sustancias bioactivas como proteínas, aminoácidos, vitaminas, polisacáridos, ácidos grasos, fosfolípidos, poliaminas, β -carotenoides, trealosas, quinasas, quitinasas, amilasas, proteasas, toxinas asesinas, entre otros (Zhenming, Zhiqiang, Lingmei, Fang, Chunling, Xianghong y Haifeng, 2006).

Las levaduras además son estudiadas por sus aplicaciones prácticas en el biocontrol de plagas, en la biorremediación o como indicadores de calidad ambiental. Además son

productoras de alto contenido de lípidos, incluidos los aceites para biocombustibles (biodiesel) (Buzzini y Vaughan-Martini, 2005; Wolf, 2012; Johnson, 2013a, 2013b) En este contexto. La investigación básica de descripción e identificación es el mejor apoyo para la ciencia aplicada (Boundy-Mills, Glantschnig, Roberts, Yurkov, Casaregola, Daniel, Turchetti, 2016).

Actualmente se realizan esfuerzos en el desarrollo de nuevas tecnologías enfocadas en la explotación de la mejor característica de las levaduras: su capacidad fermentativa. Principalmente por el interés de obtener etanol para combustible de residuos lignocelulósicos, el cual se ha convertido en la principal opción de combustibles alternativos. La producción y combustión de etanol no contribuye significativamente a la cantidad total de dióxido de carbono ya presente en la atmósfera, además las emisiones residuales y la toxicidad del etanol son mucho menores con respecto al petróleo (Wyman y Hinman 1990).

En países como Estados Unidos, el mercado de biocombustibles está liderado por bioetanol derivado del maíz. Sin embargo, la producción de este biocombustible está limitado por la disponibilidad de tierras agrícolas, los recursos hídricos y la competencia directa que tiene con los alimentos (Hoekman, 2009). Por lo tanto se ha recurrido a la obtención de bioetanol de residuos celulósicos de la biomasa vegetal, en primer lugar porque producirlo tiene un costo energético menor en comparación al obtenido del maíz y la emisión de gases de efecto invernadero se reduce en un 85% (Farrell, Plevin, Turner, Jones, O'Hare y Kammen, 2006). Y en segundo lugar porque la celulosa es la biomolécula más abundante del planeta (Perlack, Wright, Turhollow, Graham, Stokes y Erbach, 2006) al comprender alrededor del 50% del peso seco de las plantas leñosas, y está formada totalmente de β -glucosa. Otro componente importante de la biomasa vegetal es la hemicelulosa. Constituye alrededor del 25% del peso seco de la madera y su mayor componente es la D-xilosa (Jefferies, 1985; Schmid, Giesel, Schoberth y Sahn, 1986).

Para que la producción de bioetanol, a partir de residuos lignocelulósicos, sea económicamente competitiva, se necesita que el sustrato sea utilizado completamente. Esto quiere decir que tanto hexosas como pentosas deben ser convertidas a etanol mediante microorganismos que puedan llevar a cabo esta tarea eficientemente. Desafortunadamente la conversión de pentosas en etanol sigue siendo una de las principales barreras para industrializar la producción de etanol de residuos lignocelulósicos (Liang, Kim, He y Wang,

2013), porque las levaduras convencionales no pueden fermentar xilosa. Sin embargo, en las últimas décadas, se han descubierto levaduras como *Candida shehatae*, y otras del género *Scheffersomyces* con la capacidad de fermentar D-xilosa (Jefferies, 1985; Schmid et al., 1986; Urbina, Schuster, y Blackwell, 2013).

Estas levaduras han sido halladas consistentemente en los tubos digestivos de escarabajos pasálidos (Coleoptera: Passalidae) y escarabajos de cuernos largos (Coleoptera: Cerambycidae), debido a que la dieta de estos invertebrados está basada en troncos y madera en descomposición, que como ya se mencionó están formados de celulosa y hemicelulosa, asimismo de otros agregados como lignina y compuestos fenólicos. Todos estos componentes son polímeros de difícil digestión (Adelsberger, 1975; Hillis, 1987; Parkin 1940; Haack y Slansky 1987; Geib et al., 2009) por lo que la presencia de levaduras en su intestino es producto de una asociación simbiote obligatoria estricta, ya que las levaduras adaptadas a este medio cumplen roles metabólicos importantes al sintetizar aminoácidos, vitaminas, lípidos, esteroides y feromonas útiles para los hospederos. También se encargan de la degradación de sustratos intratables, y detoxificación de sus productos (Suh et al., 2013) logrando que estos insectos ocupen hábitats que, de otro modo, no habrían podido conquistar (Suh, McHugh y Blackwell, 2004). En general, la presencia de levaduras asociadas con los intestinos de insectos detritívoros confirman que existe una asociación entre la fermentación de xilosa, levaduras e insectos (Urbina et al., 2013).

Sin embargo, el intestino de insectos ha sido un ambiente donde muy pocos han buscado levaduras, y a pesar de ello se han logrado identificar un alto número de taxones desconocidos en este ambiente, contribuyendo con más de 200 nuevas especies incrementando dramáticamente la diversidad de levaduras descritas (Suh et al., 2004; Suh, McHugh, Pollock y Blackwell, 2005).

En este contexto, los escarabajos pasálidos han sido los más utilizados en estos estudios debido a que habitan los mismos sustratos leñosos en los que se asientan ciertos hongos basidiomicéticos (Anexo 7). Además son insectos sub sociales, y viven en colonias de individuos relacionados con generaciones superpuestas, lo que podría promover asociaciones simbiotes entre levaduras y escarabajos al degradar los polisacáridos complejos de la madera en descomposición (Lichtwardt y William, 1999).

Para poder explotar estas características de las levaduras se han creado desde 1984 colecciones de cultivos levaduras a nivel mundial las cuales se han encargado de ir agregando nuevos aislados a la biodiversidad de levaduras, esto con el fin de poder usarlas en necesidades futuras (Mora, Tittensor, Adl, Simpson y Worm, 2011). Como resultado se ha visto la necesidad de preservar la biodiversidad, ya sea de conjuntos de especies nuevas o de poblaciones genéticas de especies extensamente investigadas como *S. cerevisiae* y *Schizosaccharomyces pombe*, mediante la deposición de levaduras en estas colecciones implica que la biodiversidad se preservará a largo plazo y su disponibilidad permitirá evaluar el uso de las mismas en diversos procesos biotecnológicos (Purvis y Hector, 2000; Hoag, 2010).

La Colección de Levaduras Quito Católica (CLQCA) conserva “*ex situ*” alrededor de 3200 aislados de los ambientes naturales del Ecuador, y en los últimos años se han descrito nuevas especies para el país como: *Candida carvajalis*, *Candida theae*, *Saturnispora quitensis*, *Wickerhamomyces arborarius*, *Kasachstania yasuniensis*, *Saccharomycopsis fodiens*, *Candida ecuadorensis* y *Kodomea transpacífica* (Carvajal, Portero, Tufiño, Bastidas, Guamán-Burneo, Rosa, 2011). Además se ha de mostrado que en el Ecuador los insectos son la segunda fuente más abundante de levaduras luego de las flores (Carvajal et al., 2011).

. El aproximamiento matemático utilizado para entender la abundancia de las especies de levaduras encontradas en el Ecuador y su adaptabilidad a diferentes sustratos se ha cuantificado con el índice de abundancia (I_a) y el índice de especialización (S_i). Es necesario continuar realizando estudios ambientes naturales del país por su potencial como fuente de levaduras, muchas de ellas aún sin describir o que no se han registrado para el país, y principalmente por su potencial uso en biotecnología (Carvajal et al., 2011)

En este trabajo se analizarán las levaduras que habitan los tractos digestivos de los escarabajos pasálidos, particularmente por las características descritas anteriormente, en especial porque habitan en galerías que se extienden en los troncos en descomposición. Para llegar hasta las levaduras se recurrió a una técnica no invasiva, que consiste en el análisis coprológico de las excretas. Los escarabajo se colectaron en la parroquia Guala, provincia de Pichincha; y en el cantón Lumbaquí, provincia de Pastaza. A estos aislados se los caracterizó e identificó mediante pruebas fisiológicas y pruebas moleculares hasta nivel de

especie y se determinó el I_a y el S_i para todas las especies. Se identificaron, además, aislados capaces de fermentar xilosa y se evaluaron aquellos con las mejores capacidades fermentativas.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL:

- Caracterizar e identificar levaduras presentes en el tracto intestinal de escarabajos pasálidos (Coleoptera: Passalidae) colectados en dos localidades del Ecuador.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Recuperar, caracterizar y preservar “ex situ” las cepas halladas en las excretas de los escarabajos pasálidos.
- Identificar levaduras capaces de fermentar pentosas.
- Calcular el índice de abundancia y el índice de especialización de las levaduras identificadas.
- Seleccionar levaduras con la mejor producción y tolerancia alcohólicas en fermentación de pentosas para futuras aplicaciones biotecnológicas.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 COLECTA DE ESCARABAJOS PASÁLIDOS Y RECUPERACIÓN DE LEVADURAS

La colecta se realizó en la parroquia Guala (0°08'14,2"N 78°44'55,9") a una altura de 900 msnm, en la provincia de Pichincha; y en el cantón Lumbaqui (0°02'37,7N 77°21'20,3") a una altura de 400 msnm, en la provincia de Pastaza (Anexo 8). Ambas colectas se las realizaron en troncos en descomposición donde viven colonias de escarabajos pasálidos (Davis, 2015).

A cada escarabajo se lo aisló en cajas Petri estériles, y se los colocó vientre arriba esperando la expulsión de las excretas (Anexo 9). La expulsión fue inmediata y luego se las recogió con pinzas estériles procurando no tener contacto con ninguna extremidad del escarabajo.

Las excretas fueron depositadas en tubos Falcon TM de 15 ml con 3 ml de medio "Yeast Peptone α -Dextrose" (YPD) caldo, que incluyó: glucosa (Panreac) al 20%; extracto de levadura (Bacto TM Yeast Extract) al 10%; peptona (Bacto TM Peptone) al 20%; maltosa (Bacto TM Maltose) al 10% (CECT, 2004). El medio no contenía antibiótico.

5.2 AISLAMIENTO DE LEVADURAS

El caldo YPD en el que fueron suspendidas las excretas fue llevado a los laboratorios del Centro Neotropical para Investigación de la Biomasa (CNIB) en coolers (Riboon TM) a temperatura ambiente y posteriormente puestos a incubar por 72 horas en un agitador (Labnet 311DS) a 20 °C (Anexo 10).

Se tomó 1 mL del caldo incubado para sembrarlo en cajas Petri con YPD agar, el cual incluyó los mismos compuestos que el caldo YPD adicionado 20 gL⁻¹ agar (Bacto TM Agar). Las cajas fueron colocadas en una incubadora (Raypa TM Incuterm Digit) a 25 °C por 72 horas, luego fueron revisadas cada 24 horas.

De cada caja se tomó una muestra con un asa bacteriológica de las colonias con apariencia de levaduras (Anexo 11 y 12), para posteriormente ser analizada bajo el microscopio en placas porta objetos. Cada observación se realizó en un microscopio (Boeco) a 40x y 100x, buscando características como: pared celular, gemación o vacuolas (Tedeschi y De Paoli, 2011).

Las colonias confirmadas como levaduras se sembraron en cajas Petri con medio “Yeast Medium Agar” (YM) agar, el cual incluyó: glucosa (Panreac) 10%; extracto de levadura (Bacto™ Yeast Extract) 0,3%; peptona (Bacto™ Peptone), 5%; extracto de malta (Bacto™ Maltose extract) 0,3%; agar (Bacto™ Agar) 2%; (CECT, 2004). Las cajas con las siembras fueron incubadas a 25 °C en una incubadora (Raypa™ Incuterm Digit). Posteriormente se verificó su pureza a las 72 horas (Tedeschi et al., 2011).

5.3 PRESERVACIÓN DE AISLADOS

Los aislados fueron sembrados en YPD caldo con la composición ya mencionada. Luego de 48 horas se tomó 700 µl del caldo y se lo inoculó en crioviales (Axygen®) de 2 mL con 300 µl de glicerol (Buzzini, Branda, Goretti, y Turchetti, 2012; Cimerman, Sonjak, Zalar, Frisvad, Diderichsen, y Plemenitas, 2003). Los crioviales fueron etiquetados según las especificaciones de la Colección de Levaduras Quito-Católica (CLQCA) y se los conservó a -80 °C.

5.4 CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA

Para realizar la caracterización microscópica a todos los aislados purificados se los sembró en medio YM agar y se incubaron a 25 °C entre 48 y 72 horas. De cada uno se tomó una muestra de una colonia con un asa y se la colocó en una placa porta objetos. Se observaron las formas de las células, patrones de gemación, presencia o ausencia de hifas o pseudohifas, y el tipo de base de la gemación. Cada campo observado fue fotografiado digitalmente en un microscopio de contraste de fases (Olympus) en 100X, para luego ser catalogada (Enache-Soare, 2008).

La caracterización macroscópica fue realizada en todos los aislados, los cuales fueron incubados durante 8 días en medio YM agar. Se realizaron fotografías digitales de las

colonias y fueron catalogadas según el patrón usado en la CLQCA (Anexo 13) en donde se detalla la forma, el brillo, el color, la elevación, los bordes, la consistencia y la superficie que pueden tener los aislados, como se describe en el Anexo 14 (Orbera, 2004).

5.5 EVALUACIÓN FISIOLÓGICA DE ASIMILACIÓN Y FERMENTACIÓN EN DIFERENTES FUENTES DE CARBONO

Se evaluaron las capacidades de asimilación y fermentación de los aislados en nueve diferentes fuentes de carbono (glucosa, xilosa, maltosa, galactosa, lactosa, sacarosa, rafinosa, celobiosa, almidón soluble). Las soluciones se prepararon a una concentración del 2%, e incluían una fuente de nitrógeno (Difco TM Yeast Nitrogen Base) al 0,67% p/v, excepto la rafinosa que se preparó al 4% p/v.

Se dispuso 4,5 mL de las soluciones en tubos de pruebas fisiológicas de 6mL, los cuales incluyeron campanas Durham en las que se evaluó la capacidad de fermentación de cada aislado según la cantidad de CO₂ acumulado en la campana. Las lecturas se las realizaron a los tres, siete, 14 y 21 días. Las pruebas de asimilación se las realizó comparando la turbidez de cada tubo con un tubo control, en el cual no se incluyó ninguna fuente de carbono, solo YNB al 0,67% p/v y levadura. La asimilación positiva se la marcó como (+++), la asimilación lenta como (++) , la asimilación débil como (+) y la negativa como (-) (Vincent, Kurtzman, Fell et al., 2011).

En los mismos tubos se evaluó la capacidad fermentativa de cada aislado cada tres, siete, 15 y 21 días, según la cantidad de CO₂ contenido en la campana y se registró de la siguiente manera: campana llena completamente durante los primero siete días (+), campana llena después de una semana (L), campana llena después de dos semanas (S), la campana no se llenó completamente luego de los 21 días (W), campana vacía (-) (Vincent et al., 2011).

5.6 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR E IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES DE LEVADURAS

5.6.1 EXTRACCIÓN DE DNA NUCLEAR

En la extracción de ADN se utilizó biomasa de levaduras de cada aislado, incubado entre 48 y 72 horas. Esta biomasa se colocó en tubos Eppendorf™ de 1,5 mL con 0,4g de perlas de cristal (425-600 µm de diámetro). Se añadió 500 µL de buffer de lisis que incluyó Tris 50 mM (Invitrogen), NaCl (Panreac™) 250 mM, EDTA (Panreac™) 50 mM a pH 8 y H₂O 200 mL). Se colocó suficiente biomasa en los tubos y se los sometió a agitación a 1800 rpm durante tres minutos en un agitador (Reistch). Posteriormente se los incubó por una hora a 65 °C. (Enache-Soare, Pelinescu, Ionescu, Avram, Stoica, y Vassu-Dimov, 2008).

Se realizó una segunda agitación y finalmente se colocó en una centrifuga (Sorvall® RMC) durante 30 minutos a 8500 rpm. El sobrenadante se recogió con pipetas y puntas estériles, y se midió la concentración del ADN mediante espectrofotometría (Nanodrop® 2000c) y se lo colocó en crioviales para conservar el ADN a -20 °C (Libkind et al., 2003; Li, Hartung y Levi, 2006).

5.6.2 AMPLIFICACIÓN DE LA REGIÓN ITS MEDIANTE PCR (ITS- PCR)

Para la amplificación del ADN se utilizó el Mix de PCR que se preparó a un volumen final con las siguientes concentraciones 1x: 10 µl de buffer GotaQ® 5X (Promega); 6 µl de MgCl₂ 25 mM (Promega); 3 µl de primer ITS1 (Invitrogen) 5 µM; 3 µl de primer ITS4 5 µM (Invitrogen); 4 µL Mi dNTPs 10 mM (Promeg); 18,6 µl de agua libre de nucleasas Promega); 0,4 µl de GoTaq® polimerasa (Promega); 5 µl de ADN extraído y diluido (Libkind et al., 2003).

Se usaron los primers sintéticos ITS1 (5`-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3`) e ITS4 (5`-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3`), para amplificar el ADN en un termociclador TC-412 (Techne) mediante los siguientes estándares: un solo ciclo de desnaturalización inicial del ADN a 94 °C durante 5 minutos; 40 ciclos de 1 minuto de desnaturalización a 93 °C; 40 ciclos de 2 minutos de hibridación a 55 °C; 40 ciclos de 2 minutos de extensión a 72 °C; un

ciclo de extensión final por 10 minutos a 72 °C. En un volumen final de 50 µl (Zarzoso, Belloch, Uruburu y Querol, 1999).

El producto de PCR se verificó mediante electroforesis de agarosa ultrapura (Invitrogen) al 0,85% p/v, sometido a 100 V durante 40 minutos en celdas con buffer que incluyó Tris 50 mM, ácido bórico, EDTA 50 mM de pH8 (TBE 0,5 X).

Se cargó aproximadamente 5 µl de muestra de los productos de ITS-PCR en cada pocillo del gel, además 6 µl de marcador de peso molecular de 100 pb TrackIt™ DNA Ladder. Se verificaron las bandas en el transiluminador de luz UV.

5.6.3 POLIMORFISMO DE LONGITUD DE FRAGMENTOS DE RESTRICCIÓN (RFLP-ITS)

Se utilizaron tres enzimas de restricción: HhaI (con especificidad para la secuencia 5`GCG CC), HaeII (con especificidad para la secuencia 5`GG CC) y HinfI (con especificidad para la secuencia 5`GANT C). Estas enzimas fueron seleccionadas según la base de datos de la Universidad de Valencia.

La digestión fue hecha en un volumen final de 15 µL que constó de: 5 µL de Mix del RFLP-PCR (2 µL de buffer de reacción REact 2 10X; 2,2 µL de H₂O destilada estéril y 0,8 µL de enzima de restricción 10 U/ µL) y 10 µL del producto de PCR-ITS (Zarzoso et al., 1999). Todo el Mix se incubó a 37 °C durante 12 h, utilizando una incubadora (Thermo Scientific 1-690), los productos se revelaron mediante electroforesis en geles de agarosa 0,8% p/v, corrido en un campo eléctrico de 85V durante 2 h. Cada gel incluyó un marcador de 100pb de peso (TrackIt™ DNA Ladder), el producto de PCR-ITS, el producto de digestión de cada enzima de cada aislado de levadura fueron verificados en un transiluminador de luz UV y se compararon con los perfiles de la base de datos de la CLQCA y diferentes publicaciones.

5.6.4 AMPLIFICACIÓN DEL DOMINIO D1/D2 DEL SEGMENTO 26S DE ADN RIBOSÓMICO MEDIANTE PCR

Se utilizaron los primers sintéticos NL1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAC-3') y NL4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3') para la amplificación del dominio D1/D2 de segmento 26S. La reacción se la realizó en un volumen de 50 µL que incluyó 31,6 µL de H₂O destilada estéril, 10 µL de Buffer GoTaq® 5X, 1 µL Mix dNTPs 10 mM, 1 µL de primer ITS1 5 µM, 1 µL de primer ITS4 5 µM, 0,4 µL de GoTaq® polimerasa 5 U/ µL y 5 µL del ADN diluido (Libkind et al., 2003).

La amplificación se la realizó en un termociclador TC-412 (Techne), programado para realizar una desnaturalización inicial de 10 min a 95 °C, seguido por 30 ciclos de 30 segundos de desnaturalización a 94 °C; 45 segundos de annealing a 60 °C; 45 segundos de extensión a 72 °C, y una extensión final de 10 minutos a 72 °C (Libkind et al., 2003).

El producto de PCR se verificó mediante geles de electroforesis (0,8%) a 100 V durante 40 minutos. Se cargó 5 µL de muestra de los amplificados y se incluyó en cada gel 6 µL de marcador de peso molecular de 100 pb TrackIt™ DNA Ladder. Se verificaron las bandas en el transluminador de luz UV.

5.6.5 PURIFICACIÓN DE ADN

El producto de PCR fue purificado mediante el sistema SV GEL and PCR Clean-up (Wizard). Se añadió igual cantidad de Membrane Binding Solution al producto de PCR el cual fue insertando en la mini columna del kit de Gen Clean (Promega). La mezcla se transfirió a la mini columna y posteriormente fue incubada a temperatura ambiente durante 1 minuto. Se sometió a centrifugación a 11500 rpm por 1 min, y el sobrenadante fue eliminado (Olson y Morrow, 2012).

En cada columna se agregó 700 µL de Membrane Wash Solution, y se centrifugó a 16000rpm por un minuto; se conservó solo la columna. Se repitió el paso anterior con 500µL de Membrane Wash Solution y se centrifugó de nuevo a 16000 rpm por 5 minutos (Olson et al., 2012).

La mini columna se transfirió a un tubo limpio de 1,5 mL y luego se le añadió 50 μ L de agua libre de nucleasas y se incubó a temperatura ambiente por un minuto. Se centrifugó a 16000 rpm por un minuto. Posteriormente, se incubó a temperatura ambiente por un minuto y se procedió a centrifugar a 16000 rpm por un minuto. Finalmente, se descartó la minicolumna y se conservó el ADN a 4 $^{\circ}$ C o -20 $^{\circ}$ C (Olson et al., 2012)

5.6.6 SECUENCIACION DE MUESTRAS Y ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO

Los productos de PCR purificados fueron cuantificados y enviados a la empresa MACROGEN en Korea del Sur para su secuenciamiento. Los resultados del secuenciamiento recibidos en formato .ab1 fueron alineados usando el programan Geneious Trial 10.2 $\text{\textcircled{R}}$. Se realizó la limpieza manual de las secuencias emparejadas y se generaron las secuencias consenso. Se compararon con la base de datos GeneBank usando el motor de búsqueda BLASTn (BASIC LOCAL ALIGMENT SEARCH TOOL) para secuencias de nucleótidos.

Las secuencias de las identidades obtenidas del BLAST fueron descargadas en formato FASTA, y junto con las secuencias originales se alinearon en el programa MEGA 7.0. Para eliminar fragmentos de alineamiento ambiguos se utilizó el motor online GBlocks 0.91b. Las secuencias se descargaron a un bloc de notas.

En el programa MEGA 7.0 se cargaron las secuencias de aislados identificados y los aislados de referencia para generar el árbol filogenérico mediante el análisis de máxima verosimilitud (Likelihood). Los valores de bootstrap correspondieron a 1000 y se utilizó el modelo de Timura y Nei (1993); una distribución Gamma discreta para modelar las diferencias de velocidad evolutiva entre los sitios (5 categorías (+ G, parámetro = 0,2954)). El árbol se dibujó a escala, con longitudes de ramificación medidas en el número de sustituciones por sitio. El análisis involucró 29 secuencias de nucleótidos. Se eliminaron todas las posiciones que contenían vacíos y datos perdidos. Hubo un total de 416 posiciones en el conjunto de datos final (Kumar, Stecher y Tamura, 2016).

5.7 CÁLCULO DEL ÍNDICE DE ABUNDANCIA Y ESPECIALIZACIÓN DE LOS AISLADOS IDENTIFICADOS

5.7.1 ÍNDICE DE ABUNDANCIA

Para el cálculo del índice de abundancia (I_a) se utilizó la fórmula propuesta por Carvajal et al., (2011):

$$I_a = \frac{(S_c * O)}{(S_m * O_m)}$$

En donde S_c es definido como los sustratos colonizados por las especies; O es la ocurrencia de las especies en los diferentes ecosistemas que han sido analizados; S_m es el número máximo de sustratos analizados en el estudio; y, O_m representa la máxima ocurrencia y es igual número total de ecosistemas analizados. En este cálculo se utilizan un total de siete ecosistemas, y 10 sustratos. Los cuales representan de forma general todas las colectas y estudios realizados en el Ecuador (Incluido Galápagos) por la CLQCA (Anexo 15).

5.7.2 ÍNDICE DE ESPECIALIZACIÓN

Para el cálculo del índice de especialización (S_i) se utilizó la fórmula propuesta por Carvajal et al., (2011): En este modelo se utilizó un factor de corrección de 1.08 sugerido por el autor.

$$S_i = \frac{-\log_{10}(I_a)}{2} * 1,08$$

En donde I_a es el índice de abundancia.

5.8 EVALUACIÓN DE AISLADOS FERMENTADORES DE XILOSA

5.8.1 SELECCIÓN DE AISLADOS FERMENTADORES DE XILOSA

Se seleccionaron los aislados que presentaron una lectura positiva (+) y lenta (L) con respecto a la producción de CO_2 en las pruebas con xilosa durante la fase de pruebas

fisiológicas. Estos aislados se sometieron a tres tratamientos con xilosa a diferentes concentraciones g l^{-1} (2,5 %, 5%, 10%).

5.8.2 INOCULACIÓN DE LEVADURAS EN MEDIOS CON XILOSA

Antes de proceder a la inoculación se debe obtener la cantidad necesaria de biomasa de levaduras para una posterior inoculación.

5.8.2.1 OBTENCIÓN DE BIOMASA DE LEVADURAS

A fin de obtener suficiente biomasa, cada aislado fue sembrado e incubado en agitación durante 24 horas en tubos Falcon TM de 50 ml con 35 ml de YPD caldo, que incluyó: glucosa (Panreac) 20%; extracto de levadura (Bacto TM Yeast Extract) 10%; peptona (Bacto TM Peptone) 20%; maltosa (Bacto TM Maltose) 10%; (CECT, 2004).

Posteriormente, se cambió el medio YPD cada 24 horas, realizando modificaciones en las concentraciones en cada cambio. Las modificaciones diarias incluían una solución de xilosa (Himedia TM d-xylose) al 2% y YPD caldo en proporciones de (1:3), (1:1), (3:1) respectivamente. Finalmente, el medio fue cambiado en su totalidad con xilosa (Himedia TM D-xylose) al 2% y fuente de nitrógeno YNB (Difco TM Yeast Nitrogen Base) al 0,67%. Se dejó incubar a 25 °C durante 48 horas en agitación (Figura 1).

5.8.2.2 CÁLCULO DE UNIDADES FORMADORAS DE COLONIA (UFC)

Se realizaron diluciones seriadas de cada tubo que contenía solo xilosa y YNB. En una cámara de Neubauer se realizó el conteo de levaduras de cada tubo, para llegar a un estándar en cada tubo células por ml. Se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{UFC/ml} = \left(\left(\frac{\# \text{ de células observadas}}{\# \text{ de celdas contadas}} \right) \left(\frac{1}{16} \right) \right) 4 \times 10^6 \text{FD}$$

Donde FD es el factor de dilución; 1/6 es el número de divisiones de las celdas de la cámara y el factor 1×10^6 es el número aproximado de células que se desea obtener por

ml. El volumen calculado, el cual contiene un aproximado de 1×10^6 UFC se inoculó en tubos con 5 ml de los tratamientos establecidos de xilosa.

5.9 CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA PRESICIÓN (HPLC)

Solo los aislados que presentaron campana llena a los siete días en todos los tratamientos fueron sometidos al análisis de HPLC para conocer su producción de etanol. La concentración de xilosa consumida por las levaduras fue obtenida mediante el uso del HPLC. Las condiciones de operación del cromatógrafo fueron las siguientes: fase móvil compuesta de agua grado HPLC o tipo 1 y H_2SO_4 0,005N filtrada al vacío con un filtro Millipore de $0,45 \mu\text{m}$; se utilizó una velocidad de flujo de 0,6 mL/min; temperatura de la columna y detector $79 \text{ }^\circ\text{C}$; volumen de inyección de la muestra $10 \mu\text{L}$; con un tiempo de corrida de 28 min y factor de dilución 1:10 (Bastidas, 2013).

5.9.1 DISEÑO EXPERIMENTAL

De las lecturas obtenidas del cromatógrafo, se tomó el porcentaje de etanol producido por cada aislado y se realizó un análisis factorial sin repeticiones para los tres tratamientos con xilosa (2,5%, 5%, 10%), y posteriormente un post hoc mediante una prueba de Tukey para aislados y tratamientos utilizando el software SPSS ® (Sánchez, 2010).

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 RECUPERACIÓN Y AISLAMIENTO DE LEVADURAS EN INTESTINOS DE ESCARABAJOS

Se encontraron 40 aislados de levaduras en las excretas de 47 escarabajos colectados en dos localidades del Ecuador. En la primera zona, ubicada en la Parroquia Gualea, Provincia de Pichincha, se lograron recuperar 19 aislados en 19 escarabajos. En la segunda zona, ubicada en el Cantón Lumbaquí, Provincia de Orellana, se lograron recuperar 21 aislados en 28 escarabajos. De estos aislados se identificaron 14 diferentes especies de levaduras mediante la secuenciación de la sub unidad D1/D2 del gen ribosómico 26S.

De las 14 especies de levaduras identificadas no se realizó un análisis de biodiversidad por considerarse un estudio de caracterización e identificación, sin embargo como lo señala Unterseher (2011), la cantidad de aislados hallados puede ser superada realizando un segundo estudio en el mismo lugar, debido a que en pequeñas escalas espaciales, como el tracto digestivo de insectos, la diversidad de microorganismos puede ser superior a la de organismos superiores, esta diversidad puede verse influenciada por el método de aislamiento, el medio de cultivo e incluso la identificación. (Suh, 2004).

6.2 CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA

6.2.1 CARACTERIZACIÓN MACROSCÓPICA

En la caracterización de los 40 aislados se observaron tres tipos de bordes recurrentes en los diferentes aislados: entero, rizoide y ondulado; tres tipos de elevaciones: convexa, umbilicada y plana; dos tipos de superficies: lisa y rígida; tres tipos de texturas: butirosa, friable, mucosa; todas las colonias mostraron color blanco con superficies tanto brillantes como opacas (Tabla 1).

Las características observadas fueron constantes dentro de cada especie, a excepción de los siguientes casos: dos aislados de la especie *Candida palmioleophila* (CLQCA 18-12 y CLQCA 18-013), en donde se observaron dos tipos de márgenes, dos tipos de superficie y

dos texturas (entero y ondulado; lisa y rugosa; butirosa y friable respectivamente); dos aislados de *Criptomococcus humicola* (CLQCA 18-011 y CLQCA 18-021) que presentaron textura mucosa y brillante en contraste a la textura disgregable y opaca de los otros aislados de la misma especie; además de un aislado de *Scheffersomyces stipitis* (CLQCA 10-703) que presentó margen rizoide, contextura disgregable, y superficie lisa frente al margen entero, superficie rígida y consistencia butirosa de los demás aislados (Tabla 1).

Estas variaciones interespecíficas de la morfología macroscópica en los aislados puede depender de varios factores: el medio de cultivo en el cual fueron sembradas, el patrón de gemación, el tamaño y la forma de las células en las colonias (van der Klei, Veenhuis, Brul, Klis, De Groot, Müller, van Driel y Boekhout, T. 2011). Incluso se podría hablar de cepas diferentes al presentarse características heterogéneas entre los aislados (Lesk, 2005). Se descarta al medio de cultivo como responsable de las variaciones, ya que se usó YM agar estandarizado.

6.2.2 CARACTERIZACIÓN MICROSCÓPICA

Se presentaron formas globosas, baciliformes, cilíndricas, elongadas, butiforme y ovoides a nivel intra e interespecífico. Además, se registraron gemaciones de tipo monopolar, bipolar y multipolar que variaban en su base (base estrecha y base ancha).

De forma general no existieron variaciones importantes en la forma microscópica entre cada especie, a excepción del aislado CLQCA 10-711 (*Scheffersomyces xylofermentans*) que presentó una forma de bacilo (baciliforme), lo cual concuerda con la descripción de esta especie, hecha por Suh, Houseknecht, Gujjari y Zhou (2013). (Tabla 2).

En cuanto al tamaño celular, los aislados correspondientes a las especies *Candida sinolaborantium* (CLQCA 10-699, CLQCA 18-015, CLQCA 18-018) y *Debaryomyces subglobosus* (CLQCA-18-27) fueron las que menor tamaño presentaron con respecto a los demás aislados. En tanto que los aislados pertenecientes a las especies *Wickerhamomyces pijperi* (CLQCA 18-29, CLQCA 28-31) y *Geotrichum candidum* (CLQCA-10-704) presentaron el mayor tamaño (Tabla 2).

Solamente los aislados pertenecientes a las especies *Trichosporon siamense* (CLQCA-10-702, CLQCA-10-705, CLQCA-10-706, CLQCA-10-707, CLQCA-10-710,

CLQCA-10-715) y *G. candudim* (CLQCA-10-704) mostraron la formación de pseudohifas entre los 7 y 8 días de incubación (Tabla 2).

Las variaciones morfológicas en las células de levaduras se presenta de forma natural, ya sea intra e inter específicamente, debido principalmente a la conformación del citoesqueleto, la estructura y arquitectura de la pared celular, las condiciones ambientales, los antecedentes genéticos y a varios mecanismos de regulación molecular general (Marshall, Young, Swaffer, Wood, Nurse, Kimura, Frankel, Wallingford, Walbot, Qu y Roeder, 2012). La morfología también puede verse afectada por el tipo de reproducción, y en algunos casos puede ser una característica intrínseca de una cepa, especie o género en particular (Kurtzman, Fell, Boekhout y Robert, 2011).

En los aislados del género *Candida* Berkhout (1923) se presentan generalmente formas celulares globosas, elipsoidales, cilíndricas o elongadas. Durante la reproducción asexual (gemación polar holoblástica) pueden presentarse formas ojivales y triangulares (Lachance, Boekhout, Scorzetti, Fell y Kurtzman, 2011). En las dos especies halladas en este estudio, *C. palmioleophila* y *C. sinolaborantium* se encontró concordancia en la forma globosa, se añade también que no se observaron hifas ni pseudohifas.

Dentro del género *Cryptococcus* Vuilemin (1901) se presentan células con formas elipsoidales, ovoides o esferoidales. Su reproducción puede darse de manera multilateral o polar, lo cual se evidenció en los aislados de *C. humicola*, mismos que presentaron gemación polar y multipolar. En este género se pueden o no formar hifas o pseudohifas, y sus colonias presentan color blanco o crema, y rara vez pueden producir pigmentos de color rojo, naranja, amarillo o marrón oscuro. En los aislados recuperados de *C. humicola* no se observaron estas variaciones de color, ni la presencia de hifas verdaderas. Las texturas en este género pueden variar desde butirosa a mucoide (Fonseca, Boekhout y Fell, 2011).

El género *Debaryomyces* Lodder y Kreger-van Rij (1952) presenta, por lo general, una división celular multilateral, sin presencia de pseudohifas o muy poco desarrolladas. La especie aislada *D. subglobosus* concuerda con la descripción en la literatura ya que presentó células pequeñas, sueltas o en pares (Suzuki, Prasand y Kurtzman, 2011).

En el género *Geotrichum* Redhead y Malloch (1977) se presentan normalmente colonias blancas, harinosas o pelúcidas, usualmente secas y formadas por hifas verdaderas. En el aislado CLQCA 10-704 identificado como *G. candidum* no se observó gemaciones, pero se observó la presencia de artroconidios, esto concuerda con la descripción de esta especie, en donde se menciona que además puede presentar hifas expandidas paralelas, a veces con ramificaciones dicótomas entre 7-12 μm , con paredes firmes y ramificaciones laterales que pueden desarticularse tempranamente formando artroconidios cúbicos, como se observó en el aislado recuperado (de Hoog, y Smith, 2011).

Para el género *Kazachstania* Zubkova (1971) se han descrito patrones de gemación multilateral con base estrecha. Además, las células son por lo general esféricas, ovoides o elongadas. No forma hifas verdaderas, y las colonias pueden tener superficie lisa blanca o un poco coloridas (Vaughan-Martini et al., 2011). Los aislados recuperados concuerdan con esta descripción, a excepción de los aislados CLQCA 18-010, CLQCA 18-016, CLQCA 18-030 (*K. serrabonitensis*) y CLQCA 18-026 (*K. saulgeensis*) que presentaron márgenes enteros, y en la descripción hecha por Lopes, C. G. Morais, Uetanabaro, Jacques, Casaregola y Rosa Jackes (2016), y Sarilar, Urien, Perrin, Tinsley, Sicard y Casaregola (2016) para estas dos especies respectivamente, se menciona que ambas especies presentan margen ondulado y estrías débiles. Esto puede deberse a que los registros realizados por los autores se los basó en medios de cultivo de 2 días, mientras que los registros para esta investigación se los hizo a los 8 días de cultivo en agar YM.

El género *Meyerozyma* Kurtzman y M. Suzuki (2010) presenta divisiones multilaterales en la gemación, con base estrecha, y sus células pueden mostrarse desde ovoides hasta elongadas. En los aislados de *M. caribbica* se encontró correspondencia con la literatura al hallar células ovoides de un tamaño inferior a 5 μm . Además las colonias presentaron un color blanco, brillante y butiroso (Kurtzman, 2011).

En el género *Sheffersomyces* Kurtzman y M. Suzuki (2010) las células se caracterizan por presentar divisiones celulares multilaterales con base estrecha, y una forma celular esférica a elongada. Las levaduras pueden formar pseudohifas pero no hifas verdaderas (Kurtzman, 2011a). Esto concuerda con las características de los aislados recuperados de este género, a excepción de la especie *S. xylosifermentans* cuyas características se mencionaron con anterioridad.

En el género *Trichosporon* Behred (1890) se muestran colonias color crema, húmedas o secas, y pueden o no presentar una cubierta harinosa. Se observan hifas verdaderas y arthroconidios abundantes. La especie identificada como *T. siamense* presentó la formación de arthroconidios, lo cual concuerda con las características señaladas en la literatura, además de sus células globosas, cilíndricas a elongadas. Se evidenciaron hifas verdaderas en este estudio para esta especie (Sugita, 2011).

Finalmente, las levaduras del género *Wickerhamomyces* Kurtzman, Rabonett y Basehoar-Powers (2008) presentan gemaciones laterales con base estrecha. Las levaduras pueden ser esféricas, ovoides o elongadas. Los aislados identificados como *W. pijperi* mostraron las mismas características que en la literatura -consistencia butirosa, y color crema- (Kurtzman, 2011c).

Como se aprecia en la Tabla 1, no existieron mayores variaciones intra específicas entre los aislados. Sin embargo, las pocas variaciones presentadas en las colonias se deben a que las células pueden regular su propio tamaño y su propia división celular (Marshall, 2012) en respuesta al entorno donde se desarrollan, y también a su propia dinámica natural influenciada por dicho entorno. Estos procesos de regulación se dan mediante vías de señalización altamente conectadas de cascadas de activación y desactivación de genes. También, algunas quinasas como CDr y CDk, guían el tamaño celular durante la mitosis, y además debe tomarse en cuenta que, a nivel molecular, varios procesos de fosforilación y desfosforilación de proteínas, junto con supresiones de genes generan clases de cepas de diferentes con longitudes y formas modificadas (Nurse, 1975; Nurse, 2008; Hayles y Nurse, 2001, Mosley, 2009). Todos estos procesos pueden ser influenciados directamente por factores de crecimiento como: nutrientes, energía disponible y condiciones medioambientales (Wullschleger, Loewith, y Hall, 2006).

6.3 CARACTERIZACIÓN FISIOLÓGICA (ASIMILACIÓN Y FERMENTACIÓN)

Los resultados de asimilación presentaron variaciones a nivel intra e inter específicos. El azúcar con mayor porcentaje de asimilación fue la glucosa ya que el 92.5% de los aislados lograron asimilarla, solamente los aislados: *C. palmioleophila* (CLQCA 10-696), *T. siamense* (CLQCA 10-707) y *C. humicola* (CLQCA 18-021), no lograron asimilarla.

Por otro lado, el azúcar que presentó menor grado de asimilación fue la lactosa ya que sólo un 15% de los aislados lograron asimilarla, los cuales fueron: *C. palmioleophila* (CLQCA 10-696), *M. caribbica* (CLQCA 10-698), *T. siamense* (CLQCA 10-706), *C. humicola* (CLQCA 18-011), *C. humicola* (CLQCA 18-018), *C. humicola* CLQCA 18-021 (Figura 2).

En cuanto a las demás fuentes de carbono, todos los aislados presentaron diferentes patrones de asimilación, algunos de estos variaron incluso dentro de las mismas especies. Los resultados completos de las pruebas fisiológicas se muestran en las Tablas 3 y 4. En dichas tablas se observan que todos los aislados lograron asimilar al menos una fuente de carbono. Esto se explica porque las levaduras presentan una increíble adaptabilidad fisiológica a ambientes altamente variables, y han desarrollado además la capacidad única de utilizar energía de diferente fuentes de carbono, ya sean azúcares, alcoholes, polialcoholes, aminoácidos, ácidos orgánicos, entre otros (Rodríguez, Ludovico y Leão, 2005).

Las vías del carbono en el metabolismo central son básicamente las mismas en todas las especies de levaduras. Sin embargo, los mecanismos de asimilación, fermentación y respiración difieren sustancialmente, en consecuencia a las levaduras se las considera como un grupo complejo a nivel metabólico así como altamente heterogéneo (Flores, Rodríguez, Petit y Gancedo, 2000; Rodríguez et al., 2005). Esto se evidenció en las pruebas de fermentación, en las cuales se observó que el 55% de los aislados lograron fermentar glucosa en algún nivel (positivo, bajo, lento, débil), siendo el azúcar que mayor porcentaje de fermentación presentó. El resto de aislados no fermentó glucosa. Se registró además que ningún asilado logró fermentar lactosa (Figura 3). Por otro lado solamente los aislados pertenecientes a la especie *M. carabbica* (CLQCA 10-697, CLQCA 10-698) lograron

fermentar rafinosa de forma débil, y junto a los aislados pertenecientes al género *Kazachstania* fueron los únicos que lograron fermentar positivamente sacarosa (Figura 3).

Los aislados pertenecientes a las especies *C. humicola*, *D. subglobosus* y *T. siamense* no registraron fermentación, siendo los aislados con la menor tasa metabólica en este estudio. Sin embargo, estas especies si registraron asimilaciones (solo glucosa para *D. subglobosus*, y para todos los azúcares en *T. siamense*). La fermentación indica asimilación, pero la asimilación de fuentes de carbono no necesariamente significa que la levadura presente metabolismo fermentativo (Kurtzman et al., 2011).

Se encontró ,además, que sólo los aislados pertenecientes al género *Scheffersomyces* lograron fermentar en algún grado D-xilosa y almidón soluble, y solamente los aislados de la especie *S. xylosifermentans* (CLQCA 10-709 y CLQCA10-714) fueron los únicos que presentaron una fermentación positiva para D-xilosa a los 21 días de evaluación. Estos aislados xilofermentadores son el primer registro para el Ecuador. Estos aislados fueron sometidos a pruebas posteriores de fermentación con D-xilosa.

Estos perfiles bioquímicos pueden ser utilizados como información complementaria, pero no pueden ser utilizados para identificaciones taxonómicas por su alta variación inter e intraespecífica, por lo que es fundamental una posterior evaluación molecular para identificar las especies (Barnett, 2004).

6.4 IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR

La caracterización molecular de los 40 aislados, posterior a la digestión realizada por enzimas de restricción HaeIII, HhaI y HinfI (PCR-RFLPs) del ITS, mostró 14 diferentes patrones, mismos que se compararon con diferentes bases de datos, y se agruparon según las especies correspondientes (Anexo 15).

Los espaciadores transcritos internos ITS1 e ITS2 presentan alta variabilidad, principalmente en la región intermedia del gen 5.8S, esto permitió una discriminación a nivel interespecífica, lográndose diferenciar levaduras filogenéticamente cercanas (Kurtzman y

Piskur, 2006). Este fue el caso de los aislados de los géneros *Candida*, *Kazachstania*, y *Scheffersomyces*, en donde se observaron pequeñas variaciones de tamaño en el gen 5.8s (alrededor de 60 pb) y se pudo establecer que se trataban de especies dentro de estos géneros (Anexo 15).

Esta identificación de levaduras mediante la técnica de PCR-RFLPs, se mostró efectiva debido a su reproducibilidad y principalmente a la facilidad para clasificar y comparar patrones con las bases de datos de referencia. Algunos desarrolladores de bases de datos de RFLPs como Zarzoso et al., (1999), recomiendan no tomar en cuenta fragmentos menores a 50pb, ya que no son visualizados con claridad. En este estudio no se registraron fragmentos menores a esa longitud.

Los resultados de RFLPs fueron corroborados con la secuenciación del gen ribosómico 26S, ya que es más precisa la identificación molecular de especies, debido principalmente a que es altamente conservado y pequeñas variaciones pueden distinguir diferentes especies (Martorell, 2005).

En la secuenciación del dominio D1/D2 del segmento 26S del ADN ribosómico, y posterior alineamiento con la base de datos del GenBank del NCBI mediante el motor de comparación BLAST, se encontró correspondencia con 14 especies: *Candida palmioleophila* (5 aislados), *C. sinolaborantium* (3 aislados), *Cryptococcus humicola* (5 aislados), *Debaryomyces subglobosus* (1 aislado), *Geotrichum candidum* (1 aislado), *Kazachstania gamospora* (2 aislados), *Kazachstania saulgensis* (1 aislado), *Kazachstania serrabonitensis* (3 aislados) *Kazachstania yasuniensis* (1 aislado), *Meyerozyma caribbica* (2 aislados), *Scheffersomyces stipitis* (4 aislados), *Scheffersomyces xylosifermentans* (4 aislados), *Trichosporon siamense* (6 aislados) y *Wickerhamomyces pijperi* (2 aislados), con una significación estadística de alineamiento (E-value) de 0.0, una cobertura total de entre 98% - 100%, y una identidad entre 99% - 100%. A excepción de los aislados CLQCA 18-029 y CLQCA 18-031, pertenecientes al género *Wickerhamomyces*, los cuales presentaron una identidad del 96% y 98% respectivamente, lo que indica que podría tratarse de dos nuevas especies (Tabla 5).

Las secuencias consenso que se obtuvieron del gen ribosómico 26S se usaron en la construcción de un árbol filogenético que otorgó un soporte confiable con respecto a las

especies identificadas y las especies utilizadas como referencia. Se mostraron tres clados agrupados en phylum Ascomycota y un solo clado en el phylum Basidiomycota. No se puede hablar de una confiabilidad dentro de los grupos, debido a que el uso de un solo gen, en este estudio, agrupa solamente a levaduras en phyla cercanos (Figura 4). Esto se logra solamente realizando un análisis de múltiples genes si se quiere obtener mayor congruencia al discriminar un grupo de otro (Kurtzman et al., 2006).

En la construcción del árbol filogenético, el modelo de likelihood puede ser utilizado para reconstruir relaciones entre secuencias separadas en una línea temporal, tal es el caso de Ascomycota y Basidiomycota, dado que puede corregir los múltiples eventos de mutaciones en las secuencias (Marck y Lewis, 2003).

6.5 ÍNDICE DE ABUNDANCIA E ÍNDICE DE ESPECIALIZACIÓN DE LAS ESPECIES DE LEVADURAS ENCONTRADAS

El índice calculado para las especies encontradas en este estudio, mostró que el 64,28% de las especies colectadas tienen un alto grado de especialización, al obtener un valor de $S_i=1$. Este fue el caso de *D. subglobosus*, *G. candidum*, *K. gamospora*, *K. saulgensis*, *K. serrabonitensis*, *M. caribbica*, *S. xylosifermentans*, *W. pijperi* y *T. siamense* (Tabla 6), las especies restantes mostraron una tendencia generalista intermedia al ser encontrados en un máximo de tres ecosistemas de siete posibles y tres sustratos de 10 posibles. La curva de adaptabilidad muestra una relación inversamente proporcional entre el índice de abundancia y el índice de especialización (Figura 5).

En el Ecuador, el 67% de los aislados conservados en la CLQCA muestran un S_i de entre 0,92 y 0,53, lo que significa que fueron aislados en un máximo de tres de los siete ecosistemas y un máximo de tres de los nueve sustratos. En este estudio un 29% de los aislados mostraron un S_i intermedio entre 0,18 y 0,47, lo que se traduce a que estas especies de levaduras se encontraron en un máximo de seis ecosistemas diferentes y seis sustratos diferentes. Finalmente, solo cuatro especies (4%) mostraron un S_i muy bajo, entre 0,02 y 0,11, lo que indica que estas especies fueron encontradas hasta en siete ecosistemas y nueve sustratos analizados, estas especies se consideran como las más generalistas, por lo tanto, tienen un grado de adaptabilidad mayor (Tabla 6) (Carvajal et al., 2011).

Este modelo logra una aproximación matemática hacia la distribución ecológica de las levaduras y puede ser utilizado para todos los microorganismos en general. La cantidad de sustratos y ecosistemas manejados en cada estudio depende del criterio de colecta de cada colección de cultivos.

6.6 EVALUACIÓN DE AISLADOS FERMENTADORES DE XILOSA

Los 8 aislados pertenecientes al género *Scheffersomyces* presentaron capacidades fermentativas en medios de xilosa como única fuente de carbono. Las especies identificadas dentro de este género fueron: *S. stipitis* y *S. xylofermentans*.

Solo la producción de etanol de la especie *S. xylofermentans* fue evaluada mediante el uso del cromatógrafo (Anexo 9) por ser sus aislados los únicos que mostraron fermentación positiva dentro de los primeros 3 días de evaluación al someterlos a los tres tratamientos.

El aislado CLQCA 10-713, identificado como *S. xylofermentans* fue identificado como el mejor productor de etanol luego de realizar un ANOVA y obtener un valor de 5,22. El análisis Post Hoc indica que la mejor producción de etanol se dio en los aislados CLQCA 10-713 y CLQCA 10-714. El primero produjo 0.565% (p/v) de alcohol en el tratamiento con 5% de xilosa, mientras que el segundo produjo 0.41% (p/v) de alcohol en el tratamiento con 10% de xilosa. Por otro lado, el aislado CLQCA 10-711 mostró una producción intermedia, y el aislado CLQCA 10-709 presentó la producción más baja. Además el test de Tukey mostró que no existió una diferencia significativa entre tratamientos (Tabla 7).

El hallazgo de *S. xylofermentans* resulta de mucha relevancia para este estudio, debido a que el descubrimiento y descripción de esta se lo realizó en 2013 por Suh et al., y hasta actualidad no se han publicado estudios concernientes a sus potenciales usos biotecnológicos. Los autores de esta especie mencionan que además de sus capacidades xilofermentadoras, esta levadura tiene una ventaja, y es la capacidad de crecer en temperaturas superiores a los 40 °C, lo cual añade interés a esta especie.

En 2016 el equipo conformado por Senatham, Chamduang, Kaewchingduang, Thammasittirong, Srisodsuk, Elliston, Roberts, Waldron y Thammasittirong reportaron una

cepa silvestre de *S. shehatae* capaz de producir 11,92 g/L (1,19% -p/v-) bajo condiciones similares, lo cual contrasta con el rendimiento presentado por los aislados recuperados en este estudio. Este bajo rendimiento puede deberse a que normalmente las levaduras sufren de un fenómeno llamado represión de la glucosa cuando la fuente de carbono se halla en altas concentraciones. También se puede deber a una baja tolerancia al etanol, y susceptibilidad a diversos inhibidores. Estos problemas han limitado su potencial biotecnológico, lo que ha impulsado esfuerzos para mejorar sus propiedades. Desde el descubrimiento de las primeras levaduras xilofermentadoras hace 30 años se han usado una combinación de métodos clásicos moleculares para mejorar la producción de etanol, y aunque se han desarrollado cepas mejoradas, el rendimiento de etanol de xilosa no ha igualado el rendimiento de la levadura fermentativa tradicional *Saccharomyces cerevisiae*. (Harner, Wen, Bajwa, Austin, Ho, Habash, Trevors y Lee, 2014; Liang et al., 2013). A pesar de aquello este hallazgo es de gran importancia para la ciencia en el Ecuador, ya que estimula en la investigación en el uso de especies xilofermentadoras en la producción de biocombustibles a partir de residuos ligno-celulósicos.

7 CONCLUSIONES

- Es la primera vez que se explora de manera no invasiva en el intestino de los escarabajos, sin embargo se considera que el número de especies halladas es alto, en comparación con otras colectas realizadas en la CLQCA. Si se realizan estudios similares futuros hay un alto potencial de encontrar especies nuevas y aún sin describir.
- A pesar de no ser una herramienta taxonómica, la evaluación fisiológica debe realizarse siempre y de manera extensiva, en lo posible ampliando el espectro de evaluación (diferentes fuentes de carbono, fuentes de nitrógeno y otros) para obtener perfiles fisiológicos que muestren posibles nuevos usos que se le pueden dar a las levaduras.
- Utilizando técnicas de identificación rápidas como ITS-RFLPs se logró identificar varias especies mediante la comparación con bases de datos. Sin embargo, solo con el secuenciamiento del gen 26S se reveló la existencia de dos posibles especies no descritas del género *Wicherhamomyces*. Esto muestra que ambas técnicas son complementarias.
- La presencia de levaduras con la capacidad de fermentar xilosa en los intestinos de escarabajos muestra que las levaduras alcanzan altos grados de especialización, lo que fue demostrado mediante el cálculo del índice de abundancia (I_a) y el índice de especialización (S_i). Este trabajo, en conjunto con los realizados en la CLQCA, da luz sobre el estado de adaptación de las levaduras en el país.
- El hallazgo de especies capaces de fermentar xilosa es una oportunidad para realizar investigación sobre sus aplicaciones en biorrefinería, y el posible mejoramiento genético de los aislados hallados.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aanen, D. K., de Fine Licht, H. H., Debets, H. H., Kerstes, N. G., Hoekstra, R. F. y Boomsma, J. J. (2009). High symbiont relatedness stabilizes mutualistic cooperation in fungus-growing termites. *Science*, 326, 1103–1106.
- Abdel-Azeem, A. M. (2010). The history, fungal biodiversity, conservation, and future perspectives for mycology in Egypt. *IMA Fungus*, 1(2), 123–142.
- Amato, P., Doyle, S. M. y Christner, B. C. (2009). Macromolecular synthesis by yeasts under frozen conditions. *Environmental Microbiology*, 11(3), 589 – 596.
- Bandoni, R. (1995). Dimorphic heterobasidiomycetes: taxonomy and parasitism. *Studies in Mycology*, 38, 13-27.
- Beijerinck, M. W. (1889). L'auxanographie ou la méthode de l'hydrodiffusion dans la gélatine appliquée aux recherches microbiologiques. *Archives Néerlandaises des Sciences Exactes et Naturelles*, 23, 367–372.
- Benjamin, R. K., Blackwell, M., Chapella, I., Humber, R. A., Jones, K. G., Klepzig, K. A. y Lichtwardt, R. W. (2004). The search for diversity of insects and other arthropod associated fungi. En G. M. Mueller, G. F. Bills, y M. S. Foster (eds.), *Biodiversity of fungi Inventory and monitoring methods*, (pps:395 – 433). Elsevier Academic Press, San Diego, California, USA.
- Barnett, J.A. (2004). “A History of Research on Yeast 8: Taxonomy”. *Yeast*, 21(14), 1141-1193.
- Bastidas, B. (2013). Sacarificación y Fermentación Simultánea (SSF) de raquis de palma africana (*Elaeis guineensis*) pretratado con ácido y álcali para la producción de etanol de segunda generación (Disertación de pregrado). Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito-Ecuador.

- Blackwell, M. (2011). The fungi: 1, 2, 3 ... 5.1 million species? *American Journal of Botany*, 98(3), 426–438.
- Boekhout, T. (2005). Gut feeling for yeasts. *Nature*, 434, 449 – 451
- Boekhout, T., Fonseca, A., Sampaio, J. P., Bandoni, R. J., Fell, J. W. y Kwon-Chung, K. J. (2011). Discusión of Teleomorphic and Anamorphic Basidiomycetous Yeast. En C. Kurtzman, J. Fell y T. Boekhout, *The yeast: A taxonomic Study* (pp. 3-5). USA: Elsevier
- Boundy-Mills, K. L., Glantschnig, E., Roberts, I. N., Yurkov, A., Casaregola, S., Daniel, H. y Turchetti, B. (2016). Yeast culture collections in the twenty- first century: new opportunities and challenges. *Yeast*, (Special Issue), 1-12
- Buzzini P. y Vaughan-Martini A, E. (2005). Yeast biodiversity and biotechnology. En C. Rosa y G. Peter (eds) *Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts* (pp.533-559). Godalming: Springer-Verlag.
- Buzzini, P., Branda, E., Goretti, M. y Turchetti, B. (2012). Psychrophilic yeasts from worldwide glacial habitats: diversity, adaptation strategies and biotechnological potencial. *Federation of European Microbiological Societies*, 82(2), 217-241. doi: 10.1111/j.1574-6941.2012.01348.
- Carvajal, J., Portero, P., Tufiño, C., Bastidas, B., Guamán-Burneo, C., Freitas, L. y Rosa, C. (2011). En: O. Grillo (ed), *Biodiversity-The Dynamic Balance of the Planet*. InTech, (pps: 193-232).
- Cai, J., Roberts, L. N. y Collins, M. D. (1996). Phylogenetic relationships among members of the ascomycetous yeast genera *Brettanomyces*, *Debaryomyces*, *Dekkera* and *Kluyveromyces* deduced by small-subunit rRNA gene sequences. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 46(2), 542-549.
- Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) (base de datos en línea). España: Universitat de València, 2004. Disponible en: <http://www.uv.es/uvweb/coleccion-espanola->

cultivos-tipo/es/cect/catalogo-cepas/medios-cultivo/buscador-medios-1285893135114.html?pagename=CECT%2FPage%2FTPGGenerica&cid=1285893135114&locale=es_ES&site=CECT&p2=YPD&p2=and&p2= (fecha de consulta: 25 de febrero del 2016)

- Cimerman, N., Sonjak, S., Zalar, P., Frisvad, J., Diderichsen, B., y Plemenitas, A. (2003). Extremophilic fungi in arctic ice: a relationship between adaptation to low temperature and water activity. *Elsevier Physics and Chemistry of Earth*, 28 (28-32), 1273-1274.
- Daniel, H. M., Lachance, M. A. y Kurtzman, C. P. (2014). On the reclassification of species assigned to *Candida* and other anamorphic ascomycetous yeast genera based on phylogenetic circumscription. *Antonie van Leeuwenhoek*, 106(1), 67–84.
- Davies, J. S. y Westlake, D. (1979). Crude oil utilization by fungi. *Canadian Journal of Microbiology*, 25 (2), 146–156.
- Davis, T. S. (2015). The Ecology of Yeasts in the Bark Beetle Holobiont: A Century of Research Revisited. *Microbial Ecology*
- de Hoog, G. y Smith, M. (2011). *Galactomyces Redhead* y *Malloch* (1977). En C. Kurtzman, J. Fell y T. Boekhout, *The yeast: A taxonomic Study* (pp. 413-420). USA: Elsevier
- de Llanos, R., Fernandez, T. y Querol, A. (2004). Identification of species of the genus *Candida* by analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacer. *Antonie van Leeuwenhoek*, 85(3), 175-185.
- Deak, T. (1993). Simplified techniques for identifying foodborne yeast. *International Journal of Food and Microbiology*, 19, 15-26.
- Enache-Soare, S., Pelinescu, D., Ionescu, R., Avram, I., Stoica, I. y Vassu-Dimov T. (2008). Molecular Identification of some yeast strain involved in oral candidosis. *Romanian Biotechnological Letters*, 14(1), 4180-8186.

- Farfán, M. (2015). Biología Molecular Aplicada al Diagnóstico Clínico. *Revista Médica Clínica Condes*, 26(6): 788-793.
- Farrell, A. E., Plevin, R. J., Turner, B. T., Jones, A. D., O'Hare, M. y Kammen, D. M. (2006). Ethanol can contribute to energy and environmental goals. *Science*, 311, 506-508.
- Fell, J. W., Boekhout, T., Fonseca, A., Scorzetti, G. y Statzell-Tallman, A. (2000). Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeasts as determined by large-subunit rDNA D1/D2 domain sequence analysis. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50 (3), 1351-1371.
- Fell, J. W., Scorzetti, G. Connell, L. y Craig, S. (2006). Biodiversity of micro-eukaryotes in Antarctic Dry Valley soils with 0,5% soil moisture. *Soil Biology and Biochemistry*, 38(10), 3107–3119.
- Flegel, T. (1977). Let`s call a yeast a yeast. *Canadian Journal of Microbiology*, 23, 945-946.
- Flores, C. L., Rodriguez, C., Petit, T. y Gancedo, C. (2000). Carbohydrate and energy-yielding metabolism in non-conventional yeasts. *FEMS Microbiology Reviews*, 24(4), 507–529
- Fonseca, A., Boekhout, T. y Fell, J. W. (2011) *Cryptococcus* Vuillemin (1901). En C. Kurtzman, J. Fell, y T. Boekhout, *The yeast: A Taxonomic Study* (pp. 1661-1669). USA: Elsevier.
- González-Hernández, J. C. y Peña, A. (2002). Estrategias de adaptación de microorganismos halófilos y *Debaryomyces hanseii*. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 44(3-4), 137-156.
- Guadet, J., Julien, J., Lafey, J. F. y Brygoo, Y. (1989). Phylogeny of some *Fusarium* species, as determined by large subunit rRNA sequence comparison. *Molecular Biology Evolution*, 6(3), 227–24.

- Harner, N. K., Wen, X., Bajwa, P. K., Austin, G. D., Ho, C. Y., Habash, M. B., ... Lee, H. (2015). Genetic improvement of native xylose-fermenting yeasts for ethanol production. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 42(1), 1–20.
- Harrington, T. C., Fraedrich, S. W. y Aghayeva, D. N. (2008). *Raffaelea lauricola*, a new ambrosia beetle symbiont and pathogen on the Lauraceae. *Mycotaxon*, 104(2), 399 – 404.
- Hayles, J. y Nurse P. (2001). A journey into space. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2(9), 647–656.
- Hoag, H. (2010). Confronting the biodiversity crisis. *Nature Reports Climate Change*, 4, 51–54.
- Hawksworth, D., Crous, P., Redhead, S., Reynolds, D-R., Samson, R., Seifert, K., Taylor, J., Wingfield, M., Aime, C., Ahmet, A., Bai, F., de Beer, W., Begerow, D., Berikten, D., Boekhout, T., Buchanan, P., Burgess, T., Buzina, W., Cai, L., Cannon, Crane, J., Damm, U., Daniel, H-M., van Diepeningen, A., Druzhinina, I., Dyer, P., U., Eberhardt, U., Fell, J., Frisvad, J., Geiser, D., Geml, F., Glienke, C., Gräfenhan, T., Groenewald, J., Groenewald, J., de Gruyter, J., Guého-Kellermann, E., Guo, L., Hibbett, D., Hong, S-B., de Hoog, G., Houbraken, J., Huhndorf, S., Hyde, K., Ismail, A., Johnston, P., Kadaifciler, D., Kirk, P., Kõljalg, U., Kurtzman, K., Lagneau, P-E., Lévesque, C., Liu, X., Lombard, L., Meyer, M., Miller, A., Minter, D., Najafzadeh, M., Norvell, L., Ozerskaya, S., Öziç, R., Pennycook, S., Peterson, S., Quaedvlieg, W., Robert, V., Ruibal, C., Schnürer, J., Schroers, H-J., Shivas, R., Slippers, B., Spierenburg, H., Takashima, M., Taşkın, E., Thines, M., Thrane, U., Uztan, A., van Raak, M., Varga, J., Vasco, A., Verkley, S., Videira, S., de Vries, R., Weir, B., Yilmaz, N., Yurkov, A. y Zhang, N. (2011). The Amsterdam Declaration on Fungal Nomenclature David, *IMA Fungus*, 2(1), 105-112.
- Hoekman, S. K. (2009). Biofuels in the U.S.: challenges and opportunities, *Renewal Energies*, 34(1), 14-22.

- Huffman, J.L., Molina, F. y Jong, S. (1992). Authentication of ATCC strains in the *Saccharomyces cerevisiae* complex by PCR fingerprinting. *Experimental Mycollogy*, 16(4), 316-319.
- Jacques, N., Sarilar, V., Urien, Ch., Lopes, M. R., Morais, C. G., Uetanabaro, A. T., Tinsley, C., Rosa, C., Sicard, D. y Casaregola, S. (2017). Three novel ascomycetous yeast species of the *Kazachstania* clade, *Kazachstania saulgeensis* sp . *Kazachstania australis* sp. nov. Reassignment of *Candida humilis* to *Kazachstania humilis* f .a. comb. nov. and *Candida pseudohumilis* to *Kazachstania pseudohumilis* f.a. comb. Nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66(12), 5192–5200.
- James, S. A., Collins, M. D. y Roberts, L. N. (1996). Use of an rRNA internal transcribed spacer region to distinguish phylogenetically closely related species of the genera *Zygosaccharomyces* and *Torulaspora*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 46(1), 189-194.
- Jefferies, T. W. (1985). *Trends of Biotechnology*, 3(8), 208-212
- Johnson, E. A. 2013a. Biotechnology of non-Saccharomyces yeasts—the ascomycetes. *Applications in Microbiology and Biotechnology*, 97(2), 503–517.
- Johnson, E. A. 2013b. Biotechnology of non-Saccharomyces yeasts—the basidiomycetes. *Applications in Microbiology and Biotechnology*, 97(4), 7563–7577.
- Kumar S., Stecher G., and Tamura K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33(7), 1870-1874.
- Kurtzman, C. P. y Robnett, C. J. (1998). Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie van Leeuwenhoek*, 73(4), 331– 371.

- Kurtzman, C. P. (1992). rRNA sequence comparisons for assessing phylogenetic relationships among yeast. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 42(1), 1-6.
- Kurtzman, C. P. (1993). Systematics of the ascomycetous yeasts assessed from ribosomal RNA sequence divergence. *Antonie Leeuwenhoek*, 63(2), 165-174.
- Kurtzman, C. P. (2006). Detection, identification and enumeration methods for spoilage yeasts. En: C. De and W. Blackburn (eds), *Food Spoilage Microorganisms* (pp. 28–54). Cambridge: Woodhead Publishing.
- Kurtzman, C. P. (2011c). *Wickerhamomyces* Kurtzman, Robnett y Basehoar-Poers (2008). En C. Kurtzman, J. Fell, y T. Boekhout, *The yeast: A taxonomic Study* (pp. 899-917). USA: Elsevier
- Kurtzman, C. P., Boekhout, T., Robert, V., Fell, J. W. y Deak, T. (2003). Methods to identify yeasts. En: T. Boekhout y V. Robert (eds), *Yeasts in Food: Beneficial and Detrimental Aspects* (pp. 69–121). Hamburg: Behrs-Verlag.
- Kurtzman, C. P. y Fell, J. W. (1998). *The Yeast. A taxonomic Study*. Cuarta Edición. Elsevier Science, B. V., The Netherlands.
- Kurtzman, C. P., Fell, J. W. y Boekhout. T. (2011). Definition, Clasification and Nomenclature of the Yeast. En C. Kurtzman, J. Fell y T. Boekhout, *The yeast: A taxonomic Study* (pp. 3-5). USA: Elsevier
- Kurtzman, C. P., Fell, J. W., Boekhout, T. y Robert, V. (2011). Methods for Isolation, Phenotypic Characterization and Maintenance of Yeast. En C. Kurtzman, J. Fell, y T. Boekhout, *The yeast: A taxonomic Study* (pp. 87-107). USA: Elsevier
- Kurtzman, C. P. y Fell, J. W. (2006). Yeast systematics and phylogeny – implications of molecular identification methods for studies in ecology. En: C. Rosa y G. Peter (eds), *Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts* (pp. 11–30). Berlin: Springer-Verlag.

- Kurtzman, C. P. y Robnett, (C. J.) (1998). Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie van Leeuwenhoek*, 73(4), 331–371.
- Kurtzman, C.P. (2006). Yeast species recognition from gene sequence analyses and other molecular methods. *Mycoscience*, 47(2), 65–71.
- Kurtzman, C.P. (2011b). *Scheffersomyces* Kurtzman y M. Suzuki (2010). En C. Kurtzman, J. Fell, y T. Boekhout, *The yeast: A taxonomic Study* (pp. 773-777). USA: Elsevier
- Kurtzman, C. P. (2011a). *Meyerozyma* Kurtzman y M. Suzuki (2010). En C. Kurtzman, J. Fell, y T. Boekhout, *The yeast: A taxonomic Study* (pp. 621-614). USA: Elsevier
- Lachance, M. A., Dobson, J. D., Wijayanayaka, N. y Smith, A. M. (2010). The use of parsimony network analysis for the formal delineation of phylogenetic species of yeasts: *Candida apicola*, *Candida azyma*, and *Candida parazyza* sp. nov., cosmopolitan yeasts associated with floricolous insects. *Antonie van Leeuwenhoek*, 97(2), 155 – 170.
- Lachance, M., Boekhout, T., Sorzetti, G., Fell, J. W. y Kurtzman, C. P. (2011). *Candida* Berkhout (1923). En C. Kurtzman, J. Fell, y T. Boekhout, *The yeast: A Taxonomic Study* (pp. 987-995). USA: Elsevier.
- Lesk, A. (2005). Database Annotation in Molecular Biology: Principles and Practice. Wiley Ed. The Pennsylvania State University. USA. Pág.: 107-108.
- Li, W., Hartung, J. S. y Levy, L. (2006). Quantitative real-time PCR for detection and identification of *Candidatus Liberibacter* species associated with citrus huanglongbing. *Journal of Microbiological Methods*, 66(1), 104-115.
- Liang, M., Kim, M., He, Q. y Wang., J. (2013) Improving bioethanol production by *Scheffersomyces stipitis* using retentostat extractive fermentation at high xylose concentration. *Biochemical Engineering Journal*, (121), 171–180. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2017.02.006>

- Libkind, D. (2008). Biodiversidad de Levaduras y su Caracterización Molecular. Curso Teórico Práctico. Centro Neotropical para Investigación de la Biomasa. Pontificia Universidad Católica del Ecuador. pp: 44.
- Libkind, D., Brizzio, S., Ruffini, A., Gadanho, M., Van Brook, M. y Sampaio, J. (2003). Molecular characterization of carotenogenic yeasts from aquatic environments in Patagonia, Argentina. *Antonie van Leeuwenhoek*, 84(4), 313-318.
- Lichtwardt, R. W. y Williams, M. C. (1999). Three Harpellales that live in one species of aquatic chironomid larva. *Mycologia*, 91, 396-399.
- Lin, X. y Heitman, J. (2005). Chlamyospore formation during hyphal growth in *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot. Cell*, 4(10), 1746–1754.
- Little, A. F. y Currie, C. R. (2007). Symbiont complexity: Discovery of a fifth symbiont in the attine ant–microbe symbiosis. *Biology Letters*, 5(3), 501 – 504.
- Mark, H. y Lewis, P. (2003). Phylogeny Estimation: Traditional and Bayesian Approaches. *Nature Reviews/Genetics*, 4(4), 275-284.
- Marshall, W. F., Young, K. D., Swaffer, M., Wood, E., Nurse, P., Kimura, A., Frankel, J., Wallingford, J., Walbot, V., Qu, X. y Roeder, A. (2012). What determines cell size? *BMC Biology*, 1(1), 101
- Martorel, P. (2005). Desarrollo y aplicación de sistemas rápidos para la detección, identificación y caracterización de levaduras alterantes de alimentos. Departamento de Biotecnología. Universidad de Valencia.
- Martorell, P., Barata, A., Malfeito-Ferreira, M., Fernández-Espinar, M. T., Loureiro, V. y Querol, A. (2006). Molecular typing of the yeast species *Dekkera bruxellensis* and *Pichia guilliermondii* recovered from wine related sources. *International Journal of Food Microbiology*, 106(1), 79-84.

- Mitchison, C. (1971). Induction synchrony in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Experimental Cell Research*, 67(2), 368-374. doi: 10.1016/0014-4827(71)90421-6.
- Molina, F., Inoue, T. y Jong, S. (1992). Ribosomal DNA restriction analysis reveals genetic heterogeneity in *Saccharomyces cerevisiae* Meyen ex Hansen. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 42(3), 499-502.
- Mora, C., Tittensor, D. P., Adl, S, Simpson, A. y Worm, B. (2011). How many species are there on Earth and in the ocean? *PLoS Biol*, 8(9), e1001127.
- Morais, P, Pagnocca, F. y Rosa, C. (1994). Yeast Communities in Tropical Rain Forests in Brazil and other South American Ecosystems. En: C. Rosa y G. Peter (eds) *Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts* (pp. 461-462). Godalming: Springer-Verlag.
- Morris, P. J., Johnson, W. R., Pisanic, J., Bossart, G. D., Adams, J., Reif, J. S. y Fair, P. A. (2010). Isolation of culturable microorganisms from free-ranging bottle nose dolphins (*Tursiops truncatus*) from the southeastern United States. *Veterinary Microbiology*, 148(2), 10-16.
- Mosley, A. L., Florens, L., Wen, Z. y Washburn, M. P. (2009). A label free quantitative proteomic analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* nucleus. *Journal of Proteomics*, 72(1), 110-120.
- Murdoch, M. E., Reif, J. S., Mazzoil, M., McCulloch, S. D., Fair, P. A. y Bossart, G. D. (2008). Lobomycosis in bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) from the Indian River Lagoon, Florida: Estimation of prevalence, temporal trends, and spatial distribution. *EcoHealth*, 5(3), 289 – 297.
- Nurse P. (1975). Genetic control of cell size at cell division in yeast. *Nature*, 256, 547–551.
- Nurse, P. (2008). Life, logic and information. *Nature*, 454(7203), 424-426.

- Ochoa, J. y Vázquez, R. (2004). Las levaduras marinas como herramientas científicas y biotecnológicas. *Centro de investigaciones Biológicas del Noroeste, Mexico. Número especial I: 39-50.*
- Olson, N. D. y Morrow, J. B. (2012). DNA extract characterization process for microbial detection methods development and validation. *BMC Research Notes*, 5(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-5-668>
- Perlack, R. D., Wright, L. L., Turhollow, A. F., Graham, R. L., Stokes, B. J. y Erbach, D. C. (2005). Biomass as feedstock for a bioenergy and bioproducts industry: the technical feasibility of a billion-ton annual supply. Recuperado de https://www1.eere.energy.gov/bioenergy/pdfs/final_billionton_vision_report2.pdf
- Purvis, A. y Hector, A. (2000). Getting the measure of biodiversity. *Nature*, 405(6783), 212-219.
- Robert, V., Stalpers, J. Boekhout, T. y Tan, S. H. (2006). Yeast biodiversity and culture collections. En C. Rosa y P. Gábor (eds.), *Biodiversity and ecophysiology of yeasts*, (pp.31 – 44). Berlin- Germany: Springer-Verlag.
- Roberts, I. y Oliver, S. (2010). The Yin and Yang of Yeast: Biodiversity Research and Systems Biology as Complementary Forces Driving Innovation in Biotechnology. *Biotechnology Letters*, 33(3), 477-487
- Rodríguez, F., Ludovico, P. y Leão, C. (2006) Sugar Metabolism in Yeasts : an Overview of Aerobic and Anaerobic Glucose Catabolism, En: G. Péter,y C. Rosa, (eds.), *Biodiversity and Ecophysiology of Yeast* (pp. 101-121). Berlin-Heidelberg: Springer.
- Sánchez, J. (2006). Introducción al diseño experimental. Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Edit. Quality Print. Ecuador
- Senatham, S., Chamduang, T., Kaewchingduang, Y. y Thammasittirong, A. (2016). Enhanced xylose fermentation and hydrolysate inhibitor tolerance of

- Scheffersomyces shehatae* for efficient ethanol production from non - detoxified lignocellulosic hydrolysate. *SpringerPlus*, 5(1), 1-8.
- Schmid, U., Giesel, H., Schoberth, S. M. y Sahn, H. (1986). *Thermoanaerobacter finnii* spec. nov., a New Ethanogenic Sporogenous Bacterium. *Systematic and Applied Microbiology*, 8(1-2), 80-85.
- Schüßler, A., Schwarzott, D. y Walker, C. (2001). A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. *Mycological Research*, 105(12), 1413--1421.
- Scorzetti, G., Fell, J.W., Fonseca, A. y Statzell-Tallman, A. (2002). Systematics of basidiomycetous yeasts: a comparison of large sub-unit D1D2 and internal transcribed spacer rDNA regions. *FEMS Yeast Research*, 2(4), 495–517.
- Stajich, J. E., Berbee, M. L., Blackwell, M., Hibbett, D. S., Timothy, Y., Spatafora, J. W. y Taylor, J. W. (2009). The Fungi. *Current Biology*, 19(18), 840-845. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2009.07.004>
- Starmer, W. T., Aberdeen, V. y Lachance, V. (2006). The biogeographic diversity of cactophilic yeasts. En C. Rosa y P. Gábor (eds.), *Biodiversity and ecophysiology of yeasts*, (pp. 486–499). Berlin, Germany: Springer-Verlag.
- Sugita, T. (2011). *Trichosporon* Behred (1890). En C. Kurtzman, J. Fell, y T. Boekhout, *The yeast: A taxonomic Study* (pp. 2015-2061). USA: Elsevier
- Suh S. O., Houseknecht J. L., Gujjari, P. y Zhou J. J. (2013). *Scheffersomyces parashehatae* f.a., sp. nov., *Scheffersomyces xylosifermentans* f.a., sp. nov., *Candida broadrunensis* sp. nov. and *Candida manassasensis* sp. nov., novel yeasts associated with wood-ingesting insects, and their ecological and biofuel implicat. *International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology*, 63(1), 4330–4339.
- Suh, S. O., McHugh, J. V. y Blackwell, M. (2004). Expansion of the *Candida tanzawaensis* yeast clade: 16 novel *Candida* species from basidiocarp-feeding beetles.

International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 54(6), 2409 – 2429.

Suh, S. O., McHugh, J. V., Pollock, D. y Blackwell, M. (2005). The beetle gut: A hyperdiverse source of novel yeasts. *Mycological Research*, 109(3), 261 – 265.

Suzuki, M., Prasad, G. y Kurtzman, C. P. (2011) *Debaryomyces* Lodder y Kreger-van Rij (1952). En C. Kurtzman, J. Fell, y T. Boekhout, *The yeast: A Taxonomic Study* (pp. 361-372). USA: Elsevier.

Tamura K. and Nei M. (1993). Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution*, 10(3), 512-526.

Tedeschi, R. y De Paoli (2011). Collection and preservation of frozen microorganisms. En: J. Dilner (eds), *Methods in Biobanking, Methods in Molecular Biology*. (pp. 313-326). Springer

Tehler, A., Little, D. P. y Farris, J. S. (2003). The full-length phylogenetic tree from 1551 ribosomal sequences of chitinous fungi. *Mycological Research*, 107(8) 901–916.

Tscharke, R. L., Lazera, M., Chang, Y. C., Wickes, B. L. y Kwon-Chung, K. J. (2003). Haploid fruiting in *Cryptococcus neoformans* is not mating type alpha-specific. *Fungal Genetics and Biology*, 39 (3), 230-237.

Unterseher, M., Jumpponen, A. R. I. y Maarja, O. (2011). Species abundance distributions and richness estimations in fungal metagenomics. *Lessons learned from community ecology*, 20(2), 275–285.

Urbina, H., Schuster, J. y Blackwell, M. (2013). The gut of Guatemalan passalid beetles: a habitat colonized by cellobiose- and xylose-fermenting. *Fungal Ecology*, 6(5), 339–355.

- Valente, P., Gouveia, F., de Lemos, G., Pimente, D., van Elsas, J.D., Mendona-Hagler, L.C. y Hagler, A.N. (1996). PCR amplification of the rDNA internal transcribed spacer region for differentiation of *Saccharomyces* cultures. *FEMS Microbiology Letters*, 137(2-3), 253-256.
- van der Klei, I., Veenhuis, M., Brul, S., Klis, F., De Groot, P., Müller, W. van Driel, K. G. A. y Boekhout, T. (2011). Cytology, Cell Walls and Septa: A Summary of Yeast Cell Biology from a Phylogenetic Perspective. En C. Kurtzman, J. Fell, y T. Boekhout, *The Yeast: A Taxonomic Study* (pp. 111-118). USA: Elsevier
- van der Vossen, J. M., Rahaoui, H., de Nus M. W. y Hartog, B. J. (2003). PCR methods for tracing and detection of yeasts in the food chain. En: T. Boekhout y V. Robert (eds), *Yeasts in Food: Beneficial and Detrimental Aspects* (pp. 123–138). Hamburg: Behrs-Verlag.
- Vaughan-Martini, A., Lachance, M. y Kurtzman, C. P. (2011). *Kazachstania* Zubkova (1971). En C. Kurtzman, J. Fell, y T. Boekhout, *The yeast: A taxonomic Study* (pp. 439-470). USA: Elsevier.
- Vincent, R., Kurtzman, C. P., Fell, J. W. y Boekhout, T. (2011). Methods for isolation, phenotypic characterization and maintenance of yeasts . En C. Kurtzman, J. Fell, y T. Boekhout, *The Yeasts: A Taxonomic Study* (pp. 89-97). USA: Elsevier.
- Vishniac, H.S. (2006). Yeast biodiversity in the Antarctic. En C. Rosa y P. Gábor (eds.), *Biodiversity and ecophysiology of yeasts* (pp. 419–440). Berlin-Germany: Springer Verlag.
- Wolf, K. (2012). *Nonconventional Yeasts in Biotechnology: A Handbook*. Springer-Verlag: Godalming; 619.
- Wullschlegel, S., Loewith, R. y Hall, M. N. (2006). TOR signaling in growth and metabolism. *Cell*, 124(3), 471-484.

- Wyder, M. y Puhán, Z. (1997). A rapid method for identification of yeast from kefir at species level. *Microbiologia*, 52(6), 327-330.
- Wyman, C. E. y Hinman, N. D. (1990). Ethanol: Fundamentals of Production from Renewable Feedstocks and Use as a Transportation Fuel. *Applications in Biochemistry and Biotechnology*, 24(25), 735-753.
- Zarzoso, B., Belloch, C., Uruburu, F. y Querol, A. (1999). Identification of yeast by RFLPs analysis of the 5.8 S RNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 78(1), 87-89.
- Zhenming, C. H. I., Zhiqiang, L. I. U., Lingmei, G. A. O., Fang, G., Chunling, M. A., Xianghong, W. y Haifeng, L. I. (2006). Marine Yeasts and Their Applications in Mariculture, *Journal of Ocean University of China*, 5(3), 251–256.

9. FIGURAS

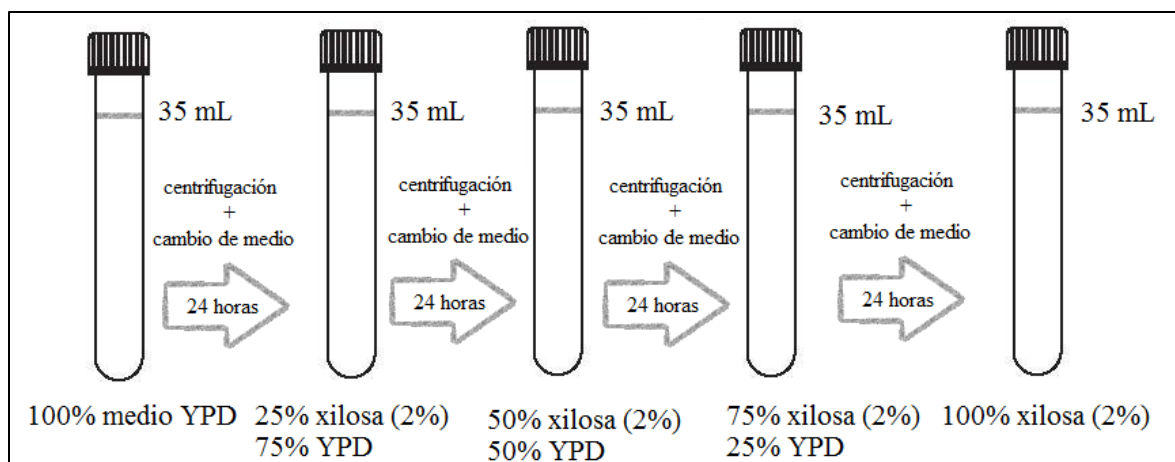


Figura 1: Esquema de la obtención de biomasa para pruebas fisiológicas

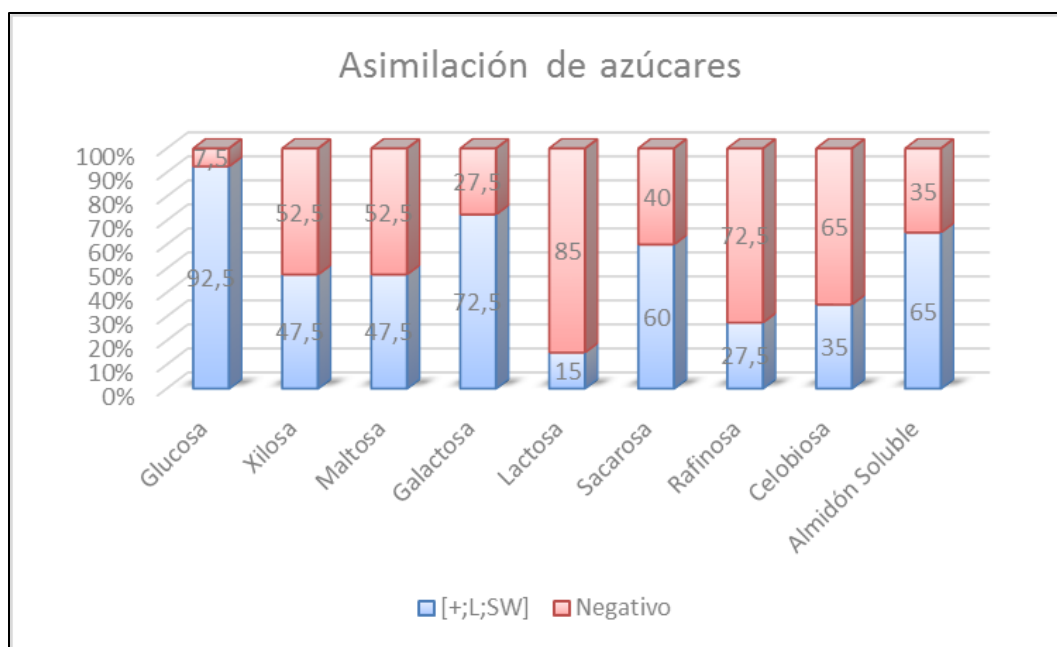


Figura 2: Porcentajes de asimilación que presentó cada azúcar. En azul se muestran todos los niveles de asimilación, y en rojo las asimilaciones negativas. +=positivo; L: bajo; S: lento:

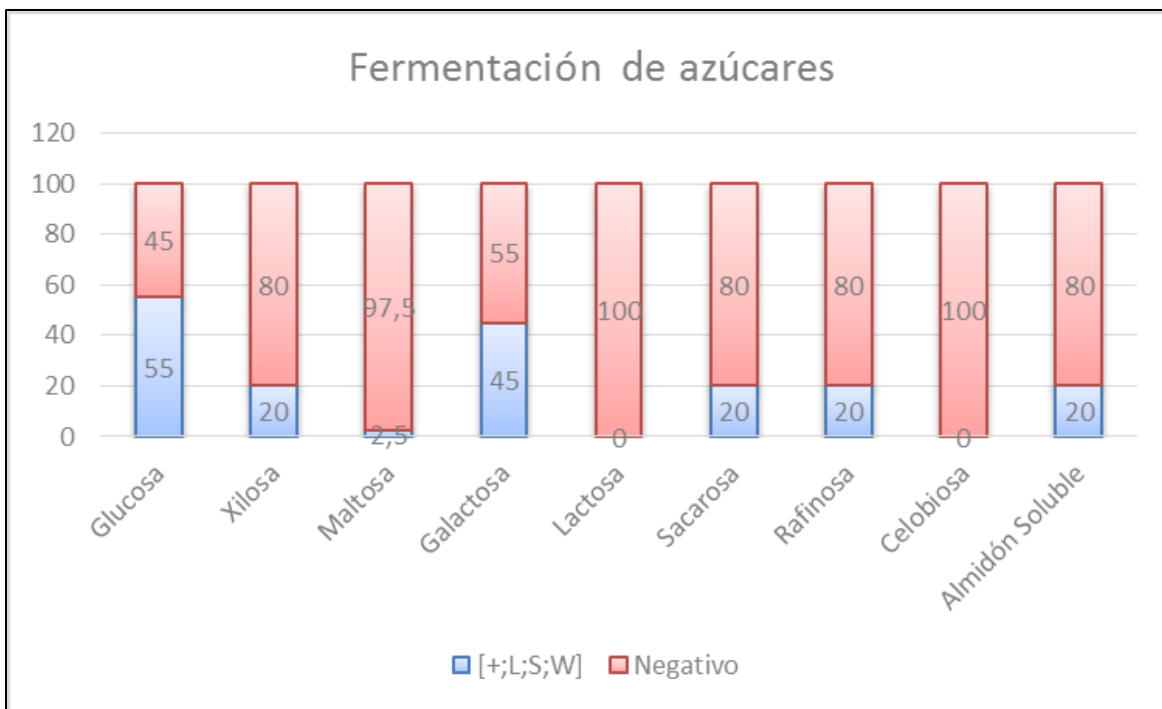


Figura 3: Porcentaje de fermentación que presentó cada azúcar. En azul se muestran todos los niveles de asimilación, y en rojo los registros negativos. +=positivo; L: bajo; S: lento:

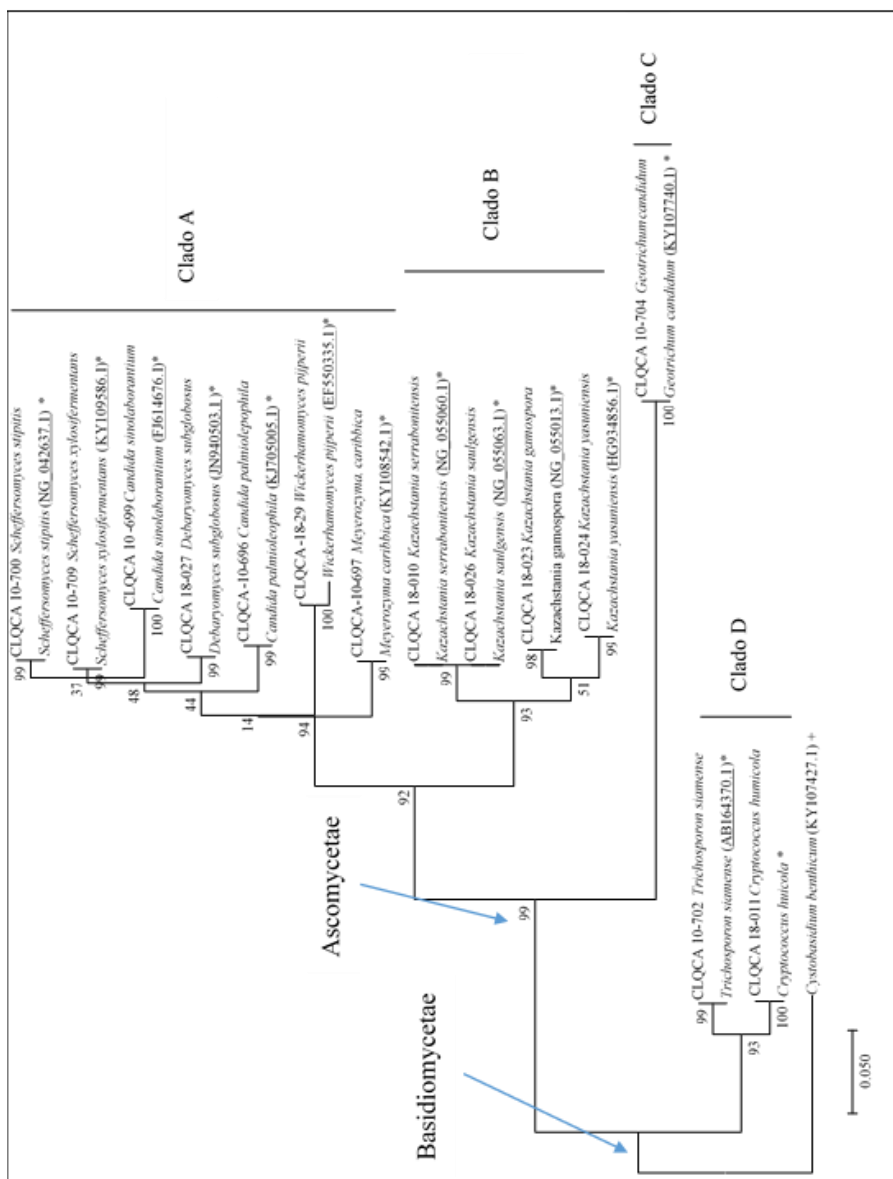


Figura 4. Árbol filogenético formado a partir de las secuencias obtenidas del dominio D1/D2 del segmento 26S del ARN ribosomal de las 14 especies identificadas. La nomenclatura muestra en (*) la especie de referencia; entre paréntesis el código de acceso en GenBank; el grupo externo está representado por *Cystobasidium benthamicum* (+). Se muestran los valores bootstrap; la escala representa 5% de distancia.

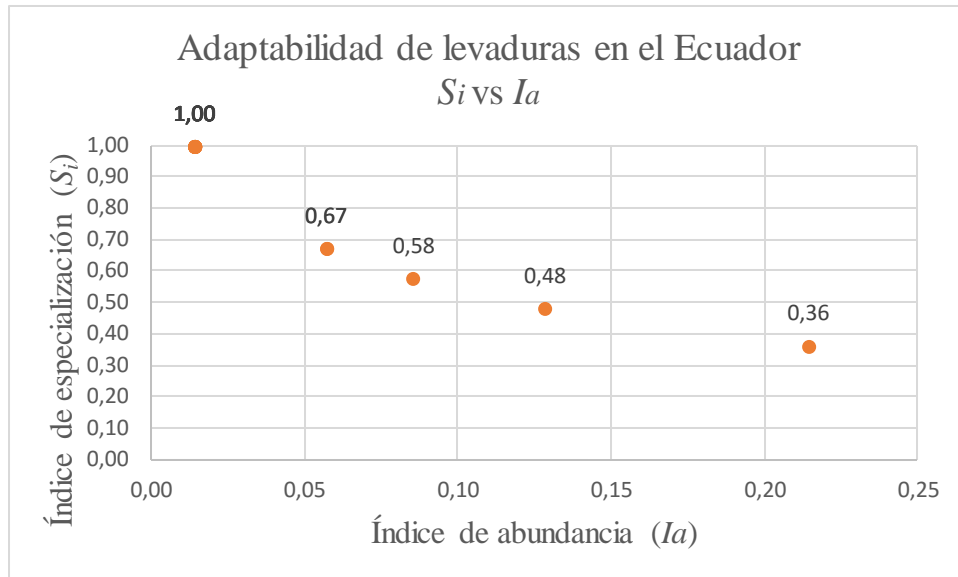


Figura 5. Curva de adaptabilidad de las especies de levaduras en el Ecuador (incluidas cuatro islas de Galápagos)

10. TABLAS

Tabla 1: Características morfológicas de las colonias recuperadas luego de siete días a 25 °C.

Especie/Número de aislados	Margen	Elevación	Superficie	Textura	Color	Brillo
<i>Candida palmioleophila</i> (5)	Entero (1) Ondulada (4)	Convexa	Lisa (3) Rugosa (2)	Butirosa (3) Friable (2)	Blanco	Brillante (1) Opaco (4)
<i>Candida sinolaborantium</i> (3)	Entero	Umbilicada	Lisa	Butirosa	Blanca	Brillante
<i>Cryptococcus huimcola</i> (5)	Entero	umbilicada	Lisa	Mucosa (2) Friable (3)	Blanca	Brillante (2) Opaca (3)
<i>Debaryomyces subglobosus</i> (1)	Entero	Convexa	Lisa	Butirosa	Blanca	Brillante
<i>Geotrichum candidum</i> (1)	Rizoide	Convexa	Rígida	Friable	Blanca	Opaco
<i>Kazachstania gamospora</i> (2)	Entero	Umbilicada	Lisa	Butirosa	Blanca	Brillante
<i>Kazachstania saulgensis</i> (1)	Entero	Convexa	Lisa	Butirosa	Blanca	Brillante
<i>Kazachstania serrabonitensis</i> (3)	Entero	Convexa	Lisa	Friable	Blanca	Brillante

(continuación)

<i>Kazachstania yasuniensis</i> (1)	Entero	Convexa	Lisa	Butirosa	Blanca	Brillante
<i>Meyerozyma caribbica</i> (2)	Entero	Umbilicada	Lisa	Butirosa	Blanca	Brillante
<i>Scheffersomyces stipitis</i> (4)	Rizoide (1) Entero (3)	Convexa	Rígida (1) Lisa (3)	Friable (1) Butirosa (3)	Blanca	Opaco
<i>Scheffersomyces xylosifermentans</i> (4)	Entero	Convexa	Rígida	Butirosa	Blanca	Brillante
<i>Trichosporon siamense</i> (6)	Rizoide	Convexa	Rígida	Friable	Blanca	Opaco
<i>Wickerhamomyces pijperi</i> (2)	Ondulada	Plana Convexa	Lisa	Butirosa	Blanca	Brillante

Tabla 1: Características morfológicas de las colonias recuperadas luego de siete días a 25 °C.

Tabla 2: Características morfológicas microscópicas de las especies identificadas

Especie/Número de aislados	Forma	Tamaño μm	Gemación	Base	Hifas
<i>Candida palmioleophila</i> (5)	Globosa	4x5	Monopolar(2) Multipolar (3)	Estrecha	No
<i>Candida sinolaborantium</i> (3)	Globosa	3x3	Monopolar	Estrecha	No
<i>Cryptococcus huimcola</i> (5)	Ovoide (1)/ Elongada (4)	3x6/4x10	Multipolar (1) Monopolar (2) Bipolar (2)	Estrecha (2) Ancha (2)	No
<i>Debaryomyces subglobosus</i> (1)	Globosa	3x3	Multipolar	Estrecha	No
<i>Geotrichum candidum</i> (1)	Butiforme	5x12	Monopolar	Ancha	Pseudo

(continuación)

<i>Kazachstania gamospora</i> (2)	Globosa	5x5	Monopolar	Estrecha/Ancha	No
<i>Kazachstania saulgensis</i> (1)	Globosa	5x7	Multipolar	Ancha	No
<i>Kazachstania serrabonitensis</i> (3)	Globosa	5x6	Multipolar	Estrecha	No
<i>Kazachstania yasuniensis</i> (1)	Ovoide	5x10	Multipolar	Estrecha	No
<i>Meyerozyma caribbica</i> (2)	Ovoide	6x10	Multipolar	Estrecha	No
<i>Scheffersomyces stipitis</i> (4)	Globosa	4x4/5x5	Multipolar (1) Bipolar (2)	Estrecha (1) Ancha (3)	No
<i>Scheffersomyces xylosifermentans</i> (4)	Globosa(3) Basiliforme(1)	4x2/4x10	Monopolar (2) Multipolar (1)	Ancha (1) Estrecha (4)	No
<i>Trichosporon siamense</i> (6)	Cilíndrica	4 * 12	Monopolar (2) Multipolar (4)	Ancha	Pseudo
<i>Wickerhamomyces pijperi</i> (2)	Cilíndrica	5x15	Monopolar	Ancha	No

Tabla 2: Características morfológicas de las colonias recuperadas luego de siete días a 25 °C.

Tabla 3: Perfiles de asimilación de azúcares aislados de los intestinos de los escarabajos. Los resultados fueron evaluados durante 21 días a 25 °C

Especie/Número de aislados	Glucosa	Xilosa	Maltosa	Galactosa	Lactosa	Sacarosa	Rafinosa	Celobiosa	Almidón soluble
<i>Candida palmioleophila</i> (5)	L/-	+/L/ W/-	L/W /-	+/L/S/ W	L/-	+/W/-	W/ -	L/-	+/L/S/ W/-
<i>Candida sinolaborantium</i> (3)	+/L	-/S	-/W	+/L/S	-	+/W/-	-	W/-	W/-
<i>Cryptococcus huimcola</i> (5)	+/S/ W/-	S/-	W/-	+/L/S/ -	+/L/ W/-	S/W/-	W/ -	W/-	W/S/-
<i>Debaryomyces subglobosus</i> (1)	L	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Geotrichum candidum</i> (1)	L	-	-	L	-	-	-	-	L
<i>Kazachstania gamospora</i> (2)	+	W	-	-	-	+	+	-	W/-

(continuación)

<i>Kazachstania saulgensis</i> (1)	+	-	-	+	-	+	+	-	-
<i>Kazachstania serrabonitensis</i> (3)	+	-	-	+	-	+	+	W/-	W/-
<i>Kazachstania yasuniensis</i> (1)	+	-	-	+	-	-	-	-	W
<i>Meyerozyma caribbica</i> (2)	+	-	S/L	+	W/-	+	+	-	W/-
<i>Scheffersomyces stipitis</i> (4)	+/L	L/S	+/L/ S	+/L	-	+/-	-	+/L/-	+/L
<i>Scheffersomyces xylofermentans</i> (4)	+	+/L/ S	+/L/ S/-	+/L/S	-	+/W/-	-/S	L/S/ W	+/S
<i>Trichosporon siamense</i> (6)	+/L/ S/W /-	+/W /-	S/W /-	L/-	L/-	L/W/ -	-	L/W /-	L/S/W/ -
<i>Wickerhamomyces pipperi</i> (2)	+/L	-	-	+/-	-	-	-	-	W/-

Tabla 3: Perfiles de asimilación de azúcares aislados de los intestinos de los escarabajos. Los resultados fueron evaluados durante 21 días a 25 °C

Tabla 4: Perfiles de fermentación de azúcares aislados de los intestinos de los escarabajos. Los resultados fueron evaluados durante 21 días a 25 °C

Especie/Número de aislados	Glu	Xil	Mal	Gal	Lac	Sac	Raf	Cel	Alm
<i>Candida palmioleophila</i> (5)	L/-	+/L/ W/-	L/W /-	+/L/S/ W	L/-	+/W/-	W/-	L/-	+/L/S/ W/-
<i>Candida sinolaborantium</i> (3)	+/L	-/S	-/W	+/L/S	-	+/W/-	-	W/-	W/-
<i>Cryptococcus huimcola</i> (5)	+/S/ W/-	S/-	W/-	+/L/S/ -	+/L/ W/-	S/W/-	W/-	W/-	W/S/-
<i>Debaryomyces subglobosus</i> (1)	L	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Geotrichum candidum</i> (1)	L	-	-	L	-	-	-	-	L
<i>Kazachstania gamospora</i> (2)	+	W	-	-	-	+	+	-	W/-
<i>Kazachstania saulgensis</i> (1)	+	-	-	+	-	+	+	-	-

(continuación)

<i>Kazachstania serrabonitensis</i> (3)	+	-	-	+	-	+	+	W/-	W/-
<i>Kazachstania yasuniensis</i> (1)	+	-	-	+	-	-	-	-	W
<i>Meyerozyma caribbica</i> (2)	+	-	S/L	+	W/-	+	+	-	W/-
<i>Scheffersomyces stipitis</i> (4)	+/L	L/S	+/L/ S	+/L	-	+/-	-	+/L /-	+/L
<i>Scheffersomyces xylosifermentans</i> (4)	+	+/L/ S	+/L/ S/-	+/L/S	-	+/W/-	-/S	L/S /W	+/S
<i>Trichosporon siamense</i> (6)	+/L/ S/W /-	+/W /-	S/W /-	L/-	L/-	L/W/ -	-	L/ W/-	L/S/W/ -
<i>Wickerhamomyces pijperi</i> (2)	+/L	-	-	+/-	-	-	-	-	W/-

Tabla 6: Perfiles de fermentación de azúcares aislados de los intestinos de los escarabajos. Los resultados fueron evaluados durante 21 días a 25 °C

Tabla 5. Resumen del análisis de los productos de PCR del dominio D1/D2 del segmento 26S del RNA ribosómico de los aislados. Valores obtenidos del cotejamiento con la base de datos del NCBI mediante el motor BLASTn.

Código asignado	Especie	E-value	Porcentaje de identidad	Código de Acceso GenBank
CLQCA-10-696	<i>Candida palmioleophila</i>	0.0	100%	KJ705005.1
CLQCA-10-697	<i>Meyerozyma caribbica</i>	0.0	99%	KY108542.1
CLQCA-10-698	<i>Meyerozyma caribbica</i>	0.0	99%	KY108542.1
CLQCA-10-699	<i>Candida sinolaborantium</i>	0.0	99%	FJ614676.1
CLQCA-10-700	<i>Scheffersomyces stipitis</i>	0.0	99%	JQ025392.1
CLQCA-10-701	<i>Scheffersomyces stipitis</i>	0.0	100%	NG_042637.1
CLQCA-10-702	<i>Trichosporon siamense</i>	0.0	99%	AB164370.1
CLQCA-10-703	<i>Scheffersomyces stipitis</i>	0.0	100%	JQ025392.1

(continuació n...)

CLQCA-10-704	<i>Geotrichum candidum</i>	0.0	100%	KY107740.1
CLQCA-10-705	<i>Trichosporon siamense</i>	0.0	99%	AB164370.1
CLQCA-10-706	<i>Trichosporon siamense</i>	0.0	100%	AB164370.1
CLQCA-10-707	<i>Trichosporon siamense</i>	0.0	99%	AB164370.1
CLQCA-10-709	<i>Scheffersomyces xylofermentans</i>	0.0	100%	KY109586.1
CLQCA-10-710	<i>Trichosporon siamense</i>	0.0	99%	AB164370.1
CLQCA-10-711	<i>Scheffersomyces xylofermentans</i>	0.0	99%	KY109586.1
CLQCA-10-712	<i>Scheffersomyces stipitis</i>	0.0	100%	JQ026364.1
CLQCA-10-713	<i>Scheffersomyces xylofermentans</i>	0.0	99%	KY109586.1
CLQCA-10-714	<i>Scheffersomyces xylofermentans</i>	0.0	100%	KY109586.1
CLQCA-10-715	<i>Trichosporon siamense</i>	0.0	99%	AB164370.1
CLQCA-18-010	<i>Kazachstania serrabonitensis</i>	0.0	99%	NG_055060.1
CLQCA-18-011	<i>Cryptococcus humicola</i>	0.0	99%	KY110010.1
CLQCA-18-012	<i>candida palmioleophila</i>	0.0	100%	KJ705005.1
CLQCA-18-013	<i>Candida palmioleophila</i>	0.0	100%	KJ705005.1
CLQCA-18-015	<i>Candida sinolaborantium</i>	0.0	99%	KM065905.1
CLQCA-18-016	<i>kazachstania serrabotinensis</i>	0.0	99%	NG_055060.1
CLQCA-18-017	<i>candida palmioleophila</i>	0.0	100%	KJ705005.1

(continuación)

CLQCA-18-018	<i>Cryptococcus humicola</i>	0.0	99%	KY110010.1
CLQCA-18-019	<i>candida palmioleophila</i>	0.0	100%	KJ705005.1
CLQCA-18-020	<i>Cryptococcus humicola</i>	0.0	99%	KY110010.1
CLQCA-18-021	<i>Cryptococcus humicola</i>	0.0	99%	KY110010.1
CLQCA-18-022	<i>Cryptococcus humicola</i>	0.0	99%	KY110010.1
CLQCA-18-023	<i>Kazachstania gamospora</i>	0.0	100%	KY107921.1
CLQCA-18-024	<i>Kazachstania yasuniensis</i>	0.0	100%	HG934856.1
CLQCA-18-025	<i>Kazachstania gamospora</i>	0.0	100%	NG_055013.1
CLQCA-18-026	<i>Kazachstania saulgeensis</i>	0.0	100%	NG_055063.1
CLQCA-18-027	<i>Debaryomyces subglobosus</i>	0.0	100%	JN940503.1
CLQCA-18-028	<i>Candida sinolaborantium</i>	0.0	100%	KM065905.1
CLQCA-18-029	<i>Wickerhamomyces pijperi</i>	0.0	96%	AB449695.1
CLQCA-18-030	<i>Kazachstania serrabonitensis</i>	0.0	99%	NG_055060.1
CLQCA-18-031	<i>Wickerhamomyces pijperi</i>	0.0	98%	EF550335.1

Tabla 7. Resumen del análisis de los productos de PCR del dominio D1/D2 del segmento 26S del RNA ribosómico de los aislados. Valores obtenidos del cotejamiento con la base de datos del NCBI mediante el motor BLASTn

Tabla 6. Incidencia de especies de levaduras colectadas en diferentes ecosistemas y diferentes sustratos en Ecuador (incluidas 4 islas de Galápagos) y cálculo de I_a y S_i .

Lista de especies

	Amazonía	Costa	Sierra	Isla Floreana	Isla isabela	Isla San Cristóbal	Isla Santa Cruz	Incidencia en ecosistemas	sustratos colonizados	índice de abundancia (I_a)	Índice de especialización (I_e)
<i>Candida palmioleophila</i>	1	0	1	0	0	0	0	2	2	0,06	0,67
<i>Candida sinolaborantium</i>	0	0	1	1	0	0	1	3	5	0,21	0,36
<i>Cryptococcus humicola</i>	1	0	1	0	0	0	1	3	3	0,13	0,48
<i>Debaryomyces subglobosus</i>	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0,01	1,00
<i>Geotrichum candidum</i>	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0,01	1,00
<i>Kazachstania gamospora</i>	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0,01	1,00
<i>Kazachstania saulgensis</i>	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0,01	1,00
<i>Kazachstania serrabonitensis</i>	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0,01	1,00
<i>Kazachstania yasuniensis</i>	1	1	1	0	0	0	0	3	2	0,09	0,58
<i>Meyerozima caribbica</i>	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0,01	1,00
<i>Scheffersomyces stipitis</i>	1	0	0	0	1	0	0	2	2	0,06	0,67
<i>Scheffersomyces xylosifermentans</i>	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0,01	1,00
<i>Trichosporon siamense</i>	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0,01	1,00
<i>Wickerhamomyces pijperi</i>	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0,01	1,00

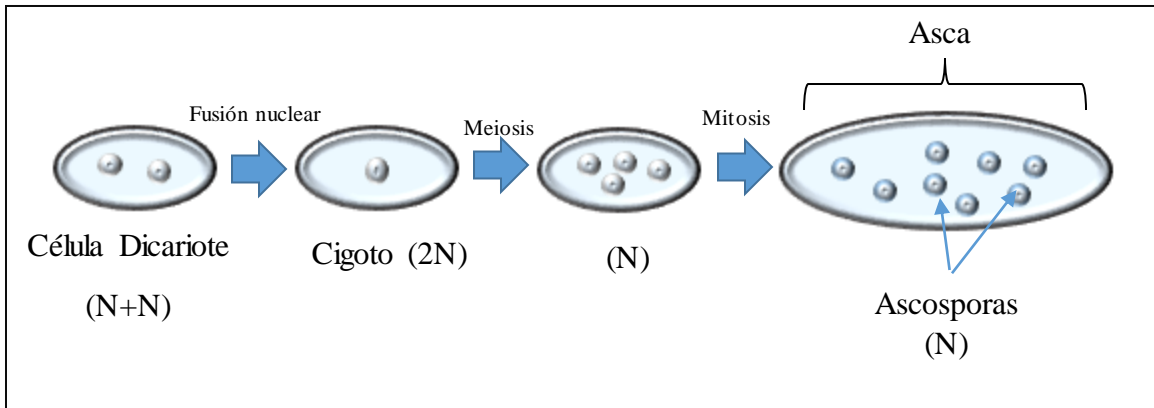
Tabla 7. Análisis estadístico de los porcentajes (g/L) obtenidos de la cromatografía (HPLC)

ANOVA de los aislados				
Variable dependiente: Datos				
Aislados	Media	Error	95% Confidence Interval	
			Límite inferior	Límite superior
CLQCA 10-709	3,603	,199	3,186	4,021
CLQCA 10-711	,593	,199	,176	1,011
CLQCA 10-713	5,227	,199	4,809	5,644
CLQCA 10-714	4,740	,199	4,322	5,158

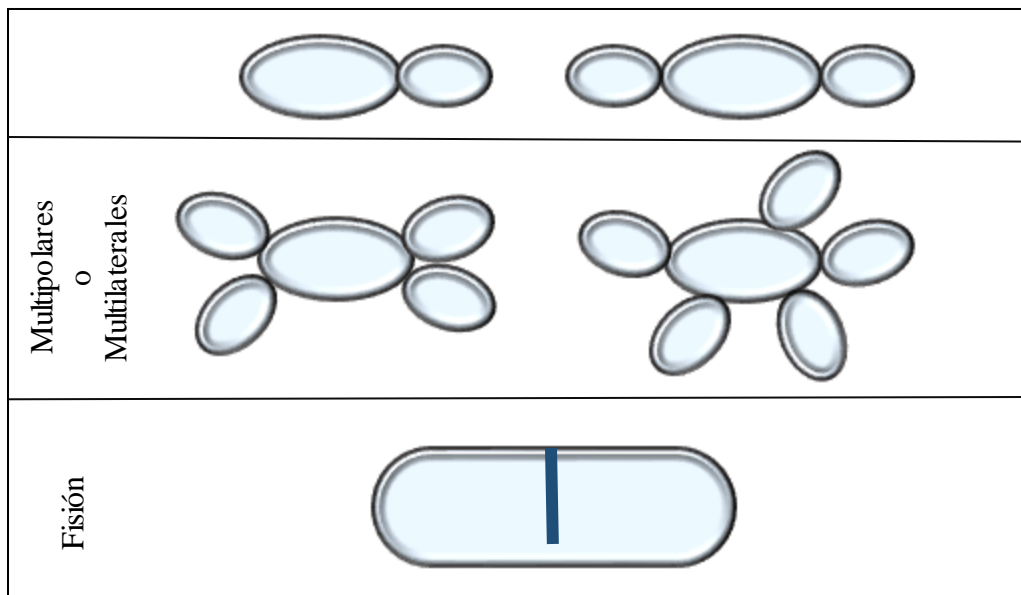
Post Hoc entre Aislados				
Tukey HSD ^{a,b}				
Aislados	N	Subconjunto		
		1	2	3
CLQCA 10-709	6	.5933		
CLQCA 10-711	6		3.6033	
CLQCA 10-713	6			4.7400
CLQCA 10-714	6			5.2267
Sig.		1,000	1,000	,337

Post Hoc entre Tratamientos		
Tukey HSD ^{a,b}		
Tratamientos	N	Subconjunto
		1
2,5%	8	3.2400
5%	8	3.6650
10%	8	3.7175
Sig.		,151

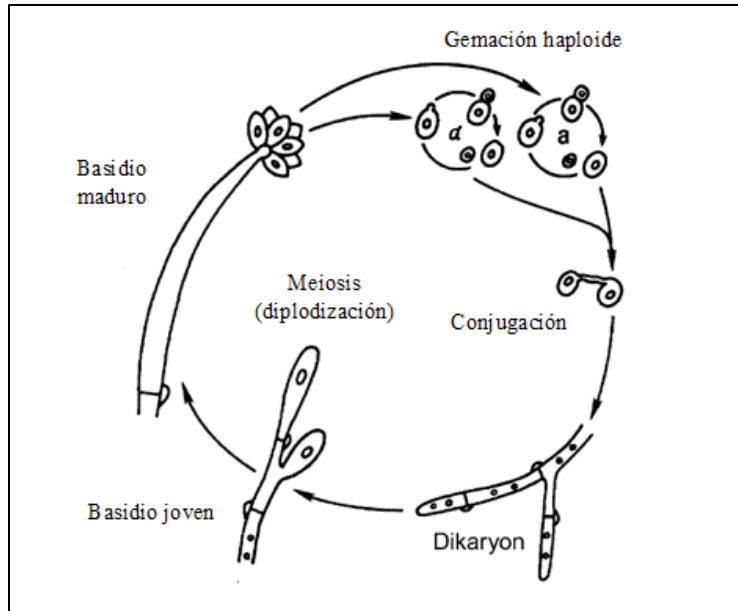
11. ANEXOS



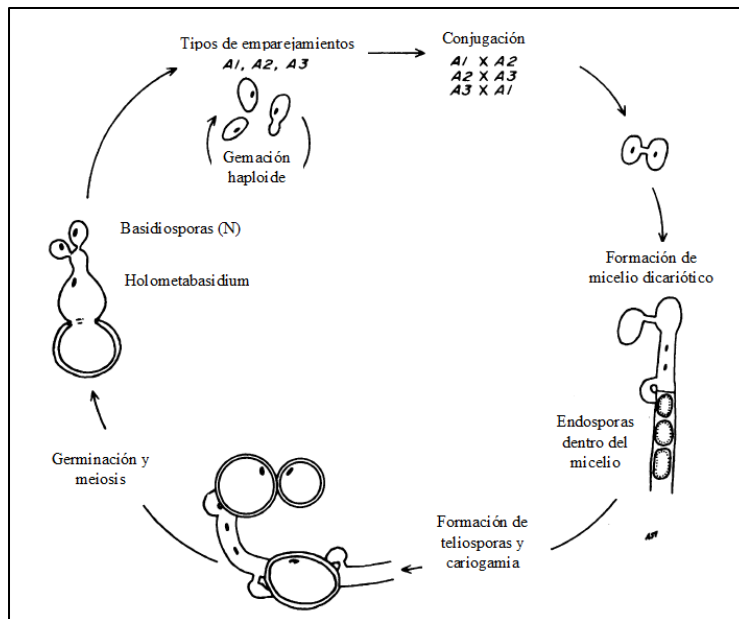
Anexo 1: Proceso de formación de ascosporas en levaduras Ascomicetas teleomorfas



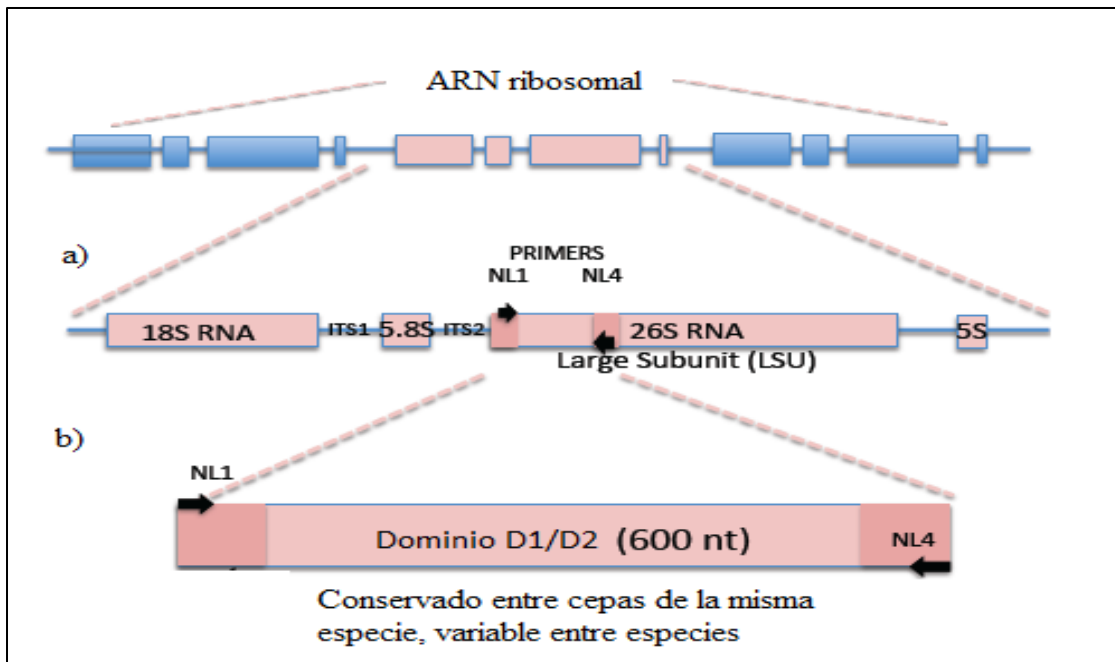
Anexo 2: Tipos de división celular en levaduras Ascomicetas anamorfas.











Anexo 3: Formación de esporas externas sobre un basidio en levaduras basidiomicetas, alternado con un estado unicelular con gemación haploide (a), un estado diploide (d) y un estado hifal dicariótico.



Anexo 4: Origen del estado anamorfo haploide mediante la germinación de basidiosporas haploides.



Anexo 5: Esquema de las regiones del ADN ribosomal utilizadas para la identificación molecular de levaduras. (a) Se representan los espaciadores de transcripción interna ITS1 e ITS2 entre los genes 18S, 5,8S y 26S, se utilizaron primers ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (b) Dominio de la sub unidad larga (LSU) utilizado en la identificación de especies de levaduras. Se observan los primers NL1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAC-3') y NL4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3').

MARGEN					
	ENTERA	ONDULADA	LOBADA	RIZOIDE	
ELEVACIÓN					
	PLANA	CÓNCAVA	CONVEXA	UMBILICADA	
SUPERFICIE	LISA	RUGOSA	PLEGADA	RÍGIDA	FILAMENTOSA
BRILLO	BRILLANTE	OPACA			
TEXTURA	MUCOSA	BUTIROSA	FRIABLE		
COLOR	AMARILLA	BLANCA	CREMA	ROSADA	ROJA

Anexo 6: Características morfológicas macroscópicas de aislamientos purificados de 7 días. Utilizadas en la Colección de Levaduras Quito-Católica (CLQCA) para su catalogación.



Anexo 7: Escarabajo de la familia Passalidae



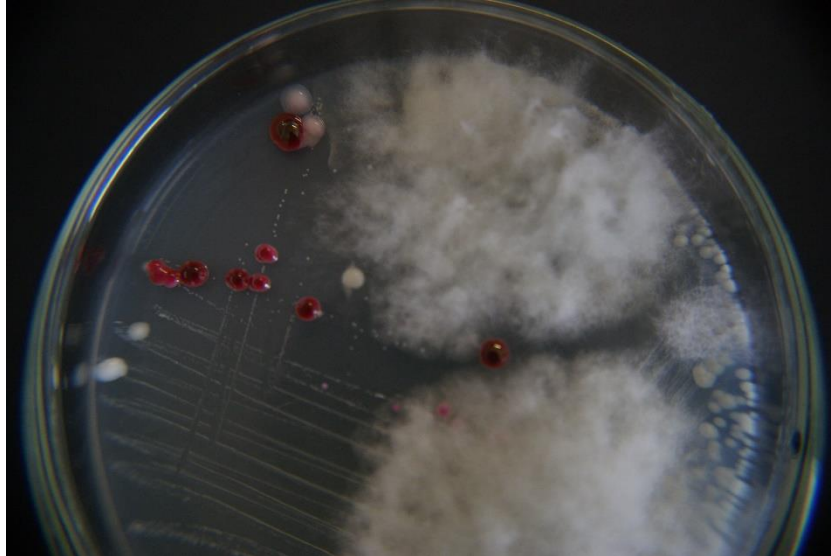
Anexo 8: Zonas de colecta. Se realizaron en las estribaciones de la cordillera de los Andes.



Anexo 9: Obtención de las excretas de los escarabajos en cajas estériles in situ.











Anexo 10: Inoculación de excretas en YPD (yeast peptone dextrose) caldo. Se incubaron por 72 horas.



Anexo 11: Identificación de posibles colonias de levaduras. Se confirmaron las colonias mediante observaciones en microscopio.

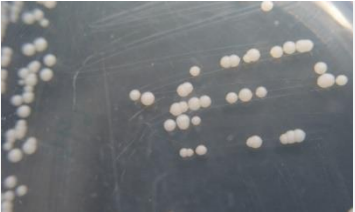
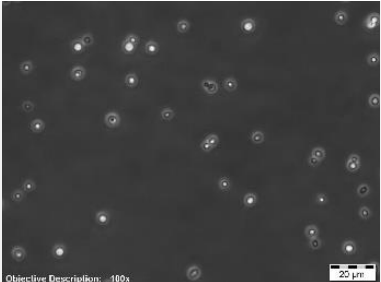

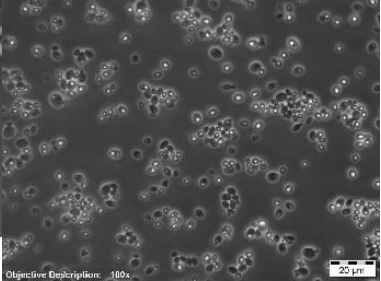

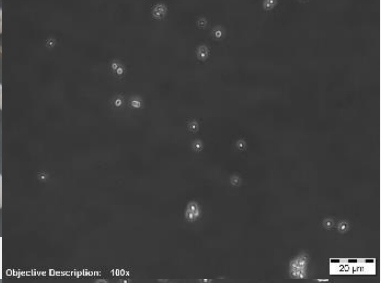
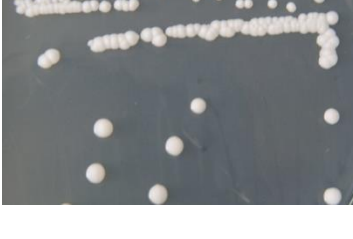
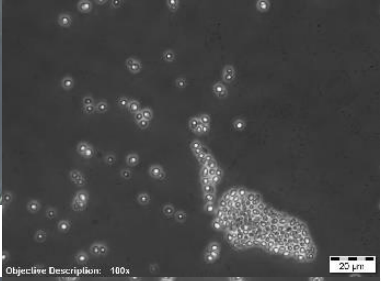
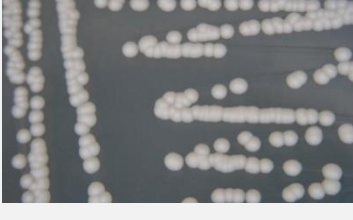
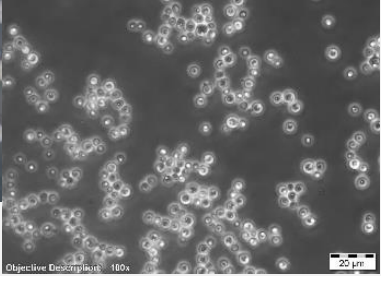


Anexo 12: Diferentes tipos de colonias antes de ser aisladas individualmente. De cada una se obtuvieron cultivos puros antes de ser conservados.

MARGEN					
	ENTERA	ONDULADA	LOBADA	RIZOIDE	
ELEVACIÓN					
	PLANA	CÓNCAVA	CONVEXA	UMBILICADA	
SUPERFICIE	LISA	RUGOSA	PLEGADA	RÍGIDA	FILAMENTOSA
BRILLO	BRILLANTE	OPACA			
TEXTURA	MUCOSA	BUTIROSA	FRIABLE		
COLOR	AMARILLA	BLANCA	CREMA	ROSADA	ROJA

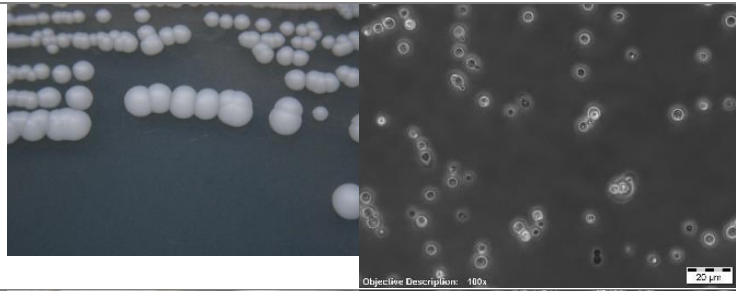
Anexo 13: Características utilizadas en la Colección de Levaduras Quito-Católica (CLQCA) para su catalogación.

Anexo 14: Documentación fotográfica de los 40 aislados identificados

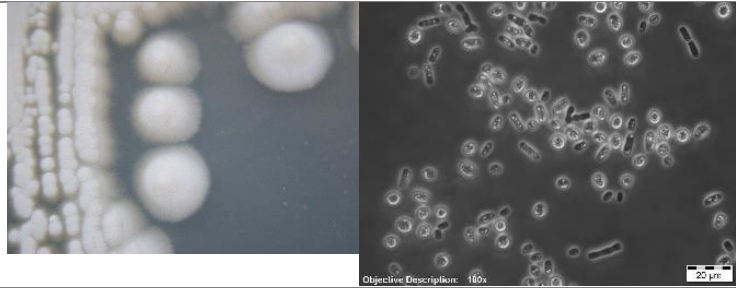
Código del aislado/Especie	Fotografía de colonias	Fotografías Microscópicas
<p>CLQCA-10-696 <i>Candida palmioleophila</i></p>		 <p>Objective Description: 100x</p>
<p>CLQCA-10-697 <i>Meyerozyma caribbica</i></p>		 <p>Objective Description: 100x</p>
<p>CLQCA-10-698 <i>Meyerozyma caribbica</i></p>		 <p>Objective Description: 100x</p>
<p>CLQCA-10-699 <i>Candida sinolaborantium</i></p>		 <p>Objective Description: 100x</p>
<p>CLQCA-10-700 <i>Scheffersomyces stipitis</i></p>		 <p>Objective Description: 100x</p>

(continuación...)

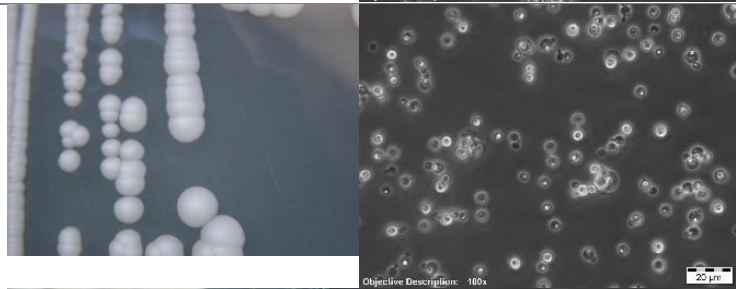
CLQCA-10-701
Scheffersomyces stipitis



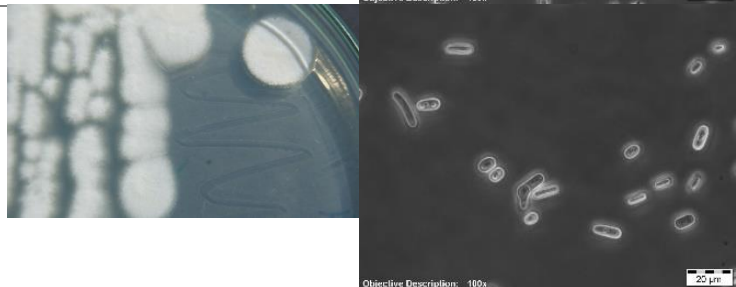
CLQCA-10-702
Trichosporon siamense



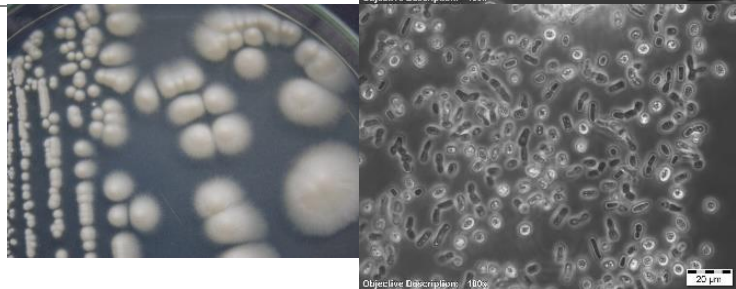
CLQCA-10-703
Scheffersomyces stipitis



CLQCA-10-704
Geotrichum candidum

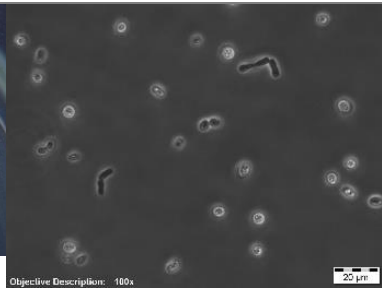
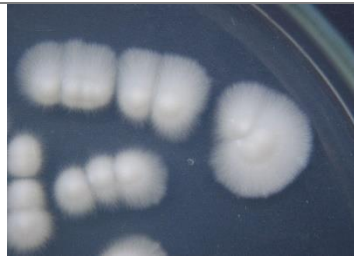


CLQCA-10-705
Trichosporon siamense



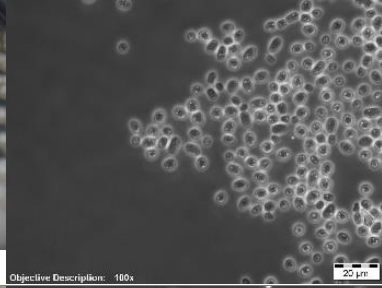
(continuación...)

CLQCA-10-706
Trichosporon siamense



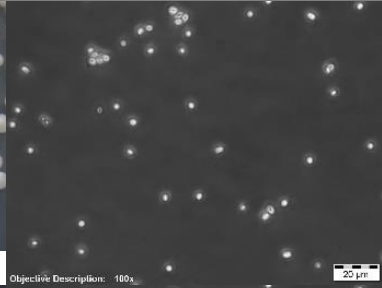
Objective Description: 100x

CLQCA-10-707
Trichosporon siamense



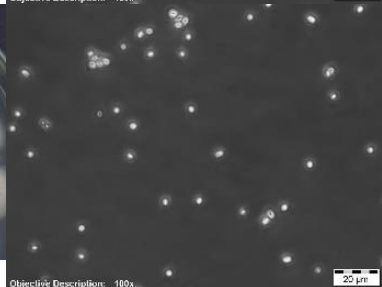
Objective Description: 100x

CLQCA-10-709
Scheffersomyces xylosifermentans



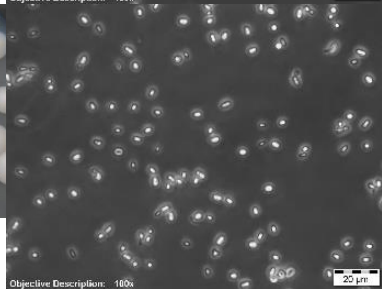
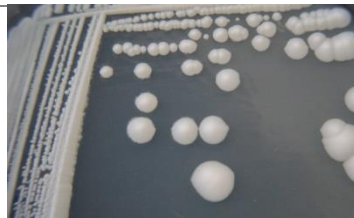
Objective Description: 100x

CLQCA-10-710
Trichosporon siamense




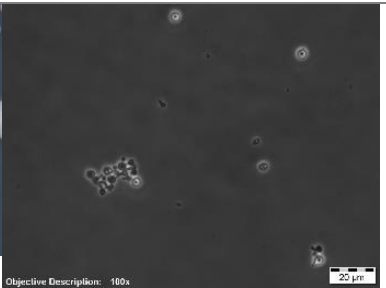



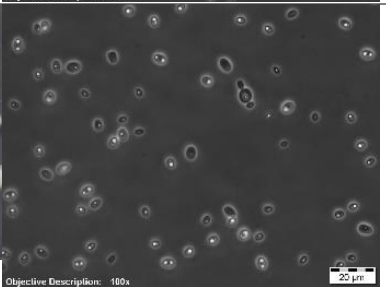

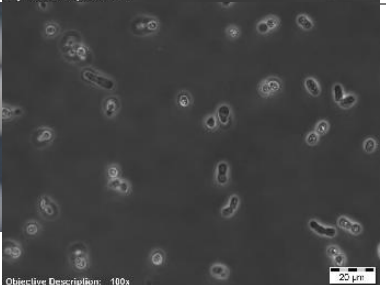


Objective Description: 100x

CLQCA-10-711
Scheffersomyces xylosifermentans

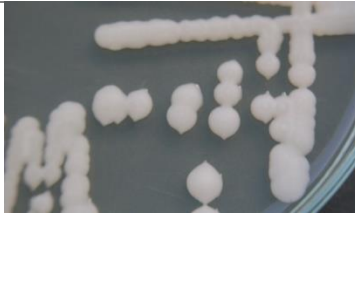
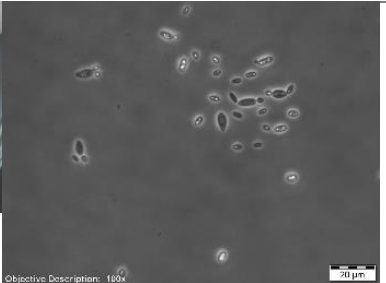



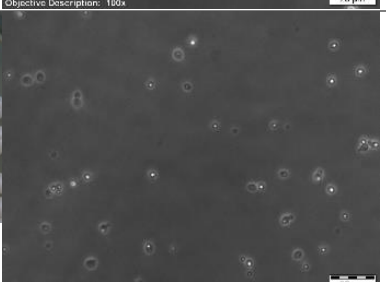

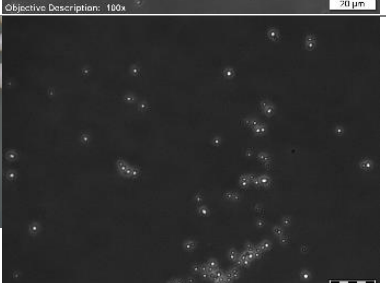

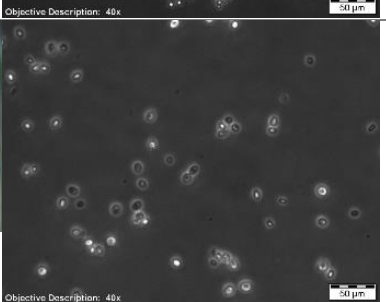


Objective Description: 100x


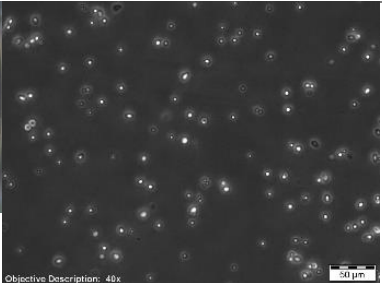

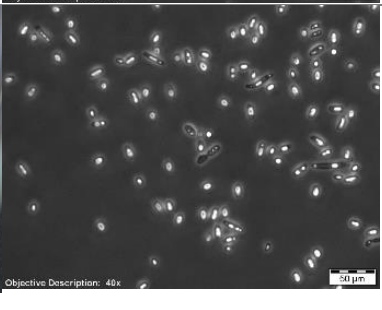

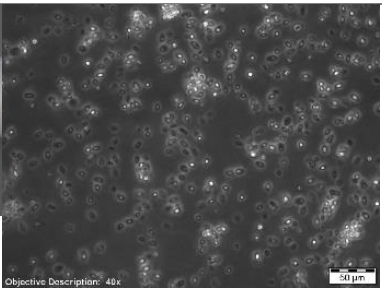
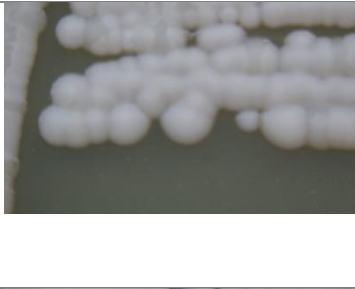
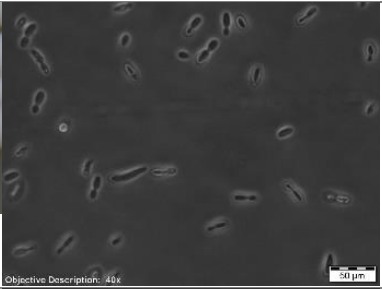


(continuación...)

<p>CLQCA-10-712 <i>Scheffersomyces stipitis</i></p>		 <p>Objective Description: 100x 20 µm</p>
<p>CLQCA-10-713 <i>Scheffersomyces xylofermentans</i></p>		 <p>Objective Description: 100x 20 µm</p>
<p>CLQCA-10-714 <i>Scheffersomyces xylofermentans</i></p>		 <p>Objective Description: 100x 20 µm</p>
<p>CLQCA-10-715 <i>Trichosporon siamense</i></p>		 <p>Objective Description: 100x 20 µm</p>
<p>CLQCA-18-10 <i>Kazachstania serrabonitensis</i></p>		 <p>Objective Description: 100x 20 µm</p>


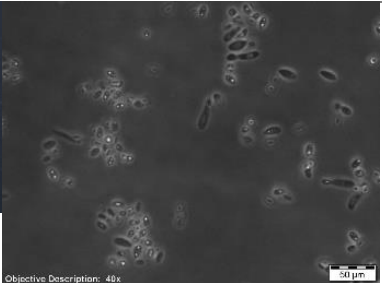

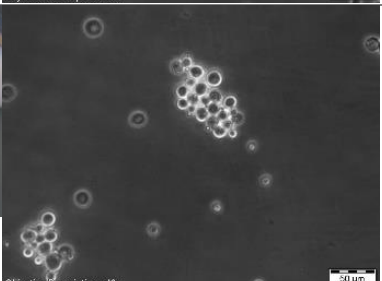

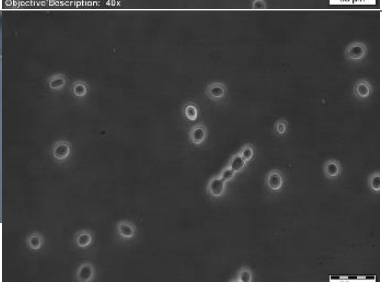

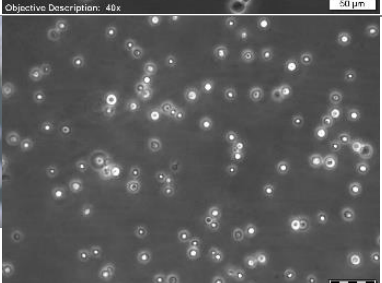


(continuación...)

<p>CLQCA-18-11 <i>Cryptococcus humicola</i></p>		 <p>Objective Description: 160x 50 µm</p>
<p>CLQCA-18-12 <i>Candida palmioleophila</i></p>		 <p>Objective Description: 160x 50 µm</p>
<p>CLQCA-18-13 <i>Candida palmioleophila</i></p>		 <p>Objective Description: 160x 50 µm</p>
<p>CLQCA-18-15 <i>Candida sinolaborantium</i></p>		 <p>Objective Description: 160x 50 µm</p>
<p>CLQCA-18-16 <i>Kazachstania serrabotinensis</i></p>		 <p>Objective Description: 40x 50 µm</p>

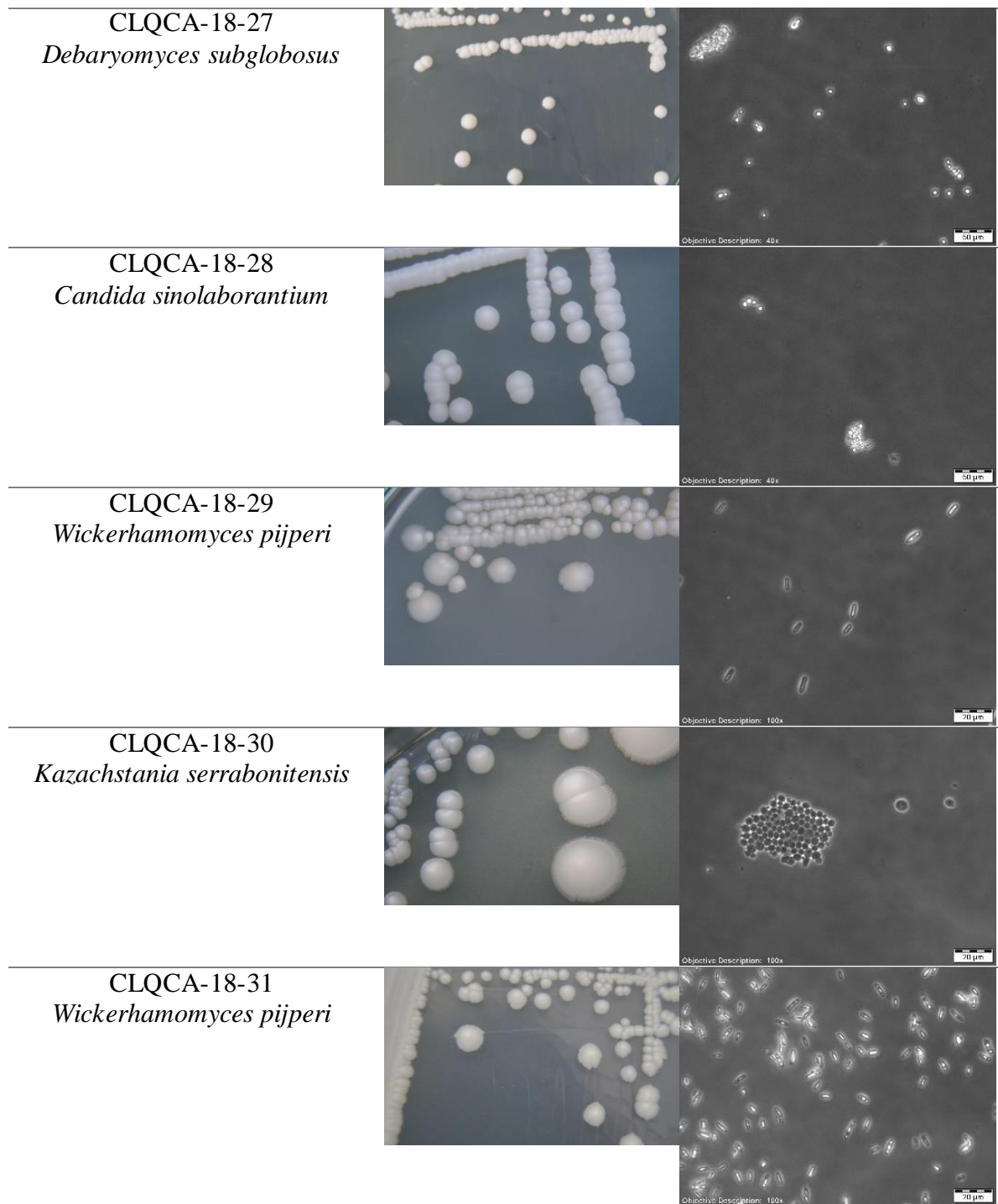
(continuación...)

<p>CLQCA-18-17 <i>Candida palmioleophila</i></p>		 <p>Objective Description: 40x 50 µm</p>
<p>CLQCA-18-18 <i>Cryptococcus humicola</i></p>		 <p>Objective Description: 40x 50 µm</p>
<p>CLQCA-18-19 <i>Candida palmioleophila</i></p>		 <p>Objective Description: 40x 50 µm</p>
<p>CLQCA-18-20 <i>Cryptococcus humicola</i></p>		 <p>Objective Description: 40x 50 µm</p>
<p>CLQCA-18-21 <i>Cryptococcus humicola</i></p>		 <p>Objective Description: 40x 50 µm</p>

(continuación...)

<p>CLQCA-18-22 <i>Cryptococcus humicola</i></p>		 <p>Objective Description: 40x 50 µm</p>
<p>CLQCA-18-23 <i>Kazachstania gamospora</i></p>		 <p>Objective Description: 40x 50 µm</p>
<p>CLQCA-18-24 <i>Kazachstania yasuniensis</i></p>		 <p>Objective Description: 40x 50 µm</p>
<p>CLQCA-18-25 <i>Kazachstania gamospora</i></p>		 <p>Objective Description: 40x 50 µm</p>
<p>CLQCA-18-26 <i>Kazachstania saulgeensis</i></p>		 <p>Objective Description: 40x 50 µm</p>

(continuación)

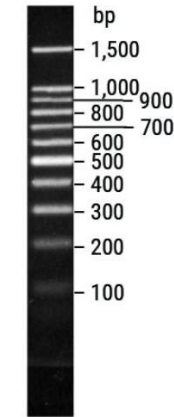
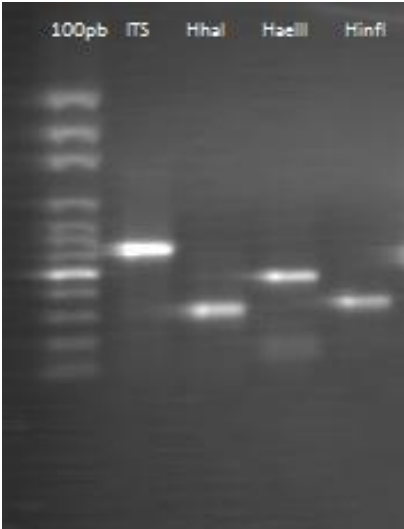
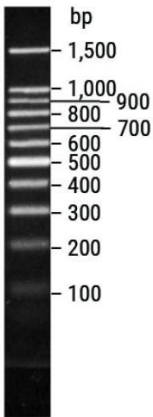
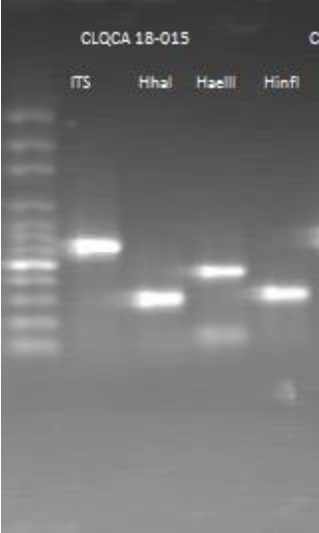


Anexo 14: Documentación fotográfica digital de los 40 aislados identificados

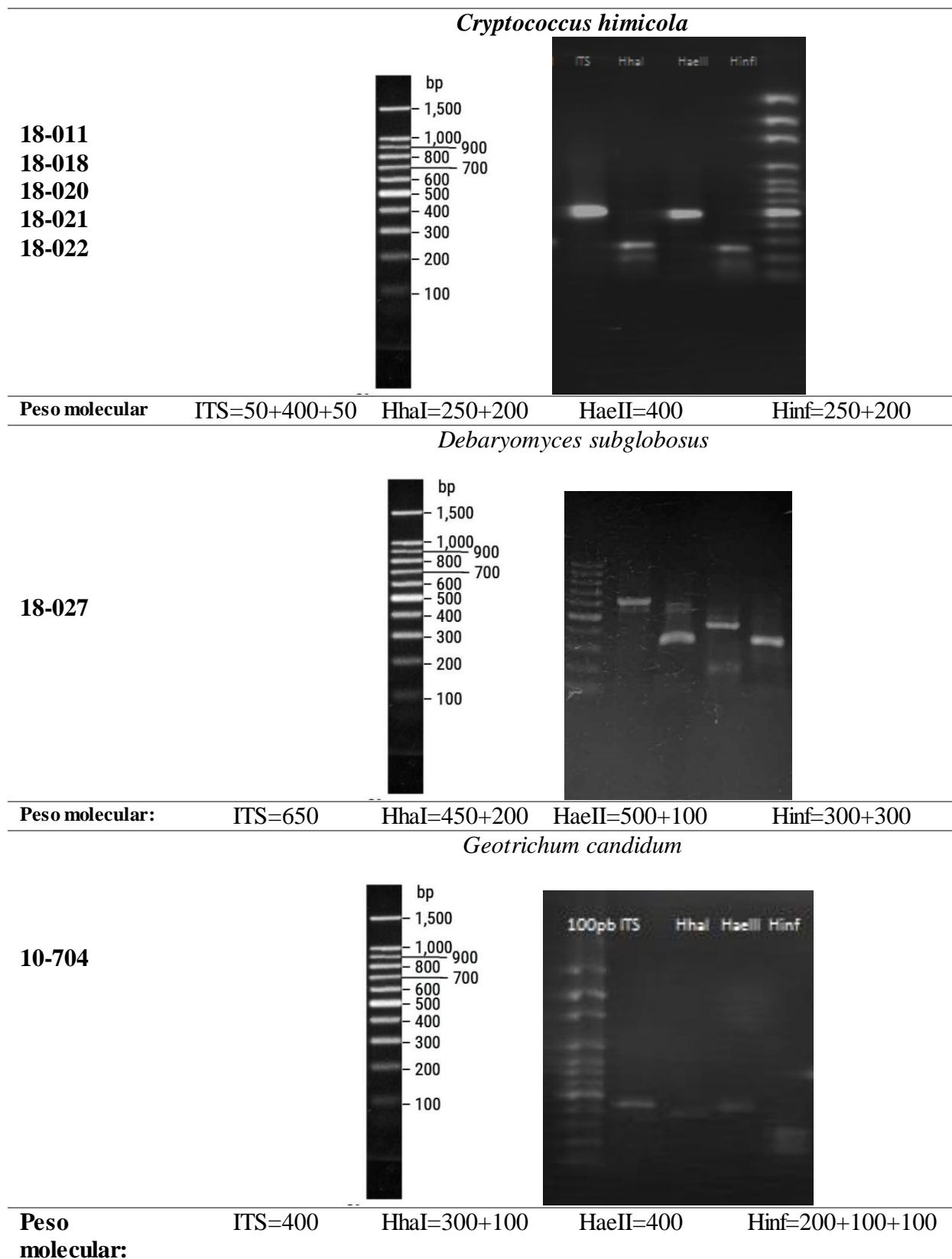
Anexo 15: Ecosistemas y sustratos muestreados por el grupo de investigadores de la CLQCA desde el año 2006.

Sustratos Muestreados en Galápagos y Ecuador continental	Ecosistemas Muestreados en Galápagos y Ecuador continental
1. Flores	1. Amazonía
2. Insectos	2. Costa
3. Madera en descomposición	3. Sierra
4. Materia vegetal en descomposición	4. Isla Floreana
5. Excrementos	5. Isla San Cristóbal
6. Frutas	6. Isla Santa Cruz
7. Exudados	7. Isla Isabela
8. Hongos	
9. Hojas	
10. Molinos de caña de azúcar	

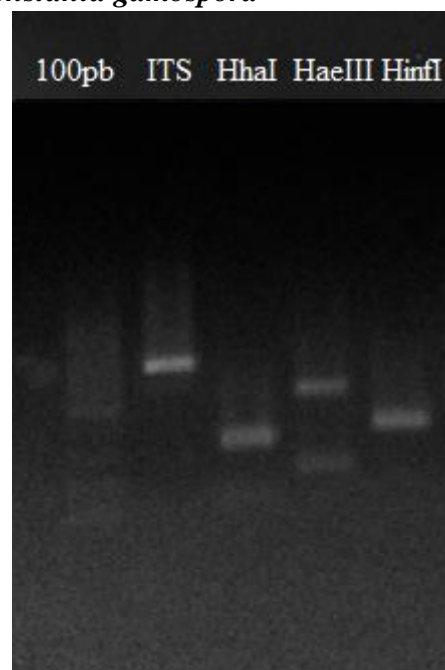
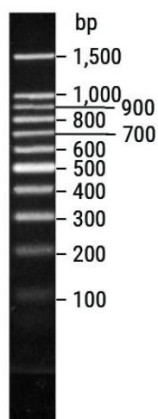
Anexo 16: Perfiles agrupados por especie de la digestión por Polimorfismo de Fragmentos de Restricción del segmento interno de transcripción (ITS-RFLP)

Código de aislados con el mismo perfil	Especies/Patrones generados						
<i>Candida palmioleophila</i>							
10-696 18-012 18-013 18-017 18-019							
		Peso molecular:	ITS=650	HhaI=350	HaeII=500+150	HinfI=350	
		<i>Candida sinolaborantium</i>					
		10-699 18-015 18-028					
				Peso molecular:	ITS=600	HhaI=300+150+150	HaeII=500+150

(continuación...)



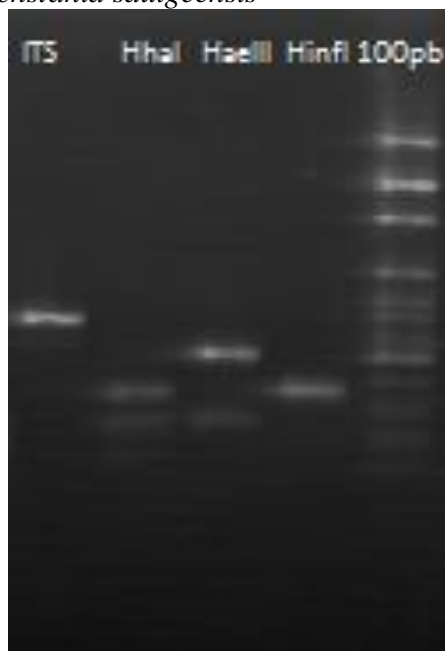
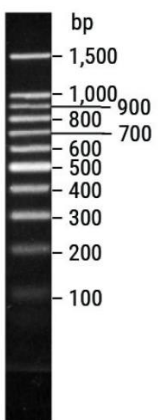
(continuación...)

*Kazachstania gamospora*18-023
18-025

Peso molecular: ITS=800 HhaI=400+200+200 HaeII=700+100 Hinf=400+300+100

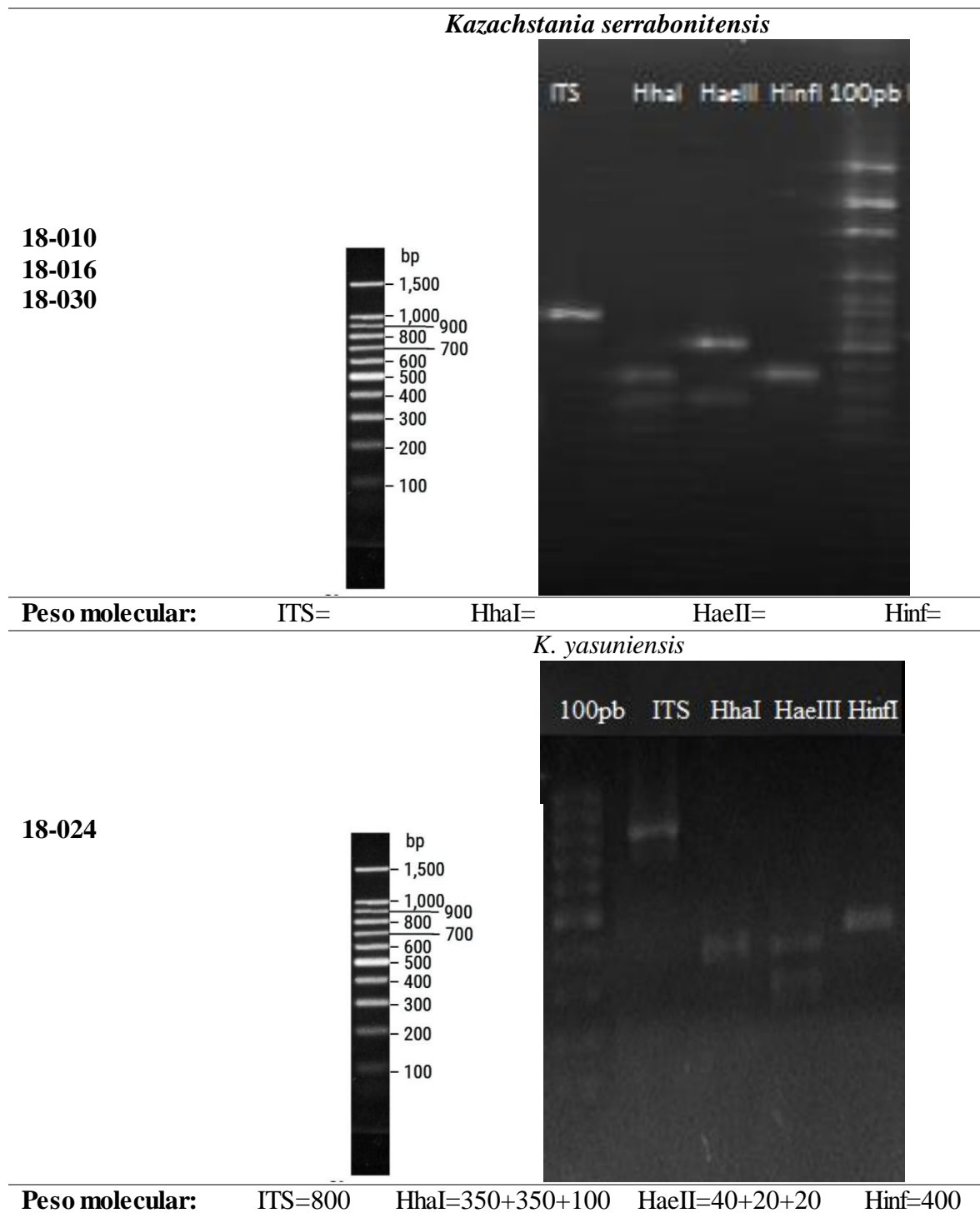
Kazachstania saulgeensis

18-026

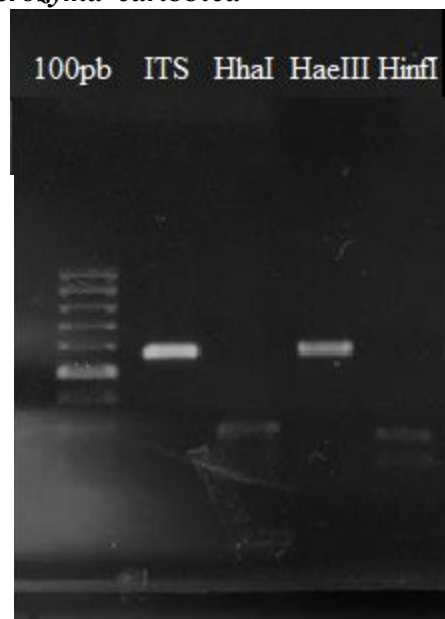
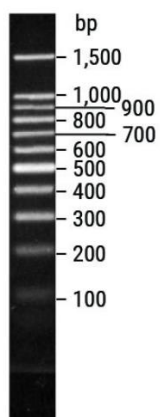


Peso molecular: ITS=750 HhaI=400+200+100 HaeII=500+200 Hinf=300+300

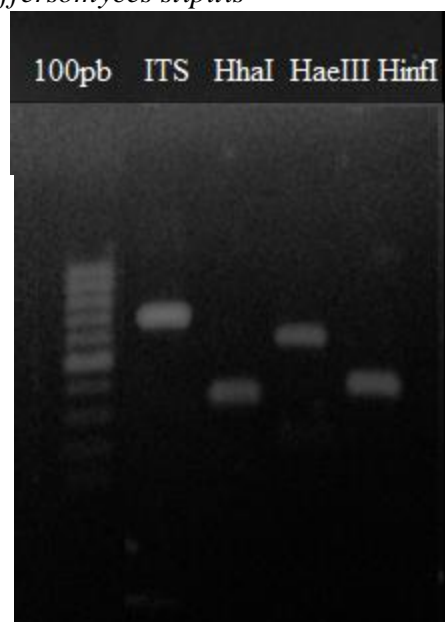
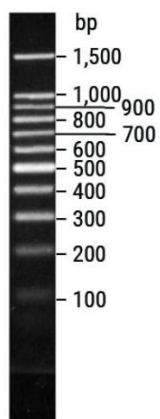
(continuación...)



(continuación...)

*Meyerozyma caribbica*10-697
10-698

Peso molecular: ITS=550 HhaI=300 HaeII=600 Hinf=350+200

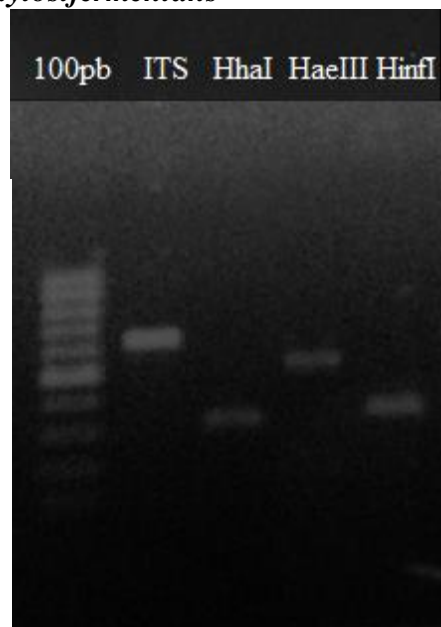
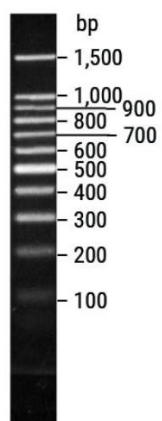
*Scheffersomyces stipitis*10-703
10-712
10-700
10-701

Peso molecular: ITS=700 HhaI=350+350 HaeII=600+100 Hinf=450+250

(continuación...)

S. xylofermentans

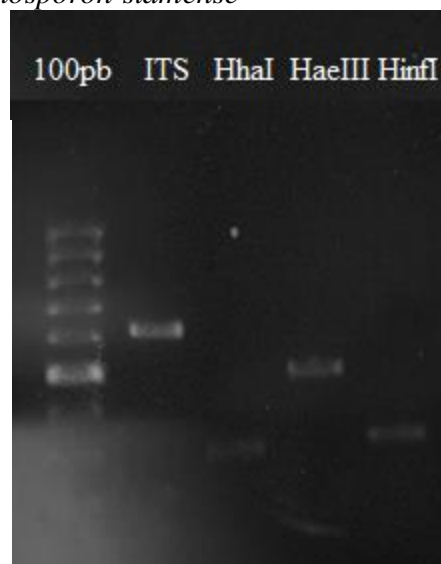
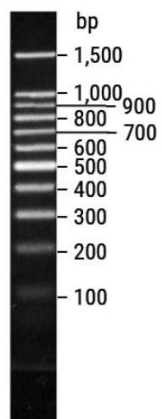
10-709
10-711
10-713
10-714



Peso molecular: ITS=650 HhaI=350+300 HaeII=600 Hinf=300+350

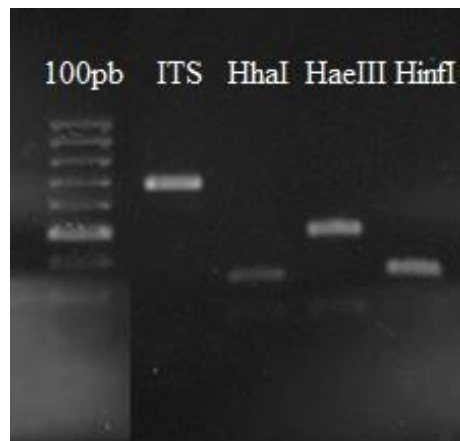
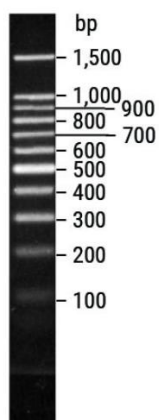
Trichosporon siamense

10-702
10-705
10-706
10-707
10-715



Peso molecular: ITS=600 HhaI=300+300 HaeII=500 Hinf=350

(continuación)

*Wickerhamomyces pijperi*18-029
18-031

Peso molecular: ITS=700 HhaI=380+320 HaeII=500+200 Hinf=380+320

Anexo 16: Perfiles agrupados por especie de la digestión por Polimorfismo de Fragmentos de Restricción del segmento interno de transcripción (ITS-RFLP)

Anexo 17. Resultados del análisis de los tratamientos con xilosa en diferentes cepas de la especie *Scheffersomyces xylofermentans*.

Código /
Tratamiento

Resultados HPLC

CLQCA 10-709

Concentración de
xilosa 2,5%

RetTime [min]	Type	Area [nRIU*s]	Amt/Area	Amount [ug/ml]	Grp	Name
6.924	BV	3.81504e4	6.66776e-3	254.37752		CELODEXTRINA
7.712		-	-	-		CELOTRIOSIA
8.374		-	-	-		CELOBIOSA
9.839		-	-	-		D-GLUCOSA
10.264	BV	1.46984e5	6.01054e-3	883.45027		XILOSA
13.308		-	-	-		AC LACTICO
14.045		-	-	-		GLYCEROL
15.723		-	-	-		AC ACETICO
21.735	BB	1.57914e4	1.61552e-2	255.11286		ETANOL
Totals :				1392.94065		

CLQCA 10-709

Concentración de
xilosa 5%

RetTime [min]	Type	Area [nRIU*s]	Amt/Area	Amount [ug/ml]	Grp	Name
6.935	BV	4.35632e4	6.66776e-3	290.46945		CELODEXTRINA
7.712		-	-	-		CELOTRIOSIA
8.374		-	-	-		CELOBIOSA
9.839		-	-	-		D-GLUCOSA
10.311	BB	3.99595e5	6.01054e-3	2401.78145		XILOSA
13.308		-	-	-		AC LACTICO
14.045		-	-	-		GLYCEROL
15.723		-	-	-		AC ACETICO
21.801	BB	2.50653e4	1.61552e-2	404.93510		ETANOL
Totals :				3097.18600		

(continuación...)

Código /Tratamiento	Resultados HPLC					
CLQCA 10-709	RetTime [min]	Type	Area [nRIU*s]	Amt/Area	Amount [ug/ml]	Grp Name
Concentración n de xilosa 10%	6.998	BV	5.64739e4	6.66776e-3	376.55473	CELODEXTRINA
	7.712	-	-	-	-	CELOTRIOSA
	8.374	-	-	-	-	CELOBIOSA
	9.839	-	-	-	-	D-GLUCOSA
	10.424	VB	1.09165e6	6.01054e-3	6561.38716	XILOSA
	13.308	-	-	-	-	AC LACTICO
	14.045	-	-	-	-	GLYCEROL
	15.723	-	-	-	-	AC ACETICO
	21.899	BB	2.60595e4	1.61552e-2	420.99696	ETANOL
	Totals :				7358.93885	
CLQCA 10-711	RetTime [min]	Type	Area [nRIU*s]	Amt/Area	Amount [ug/ml]	Grp Name
Concentración n de xilosa 2,5%	7.127	BB	6766.11621	6.66776e-3	45.11486	CELODEXTRINA
	7.712	-	-	-	-	CELOTRIOSA
	8.374	-	-	-	-	CELOBIOSA
	9.839	-	-	-	-	D-GLUCOSA
	10.588	BB	1.71720e4	6.01054e-3	103.21293	XILOSA
	13.308	-	-	-	-	AC LACTICO
	14.045	-	-	-	-	GLYCEROL
	15.723	-	-	-	-	AC ACETICO
	22.288	MM	2199.79590	1.61552e-2	35.53814	ETANOL
	Totals :				183.86593	
CLQCA 10-711	RetTime [min]	Type	Area [nRIU*s]	Amt/Area	Amount [ug/ml]	Grp Name
Concentración n de xilosa 5%	7.127	BB	7132.62354	6.66776e-3	47.55865	CELODEXTRINA
	7.712	-	-	-	-	CELOTRIOSA
	8.374	-	-	-	-	CELOBIOSA
	9.839	-	-	-	-	D-GLUCOSA
	10.593	BB	5.65576e4	6.01054e-3	339.94156	XILOSA
	13.308	-	-	-	-	AC LACTICO
	14.045	-	-	-	-	GLYCEROL
	15.723	-	-	-	-	AC ACETICO
	22.279	MM	2035.97021	1.61552e-2	32.89150	ETANOL
	Totals :				420.39171	
CLQCA 10-711	RetTime [min]	Type	Area [nRIU*s]	Amt/Area	Amount [ug/ml]	Grp Name
Concentración n de xilosa 10%	7.116	BB	8140.31885	6.66776e-3	54.27772	CELODEXTRINA
	7.712	-	-	-	-	CELOTRIOSA
	8.374	-	-	-	-	CELOBIOSA
	9.839	-	-	-	-	D-GLUCOSA
	10.578	VB	1.39089e5	6.01054e-3	835.99783	XILOSA
	13.308	-	-	-	-	AC LACTICO
	14.045	-	-	-	-	GLYCEROL
	15.723	-	-	-	-	AC ACETICO
	22.356	MM	6819.32422	1.61552e-2	110.16754	ETANOL
	Totals :				1000.44308	

(continuación...)

Código /Tratamiento	Resultados HPLC						
CLQCA 10-713	RetTime [min]	Type	Area [nRIU*s]	Amt/Area	Amount [ug/ml]	Grp	Name
Concentraci3n de xilosa 2,5%	7.170	BB	6.34409e4	6.66776e-3	423.00922		CELODEXTRINA
	7.712	-	-	-	-		CELOTRIOSA
	8.576	BB	8384.80371	5.30644e-3	44.49344		CELOBIOSA
	9.839	-	-	-	-		D-GLUCOSA
	10.659	BV	1.98888e5	6.01054e-3	1195.42264		XILOSA
	13.308	-	-	-	-		AC LACTICO
	14.045	-	-	-	-		GLYCEROL
	15.723	-	-	-	-		AC ACETICO
	22.447	BB	3.02397e4	1.61552e-2	488.52825		ETANOL
	Totals :				2151.45355		
	CLQCA 10-713	RetTime [min]	Type	Area [nRIU*s]	Amt/Area	Amount [ug/ml]	Grp
Concentraci3n de xilosa 5%	7.166	BB	6.46461e4	6.66776e-3	431.04486		CELODEXTRINA
	7.712	-	-	-	-		CELOTRIOSA
	8.572	BB	9420.32422	5.30644e-3	49.98837		CELOBIOSA
	9.839	-	-	-	-		D-GLUCOSA
	10.652	BV	5.55124e5	6.01054e-3	3336.59121		XILOSA
	13.308	-	-	-	-		AC LACTICO
	14.280	BB	2084.67310	6.36766e-3	13.27449		GLYCEROL
	15.723	-	-	-	-		AC ACETICO
	22.434	BB	3.49902e4	1.61552e-2	565.27411		ETANOL
	Totals :				4396.17305		
	CLQCA 10-713	RetTime [min]	Type	Area [nRIU*s]	Amt/Area	Amount [ug/ml]	Grp
Concentraci3n de xilosa 10%	7.161	BB	6.03331e4	6.66776e-3	402.28672		CELODEXTRINA
	7.712	-	-	-	-		CELOTRIOSA
	8.564	BB	9571.45703	5.30644e-3	50.79035		CELOBIOSA
	9.839	-	-	-	-		D-GLUCOSA
	10.646	BV	1.18024e6	6.01054e-3	7093.88701		XILOSA
	13.308	-	-	-	-		AC LACTICO
	14.257	BB	2672.87573	6.36766e-3	17.01997		GLYCEROL
	15.723	-	-	-	-		AC ACETICO
	22.415	BB	3.19036e4	1.61552e-2	515.40971		ETANOL
	Totals :				8079.39376		
	CLQCA 10-714	RetTime [min]	Type	Area [nRIU*s]	Amt/Area	Amount [ug/ml]	Grp
Concentraci3n de xilosa 2,5%	7.126	BB	5.38514e4	6.66776e-3	359.06826		CELODEXTRINA
	7.712	-	-	-	-		CELOTRIOSA
	8.507	BB	7289.62109	5.30644e-3	38.68193		CELOBIOSA
	9.839	-	-	-	-		D-GLUCOSA
	10.588	BV	1.48383e5	6.01054e-3	891.86117		XILOSA
	13.308	-	-	-	-		AC LACTICO
	14.045	-	-	-	-		GLYCEROL
	15.723	-	-	-	-		AC ACETICO
	22.303	BB	3.20560e4	1.61552e-2	517.87076		ETANOL
	Totals :				1807.48211		

(continuación)

Código /Tratamiento	Resultados HPLC						
CLQCA 10-714 Concentración de xilosa 5%	RetTime [min]	Type	Area [nRIU*s]	Amt/Area	Amount [ug/ml]	Grp	Name
	7.128	BB	6.50868e4	6.66776e-3	433.98363		CELODEXTRINA
	7.712		-	-	-		CELOTRIOSA
	8.509	BB	9756.59180	5.30644e-3	51.77275		CELOBIOSA
	9.839		-	-	-		D-GLUCOSA
	10.590	VV	5.78955e5	6.01054e-3	3479.82834		XILOSA
	13.308		-	-	-		AC LACTICO
	14.045		-	-	-		GLYCEROL
	15.723		-	-	-		AC ACETICO
	22.298	BB	2.86338e4	1.61552e-2	462.58517		ETANOL
Totals :					4428.16989		
CLQCA 10-714 Concentración de xilosa 210%	RetTime [min]	Type	Area [nRIU*s]	Amt/Area	Amount [ug/ml]	Grp	Name
	7.125	BB	6.22554e4	6.66776e-3	415.10432		CELODEXTRINA
	7.712		-	-	-		CELOTRIOSA
	8.504	BB	9839.23828	5.30644e-3	52.21131		CELOBIOSA
	9.642	BV	1452.75769	5.40953e-3	7.85874		D-GLUCOSA
	10.588	VV	1.22032e6	6.01054e-3	7334.76758		XILOSA
	13.308		-	-	-		AC LACTICO
	14.195	BB	2781.25269	6.36766e-3	17.71008		GLYCEROL
	15.723		-	-	-		AC ACETICO
	22.288	BB	2.73225e4	1.61552e-2	441.39990		ETANOL
Totals :					8269.05194		

Anexo 17: Resultados del análisis de los tratamientos con xilosa en diferentes cepas de la especie *Scheffersomyces xylosifermentans*.