



UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE CUENCA

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CUENCA

Comunidad Educativa al Servicio del Pueblo

UNIDAD ACADÉMICA DE SALUD Y BIENESTAR

CARRERA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

LEVADURAS PSICROTOLERANTES EN AMBIENTES

EXTREMOS DOMÉSTICOS DE LA SIERRA

ECUATORIANA

PROYECTO DE TITULACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL

TÍTULO DE BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA

AUTORAS: EVELYN TATIANA CAMPOSANO REYES

DANIELA FERNANDA SERRANO VERA

DIRECTOR: LIC. LUIS ANDRÉS YARZÁBAL RODRÍGUEZ, PhD.

CUENCA - ECUADOR

2024

DIOS, PATRIA, CULTURA Y DESARROLLO



UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CUENCA

Comunidad Educativa al Servicio del Pueblo

UNIDAD ACADÉMICA DE SALUD Y BIENESTAR

CARRERA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

LEVADURAS PSICROTOLERANTES EN AMBIENTES EXTREMOS
DOMÉSTICOS DE LA SIERRA ECUATORIANA

**PROYECTO DE TITULACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL
TÍTULO DE BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA**

AUTORAS: EVELYN TATIANA CAMPOSANO REYES

DANIELA FERNANDA SERRANO VERA

DIRECTOR: LIC. LUIS ANDRÉS YARZÁBAL RODRÍGUEZ, PhD.

CUENCA - ECUADOR

2024

DIOS, PATRIA, CULTURA Y DESARROLLO



Declaratoria de Autoría y Responsabilidad


Evelyn Tatiana Camposano Reyes y **Daniela Fernanda Serrano Vera** portadoras de la cédula de ciudadanía N° **3040031043** y N° **0107419178**. Declaramos ser las autoras de la obra: "**Levaduras psicrotolerantes en ambientes extremos domésticos de la Sierra Ecuatoriana**", sobre la cual nos hacemos responsables sobre las opiniones, versiones e ideas expresadas. Declaramos que la misma ha sido elaborada respetando los derechos de propiedad intelectual de terceros y eximimos a la Universidad Católica de Cuenca sobre cualquier reclamación que pudiera existir al respecto. Declaramos finalmente que nuestra obra ha sido realizada cumpliendo con todos los requisitos legales, éticos y bioéticos de investigación, que la misma no incumple con la normativa nacional e internacional en el área específica de investigación, sobre la que también nos responsabilizamos y eximimos a la Universidad Católica de Cuenca de toda reclamación al respecto.

Cuenca, 3 de octubre de 2024

F: 

Evelyn Tatiana Camposano Reyes

C.I. 3040031043

F: 

Daniela Fernanda Serrano Vera

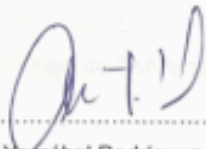
C.I. 0107419178

Certificación del Tutor

Lic. Luis Andrés Yarzabal Rodríguez, PhD.
DOCENTE DE LA UNIDAD ACADÉMICA DE SALUD Y BIENESTAR.
CARRERA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA
De mi consideración:

El presente trabajo de titulación denominado "LEVADURAS PSICROTOLERANTES EN AMBIENTES EXTREMOS DOMÉSTICOS DE LA SIERRA ECUATORIANA", realizado por CAMPOSANO REYES EVELYN TATIANA, ha sido revisado y orientado durante su ejecución, por lo que certifico que el presente documento, fue desarrollado siguiendo los parámetros del método científico, se sujeta a las normas éticas de investigación, por lo que está expedito para su sustentación.

Cuenca, agosto 2024



Lic. Luis Andrés Yarzabal Rodríguez, PhD

C.I.: 0151710431

Certificación del Tutor

Lic. Luis Andrés Yarzabal Rodríguez, PhD.
**DOCENTE DE LA UNIDAD ACADÉMICA DE SALUD Y BIENESTAR.
CARRERA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA**
De mi consideración:

El presente trabajo de titulación denominado "LEVADURAS PSICROTOLERANTES EN AMBIENTES EXTREMOS DOMÉSTICOS DE LA SIERRA ECUATORIANA", realizado por SERANO VERA DANIELA FERNANDA, ha sido revisado y orientado durante su ejecución, por lo que certifico que el presente documento, fue desarrollado siguiendo los parámetros del método científico, se sujeta a las normas éticas de investigación, por lo que está expedito para su sustentación.

Cuenca, agosto 2024



Lic. Luis Andrés Yarzabal Rodríguez, PhD

C.I.: 0151710431

RESUMEN

Introducción: Las levaduras psicotolerantes en ambientes domésticos extremos han sido poco estudiadas en Latinoamérica, y particularmente en Ecuador. La falta de conocimiento acerca de las mismas podría representar un problema de salud pública, pues las medidas de prevención e higiene para evitar infecciones causadas por este tipo de levaduras no han sido establecidas.

Objetivo general: Determinar la diversidad de levaduras psicotolerantes que están presentes en ambientes domésticos extremos en la región de la sierra ecuatoriana.

Metodología: Los métodos a utilizar incluyen el cultivo y evaluación macroscópica y microscópica de las levaduras cultivadas, la estimación de la temperatura óptima de crecimiento, expresión de factores de virulencia, extracción de ADN, amplificación de la región ITS, electroforesis de ADN en geles de agarosa, secuenciación y análisis de secuencias con BLAST-N y filogenia molecular. Aislaremos, caracterizaremos e identificaremos cepas de levaduras extremófilas domésticas. Esto incluirá, muy probablemente, especies potencialmente patógenas.

Resultados: Se llevó a cabo una selección minuciosa de 12 morfotipos de levaduras que presentan claras diferencias después de ser sometidos a procesos de purificación. Entre los aislados estudiados están presentes cepas filogenéticamente muy cercanas a las especies *Rhodotorula mucilaginosa*, *Yamadazyma takamatsuzukensis*, *Barnettozyma*.

Conclusiones: Los lavaplatos de los departamentos de la ciudad de Cañar presentan una amplia diversidad de levaduras psicotolerantes, capaces de desarrollarse tanto a bajas temperaturas como a 37 grados centígrados. Este hallazgo sugiere que estas levaduras han adquirido adaptaciones metabólicas que les permiten sobrevivir en condiciones ambientales extremas

PALABRAS CLAVE: Levaduras, Psicotolerantes, Sierra

Abstract

Introduction: Psychrotolerant yeasts in extreme domestic environments have been little studied in Latin America, particularly in Ecuador. The lack of knowledge about them could represent a public health problem, as prevention and hygiene measures have not been established to avoid infections caused by this type of yeast.

Objective: To determine the diversity of psychrotolerant yeasts in extreme domestic environments in the Ecuadorian highlands.

Methodology: The methods to be used include culture and macroscopic and microscopic evaluation of the cultured yeasts, estimation of optimal growth temperature, expression of virulence factors, DNA extraction, amplification of the internal transcribed spacer (ITS) region, DNA electrophoresis in agarose gels, sequencing, and sequence analysis with BLAST-N and molecular phylogeny. Isolate, characterize, and identify strains of domestic extremophilic yeasts. This will likely include potentially pathogenic species.

Results: An exhaustive selection of 12 yeast morphotypes, which showed clear differences after undergoing purification processes, was carried out. Among the isolates studied, some strains are phylogenetically very close to *Rhodotorula mucilaginosa*, *Yamadazyma takamatsuzukensis*, and *Barnettozyma* species.

Conclusion: The sinks in the apartments in the city of Cañar show a wide diversity of psychrotolerant yeasts, capable of developing at low temperatures and at 37 degrees Celsius. This finding suggests these yeasts have acquired metabolic adaptations to survive extreme environmental conditions.

Keywords: Yeast, Psychrotolerants, Highlands

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	7
I.1.- PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN.	8
II.2.- POBLACIÓN Y MUESTRA	11
Aislamiento Primario	16
Evaluación macroscópica y microscópica de los aislados de levaduras	17
Estimación de la temperatura óptima de crecimiento	17
Expresión de factores de virulencia	17
Extracción de ADN	18
Amplificación de la región ITS	19
Electroforesis de ADN en geles de agarosa	19
Secuenciación y análisis de secuencias con BLAST-N	20
II.5.1.- PROCEDIMIENTOS ESTADÍSTICOS Y ANÁLISIS DE DATOS	20
II.6.- ASPECTOS ÉTICOS	20
III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	14
III.1.- Descripción de los lavaplatos donde se realizó la toma de muestra	14
III. 2.- Descripción de los aislamientos primarios de microorganismos.	15
III.3.- Purificación de aislado	17
III.4.- Selección de aislados para caracterización	17
III.5.- Crecimiento de levaduras a diferentes temperaturas	20
III.6.- Expresión de factores de virulencia	23
III.6.1.- Actividad de fosfolipasas, proteasas y hemólisis	23
III.6.2.- Capacidad de penetración del sustrato.	24
III.7.- Amplificación de la región ITS	27
III.8.- Secuenciación y análisis de secuencias de la región ITS	27
IV.1.- CONCLUSIONES	16
IV.2.- RECOMENDACIONES	17
BIBLIOGRAFÍA	18

DEDICATORIA

Dedicamos esta tesis a nuestras familias, cuyos constantes apoyo y comprensión han sido fundamentales en este arduo proceso. Gracias por su amor, paciencia y por creer siempre en nosotras.

A nuestros profesores, por su guía, sabiduría y dedicación. Sus enseñanzas han dejado una huella imborrable en nuestra formación académica y personal.

A la universidad, por brindarnos el espacio y los recursos necesarios para desarrollar nuestras capacidades y alcanzar nuestras metas.

A nuestros lectores, por tomarse el tiempo de leer y evaluar nuestro trabajo. Esperamos que encuentren en estas páginas un aporte valioso al conocimiento y la investigación.

AGRADECIMIENTOS:

En primer lugar, quiero agradecer a mis padres por su amor incondicional, paciencia y constante apoyo. Su apoyo inquebrantable ha sido mi mayor fortaleza y motivación en la culminación de esta tesis, por lo que les estoy profundamente agradecida.

Quiero agradecer a mis amigos, especialmente a mi compañera de tesis Daniela Serrano, por su apoyo, comprensión y ánimo en los momentos más desafiantes.

A mis tutores, les agradezco por su invaluable orientación, paciencia y sabios consejos que han mejorado cada aspecto de esta tesis. Su dedicación y conocimientos han sido la guía que ha dado forma a este trabajo de investigación.

Evelyn Camposano Reyes

AGRADECIMIENTOS:

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todas las personas que han sido fundamentales en la culminación de esta tesis.

A mis abuelos Luzmila y Sixto, por su amor incondicional y su apoyo constante a lo largo de mi vida. Ustedes han sido una fuente de inspiración y fortaleza para mí.

A mis padres, Beto y Diana, por su sacrificio, dedicación y por creer siempre en mí. Gracias por su paciencia, comprensión y por brindarme las herramientas necesarias para alcanzar mis metas.

A mi familia, en especial a mi tía Magui, por su cariño, apoyo y palabras de aliento en los momentos más difíciles y a mi pequeño hermano Francisco por alegrar mi vida.

A mi compañera de tesis, Evelyn Camposano, por su colaboración, esfuerzo y compromiso durante este proceso. Ha sido un placer trabajar contigo y compartir este logro.

Finalmente, a mis tutores de tesis, por su guía, sabiduría y paciencia. Sus enseñanzas y consejos han sido indispensables para la realización de este trabajo. Agradezco profundamente el tiempo y la dedicación que han invertido en mi formación académica.

Daniela Serrano Vera

I. INTRODUCCIÓN

Nuestro entorno tiene el potencial de impactar directamente el microbioma humano y la salud inmunológica, ya que en la actualidad pasamos la mayor parte del tiempo en ambientes interiores y por ende en contacto con las diferentes áreas del hogar. Un alto porcentaje de microorganismos encontrados en las superficies con las que tenemos contacto se asocian con la piel humana, teniendo un aporte el aire exterior, el agua y el suelo, resultando en un punto de encuentro microbiano único y diverso (1).

Entre estos microorganismos se encuentran las levaduras, un grupo del dominio Eukarya perteneciente al Reino Fungi. Las levaduras muestran perfiles nutricionales heterogéneos y una alta capacidad de colonizar una gran variedad de ecosistemas, adaptándose a diferentes temperaturas, sustratos, altitudes y ubicaciones geográficas (2).

Particularmente notables son las levaduras psicotolerantes que pueden crecer a 0 °C, pero su temperatura óptima está entre los 20 y 30 °C, proliferando en un amplio rango de temperaturas que les permite encontrarse en muchos hábitats fríos, ya que resisten grandes cambios de temperatura como aquellas presentes en la región de Cañar, una zona fría con temperaturas que oscilan entre 2-15 °C. Las levaduras psicotolerantes pueden considerarse microorganismos extremófilos, adaptados no sólo a bajas temperaturas, sino también a otros factores ambientales como en el presente estudio donde los lavaplatos representan ambientes extremos debido a la presencia de compuestos desinfectantes y detergentes, estos ambientes constituyen un desafío para la supervivencia de muchos microorganismos (3). Algunos de estos pueden representar una amenaza para la salud humana expuesta a los mismos ya que podrían ser patógenos u oportunistas. Es por ello que este trabajo busca

comprender cómo estas levaduras sobreviven, determinar sus factores de virulencia y determinar su espécimen.

CAPÍTULO I
PLANTEAMIENTO TEÓRICO.

I.1.- PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN.

Las condiciones extremas de algunos espacios en el interior de nuestros hogares y el uso permanente de variedad de sustancias químicas novedosas en ellos moldean la diversidad y abundancia de la microbiota doméstica. La tolerancia a condiciones ambientales consideradas “extremas” (altas o bajas temperaturas, pH ácido o alcalino, elevada salinidad, presencia de compuestos tóxicos, etc.), se ha relacionado con la patogenicidad humana que presentan ciertos microorganismos. En el caso de los hongos (pertenecientes al Reino Fungi del Dominio Eukarya) esto explica por qué numerosas especies descubiertas en hábitats interiores, como los lavaplatos manuales o automáticos, son patógenos oportunistas notables. Aunque generalmente se ha subestimado el impacto de los microorganismos que, con frecuencia, ingresan a nuestros hogares junto con el agua y luego se enriquecen en nuevos hábitats interiores, los mismos pueden tener un impacto sobre la salud de la población humana (1).

Las levaduras psicotolerantes (es decir, capaces de multiplicarse a temperaturas por debajo de los 20°C) en ambientes domésticos extremos han sido poco estudiadas dentro de Latinoamérica (7). Por esta misma razón, sería importante investigar en torno a este tema, con el fin de determinar la presencia y posible patogenicidad de estas levaduras. Las bajas temperaturas características de la Sierra ecuatoriana permiten el crecimiento de todo tipo de microorganismos tolerantes a esta condición ambiental, entre las cuales se encuentran las levaduras psicotolerantes. La falta de conocimiento acerca de las mismas podría representar un problema de salud pública, pues las medidas de prevención e higiene para este tipo de levaduras no se conocen.

Tampoco existen estrategias de prevención o educación para la profilaxis de enfermedades que pueden causar estas levaduras, así como sus vías de inoculación, por ende, tampoco se conoce cómo actuar ante estas infecciones.

I.2.- JUSTIFICACIÓN

La presente investigación es importante dentro del ámbito científico, ya que hay pocos estudios a nivel sudamericano sobre las levaduras psicotolerantes en ambientes domésticos En este caso, en la Sierra Ecuatoriana. Dado que no hay información acerca de estas levaduras, no se conocen los riesgos asociados a su presencia. Adicionalmente, la falta de información tampoco facilita el diseño e implementación de estrategias de prevención necesarias para prevenir la propagación de estos microorganismos.

El objetivo de la presente investigación es generar conocimiento nuevo acerca de estas levaduras psicotolerantes. El estudio de las especies presentes en estos entornos extremos permitirá analizar, entre otras cosas, la posible virulencia de estos microorganismos, con los que estamos en contacto a diario. De la misma forma, los resultados de nuestro estudio podrían permitir sugerir medidas de prevención, como –por ejemplo- nuevos hábitos de higiene que mitigan la proliferación de los microbios. La información obtenida permitirá la generación y divulgación de conocimiento científico a nivel internacional, extendiendo las fronteras del conocimiento en este campo.

Los estudiantes de la Carrera de Bioquímica y Farmacia que participen como tesis serán los más beneficiados con este proyecto de investigación porque podremos completar nuestra formación universitaria, cumpliendo con uno de los requisitos exigidos. De esta manera, contribuiremos con la Universidad Católica de Cuenca en el cumplimiento de uno de sus objetivos, que es avanzar en el conocimiento a través de la investigación científica. Los investigadores que coordinan el proyecto de investigación en cuyo contexto se llevará a cabo esta tesis también se beneficiarán, porque sabrán más sobre las levaduras psicotolerantes en entornos domésticos extremos en la zona de la Sierra Ecuatoriana.

I.2.1.- PREGUNTAS CIENTÍFICAS:

¿Cuán diversas son las levaduras psicotolerantes en ambientes domésticos de la sierra ecuatoriana?

¿Cuáles son las características específicas de estas levaduras?

¿Cuán patógenos podrían ser estas levaduras psicotolerantes?

¿Qué especies de levaduras psicotolerantes están allí presentes?

¿Cómo se relacionan estas especies con otras especies similares?

I.3.- OBJETIVOS

I.3.1.-Objetivo General:

Determinar la diversidad de levaduras psicotolerantes que están presentes en ambientes domésticos extremos en la región de la sierra ecuatoriana.

I.3.2.-Objetivos Específicos:

- Detectar la presencia de levaduras psicotolerantes en ambientes domésticos extremos en la sierra ecuatoriana.
- Caracterizar desde el punto de vista morfológico, fisiológico y bioquímico las levaduras y bacterias aisladas a partir de ambientes extremos.
- Determinar la expresión de factores de virulencia por parte de estas cepas de levaduras psicotolerantes de ambientes domésticos
- Identificar a qué especies pertenecen las levaduras aisladas previamente.
- Determinar la filogenia molecular de estas levaduras psicotolerantes.

I.4.- MARCO TEÓRICO

I.4.1.- ANTECEDENTES: Como antecedentes directos al presente proyecto de investigación, podemos destacar los siguientes artículos.

El primer trabajo, titulado “Dishwashers a man-made ecological niche accommodating human opportunistic fungal pathogens” fue publicado por P. Zalar y colaboradores en 2011. Se trata de un grupo de investigadores eslovenos, quienes aislaron 189 muestras domésticas de hongos, de las cuales el 62% perteneció a los géneros *Aspergillus*, *Candida*, *Magnusiomyces*, *Fusarium*, *Penicillium* y *Rhodotorula*. A partir del 56% de estas muestras se aislaron cepas de levaduras melanizadas de la especie *Exophiala dermatitidis* y *Exophiala phaeomuriformis*. La alta prevalencia de las dos cepas de *Exophiala* puede ser explicado por su notable termotolerancia, halotolerancia y tolerancia al pH (2).

En 2013, en un artículo publicado por Döğen y colaboradores se analizaron 893 muestras obtenidas de 177 hogares de diversos sitios localizados en el interior de los mismos. Las muestras se cultivaron en un medio agarizado, suplementado con cloranfenicol a 37°C para inhibir el crecimiento bacteriano. Treinta muestras resultaron positivas para hongos, que posteriormente fueron identificados mediante la secuenciación de las regiones espaciadoras transcritas internas (ITS, por sus siglas en inglés) del ADN ribosomal. De los 30 aislados, 23 fueron identificadas como *Exophiala dermatitidis*, 3 como *Exophiala phaeomuriformis*, 2 fueron identificadas como *Magnusiomyces capitatus* y otras 2 como *Candida parapsilosis*. Estos hallazgos sugieren que los lavavajillas automáticos son un nicho importante para las levaduras negras termófilas (1).

En 2015 Gümral y sus colaboradores tomaron muestras de 937 hogares localizados en 15 ciudades turcas, centrándose en los lavavajillas. De estas, 230 muestras resultaron positivas para levaduras, de las cuales 1 fueron levaduras negras, 79 no negras y 35 colonias polifúngicas. Las especies detectadas con mayor frecuencia fueron: *Exophiala dermatitidis*, *Candida parapsilosis*, *E. phaeomuriformis*, *Magnusiomyces capitatus*, *Rhodotorula mucilaginosa*, y *C. lusitaniae*, identificadas mediante extracción de ADN, PCR y análisis molecular. (3).

En 2016 Jerneja Zupančič y colaboradores analizaron 30 lavaplatos residenciales. De estos, el 83% resultaron positivos para la presencia de hongos. A partir de los

lavaplatos se aislaron 503 cepas de hongos, que pertenecen a 10 géneros y 84 especies. Las mismas se identificaron mediante la extracción de ADN, secuenciación nucleotídica y análisis bioinformático. La levadura negra *Exophiala dermatitidis* se detectó en el 47% de los lavaplatos, especialmente en las juntas de goma (3).

En 2018 fue publicado el artículo "Microbial Diversity and Putative Opportunistic Pathogens in Dishwasher Biofilm Communities" por Prem Krishnan Raghupathi y sus colaboradores: En el mismo estudiaron la composición microbiana de 24 lavavajillas domésticos diferentes mediante secuenciación de próxima generación. Sus resultados indican la presencia de hongos pertenecientes a los géneros *Candida*, *Cryptococcus* y *Rhodotorula*. Factores como el tiempo de uso, la frecuencia de uso y la fuerza del agua del grifo entrante de los lavavajillas tuvieron un impacto significativo en la composición de las comunidades bacterianas y fúngicas. Los resultados profundizan en la formación de una estructura biogénica preliminar para el establecimiento de biopelículas. Se establece además que las levaduras *Candida* y *Saccharomyces* son microbios potencialmente psicotolerantes que pueden poner en riesgo la salud del ser humano (7).

En un artículo publicado más recientemente Kulesza y sus colaboradores recolectaron 280 muestras de diferentes sitios de lavaplatos: sellos de goma, dispensadores de detergente, rociadores, drenajes de agua. Se aislaron 35 cepas de hongos, las cuales se identificaron con métodos clásicos y moleculares. Las cepas pertenecían a seis especies: *Candida parapsilosis*, *Clavispora lusitanae*, *Dipodascus capitatus*, *Exophiala dermatitidis*, *Meyerozyma guilliermondii* y *Rhodotorula mucilaginosa*. Estas especies se consideran patógenos oportunistas (4).

I.4.2.- Marco referencial:

Actualmente, gracias a la modernización y el acelerado crecimiento urbano, las personas permanecen más tiempo en el hogar, lo que puede aumentar su exposición a microorganismos presentes en ambientes cerrados. Dentro de los

hogares habitan una gran variedad de microorganismos, que ingresan a través del aire mediante ventanas o sistemas de ventilación, el agua, los alimentos, el suelo e incluso a través de la ropa o la piel (4). Estos organismos pueden utilizar como principal vector de transmisión el agua, especialmente si resisten a los diferentes procedimientos de tratamiento utilizados en el suministro de agua potable. Así mismo, algunos de estos microorganismos tienen una buena tolerancia a condiciones abióticas desfavorables, resisten a los productos antimicrobianos y a los cambios de temperatura e incluso la falta de agua (1). Por estas razones, se consideran extremófilos, capaces de multiplicarse en condiciones adversas para cualquier otra forma de vida microbiana (8).

En los hongos, algunos pueden tener alta tolerancia y resistencia a condiciones adversas. Esta resistencia puede llegar a estar relacionada con la capacidad patogénica en seres humanos, que podrían tener un impacto hasta ahora subestimado en el bienestar de la población humana (1). En los últimos años, se ha reportado el aumento de microorganismos, alérgenos y patógenos emergentes en ambientes interiores, que además han creado una percepción en la población general de que los microbios son una amenaza para la salud humana. Los patógenos fúngicos oportunistas humanos que se encuentran con mayor frecuencia son *Candida albicans*, *Aspergillus spp* y *Fusarium spp* (5).

Gracias a la utilización de tratamientos médicos recientes, muchas de estas enfermedades han dejado de ser una amenaza para los humanos, lo que ha aumentado la esperanza de vida. Sin embargo, en los últimos años ha habido un aumento importante en el número de pacientes inmunocomprometidos, lo que significa que estas personas tienen un mayor riesgo de contraer infecciones oportunistas, especialmente aquellas causadas por levaduras (3).

Por paradójico que pueda parecer, los modernos ambientes interiores domésticos ofrecen condiciones propicias para que algunos microorganismos, resistentes y metabólicamente versátiles, se multipliquen activamente. Los principales hongos que colonizan ambientes húmedos en el interior de las viviendas -como baños,

cocinas, lavaplatos y lavadoras- pertenecen a especies de levaduras oportunistas negras, blancas y rojas, además algunas especies de hongos filamentosos (5).

El agua es un factor fundamental para el crecimiento de microorganismos, y estos pueden encontrarse en diversos ambientes domésticos húmedos, mayoritariamente en baños y cocinas. En los baños hay una gran diversidad de especies de levaduras provenientes de la piel y el agua que proliferan fácilmente. En las superficies de los sellos (generalmente de silicona) que se instalan entre la cerámica del piso, el lavamanos y el grifo se pueden encontrar una gran cantidad de hongos como *Fusarium*, *Cryptococcus*, *Cladosporium*, *Aureobasidium*, *Leptotrichia*, *Malassezia*, *Phialophora*, *Exophiala*, entre otras. En las cortinas de la ducha, además del piso y el lavamanos se pueden encontrar especies de *Candida* y *Rhodotorula*. Adicionalmente, la humedad constante del baño favorece el crecimiento de hongos en el estuco y las paredes, especialmente las especies de los géneros *Aspergillus*, *Cladosporium* y *Penicillium* (1).

En ciertas áreas de la cocina también se forman biopelículas, estructuras que se definen como comunidades diversas y filogenéticamente funcionales, compuestas por bacterias, hongos y algas que permanecen adheridas a una superficie de forma estable. Las biopelículas que forman los hongos se consideran un factor de virulencia, ya que garantizan una mayor viabilidad celular y disponibilidad de nutrientes permanente; cuando invaden órganos y tejidos, las biopelículas aumentan la capacidad de los microorganismos de resistir la acción defensiva del sistema inmunitario del hospedador (3). Las áreas que son focos de crecimiento para levaduras son las esponjas, trapos de cocina, el lavaplatos, la refrigeradora, el congelador, desagüe de la cocina y el escurrer platos, que pueden llegar a contaminar los distintos utensilios como cucharas, cuchillos, tablas de picar, entre otros. Estas levaduras pertenecen a los géneros *Apiotrichum*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Cystobasidium*, *Issatchenkia*, *Malassezia*, *Meyerozyma*, *Naganishia*, *Hyphopichia*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Trichosporon*, *Wickerhamiella* y *Wickerhamomyces*. También se observa la presencia de levaduras negras como

Aureobasidium, *Capronia*, *Cyphellophora*, *Cladophialophora*, *Exophiala*, *Fonsecaea*, *Knufia*, *Phialophora* y *Rhinochlamydia* (1).

Los lavaplatos albergan una biota fúngica variada y tolerante a varios factores extremos como altas y bajas temperaturas de agua, alto pH por el uso recurrente de detergentes. Componentes como el caucho, plástico y metal permiten la formación y el crecimiento de biopelículas fúngicas (3). Es por ello que en estudios previos prevalecieron especies como *Exophiala dermatitidis* y *Exophiala phaeomuriformis*, detectadas en el 35% de los lavavajillas examinados en todo el mundo, consideradas poliextremotolerantes y patógeno representando un peligro sanitario y epidemiológico. Los lavavajillas pueden estar colonizados por hongos que se proliferan en la cocina a través de aerosoles y aguas residuales, y se pueden transmitir al tocar superficies contaminadas directamente con las manos. Esto convierte a estos ambientes en una fuente potencial de contaminación fúngica e infecciones, especialmente para pacientes inmunocomprometidos (5).

Las especies más prevalentes encontradas fueron: *Exophiala dermatitidis* y *E. phaeomuriformis*, *Candida parapsilosis*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Cystobasidium slooffiae*, *Meyerozyma guilliermondii*, *Naganishia diffluens*, *Dipodascus capitatus*, *Candida inconspicua*, *Clavispora lusitaniae*, *Metschnikowia fructicola*, *Pichia kudriavzevii*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saprochaete*, *Magnusiomyces* y *Aureobasidium melanogenum* (2)(3).

Las especies de *Exophiala* tienen la capacidad de degradar hidrocarburos aromáticos y asimilar detergentes, pueden sobrevivir en ambientes con alta temperatura, pH elevado y también son tolerantes a la cicloheximida. Debido a estas propiedades, son comunes en ambientes con alta humedad. Las levaduras negras oportunistas, *Exophiala dermatitidis* y *E. phaeomuriformis* tienen un carácter dimórfico, es decir pueden cambiar de levadura a hifa, lo cual constituye un conocido mecanismo de virulencia. La melanina presente en su pared celular les proporciona protección contra la lisis, la fagocitosis, diversos factores

ambientales, el estrés y los agentes antifúngicos. Es por ello que estas levaduras pueden causar infecciones oportunistas de distinta severidad (3).

Dentro del género *Exophiala*, la especie *Exophiala dermatitis* produce exopolisacáridos, responsables de su termotolerancia y formación de biopelículas. La mayoría de los aislados de esta especie que se han detectado en lavaplatos pertenecen al genotipo A, que es el más virulento. Su presencia aumenta en ambientes contaminados con hidrocarburos aromáticos de tipo cíclico o no cíclico. Por lo tanto, es común encontrarla en ambientes domésticos como baños, saunas y lavavajillas. Este microorganismo es capaz de sobrevivir en condiciones desfavorables como los lavaplatos por ser un poliextremófilo, tener un metabolismo activo con un amplio rango de pH (2,5-12,5) y crecer en un amplio rango de temperatura (4-40°C). Por tal motivo pueden causar enfermedades simples como infecciones cutáneas y subcutáneas hasta infecciones sistémicas, pulmonares, neurotrópicas y gastrointestinales, especialmente en pacientes inmunocomprometidos (3).

Las levaduras psicotolerantes son un tipo de levaduras extremófilas capaces de crecer en ambientes a baja temperatura. Algunas sobreviven a temperaturas inferiores a 0 °C pero crecen de manera óptima a 20–25 °C (7). Algunas especies y cepas no solo soportan temperaturas bajas sino otras condiciones ambientales extremas, como altas presiones, baja disponibilidad de nutrientes y/o agua, y exposición de radiación de luz ultravioleta (UV)(6). Estas bajas temperaturas pueden afectar diversas funciones celulares, como la viscosidad del agua, la integridad celular, la cinética enzimática y las interacciones macromoleculares. Los microorganismos que sobreviven en ambientes fríos han desarrollado estrategias de adaptación para garantizar el funcionamiento de sus procesos vitales en estas condiciones. Así, los psicotolerantes han desarrollado estos mecanismos para contrarrestar los factores de estrés asociados con los ambientes fríos (7).

El propósito de esta investigación es identificar la existencia o ausencia de levaduras capaces de tolerar el frío en la región andina de Ecuador, que oscila entre los 13°C y 16°C promedio durante todo el año y depende de la altitud. En particular, el estudio se enfoca en la provincia de Cañar, donde las temperaturas pueden descender hasta los 6°C por las noches, por lo que es posible la presencia de estas levaduras en ambientes extremos domésticos. Teniendo esto en cuenta, el peligro de la transmisión de enfermedades por levaduras psicrotolerantes patógenas podrían llegar a constituir un riesgo potencial para la salud.

CAPÍTULO II
METODOLOGÍA

II.1.- DISEÑO DE INVESTIGACIÓN

La investigación es de tipo mixta, observacional y descriptiva con corte transversal.

II.2.- POBLACIÓN Y MUESTRA

Tiene que estar en congruencia con el objetivo de investigación planteado y enfoque de investigación asumido. Compuesto por:

II.2.1. UNIVERSO - POBLACIÓN:

Al no ser un estudio epidemiológico, no se aplica. Sin embargo, se hará lo posible por incluir al menos 10 lavaplatos pertenecientes a igual número de departamentos.

II.2.2 MUESTREO Y MUESTRA: El punto de muestreo se establece donde se aprecie mayor cantidad de biofilm en cada lavaplatos.

II.3.- DEFINICIÓN Y CLASIFICACIÓN DE LAS VARIABLES

1. Especie

Definición: Conjunto de organismos morfológicamente similares capaces de entrecruzarse.

Clasificación: Cualitativa politómica

Indicador: Pruebas bioquímicas

Escala de medición: Clasificación taxonómica: *Candida albicans*, *Aspergillus niger*

2. Medios de cultivo

Definición: Es un conjunto de nutrientes y otros componentes que proporcionan las condiciones necesarias para el crecimiento de microorganismos.

Clasificación: Cualitativa politómica

Indicador: Nutrientes características

Escala de medición: Agar Sabouraud Dextrosa, Agar papa dextrosa

3. Presencia o ausencia de factores de virulencia

Definición: La presencia de moléculas producidas por microorganismos facilita la invasión y resistencia de patógenos.

Clasificación: Cualitativa dicotómica

Indicador: Detección molecular

Escala de medición: Si presenta o no presenta

4. Producción de proteasa

Definición: Síntesis de una enzima hidrolasa, proteasa, también conocida como una enzima proteolítica; que hidrolizan los enlaces peptídicos de proteínas

Clasificación: Cualitativa dicotómica

Indicador: Pruebas bioquímicas

Escala de medición: Si produce o no produce

5. Producción de lipasas

Definición: Síntesis de una enzima hidrolasa lipolítico

Clasificación: Cualitativa dicotómica

Indicador: Pruebas bioquímicas

Escala de medición: Si o no

6. Capacidad de penetración

Definición: La habilidad que tienen ciertos agentes, como bacterias, virus o pesticidas, para entrar en el cuerpo de los microorganismos y afectar su estructura o función.

Clasificación: Cualitativa dicotómica

Indicador: Ensayo de penetración

Escala de medición: Si o no

7. Temperatura óptima de crecimiento

Definición: Es la temperatura que permite el máximo crecimiento de un microorganismo.

Clasificación: Cuantitativa continua

Indicador: Termómetro, crecimiento

Escala de medición: grados centígrados (°C)

8. Ubicación filogenética

Definición: Se refiere generalmente a la posición de una especie o grupo de organismos en un árbol filogenético, que representa las relaciones evolutivas entre ellos.

Clasificación: Cualitativa politómica

Indicador: Árbol filogenético

Escala de medición: Esquema

9. Concentración mínima inhibitoria

Definición: Es la menor concentración de un compuesto necesario para inhibir el crecimiento de un patógeno.

Clasificación: Cuantitativa continua

Indicador: Método E-test en medio Mueller-Hinton (antibiograma)

Escala de medición: $\mu\text{g/ml}$

10. Morfología de la colonia

Definición: Conjunto de características de las colonias determinadas de forma visual.

Clasificación: Cualitativa nominal-discreta

Indicador: Morfología

Escala de medición: Lisa, rugosa y plegada, etc

11. Color

Definición: Las colonias pueden tener diferentes colores, debido a diversos factores, como la composición del medio de cultivo, la especie de levadura y las condiciones de cultivo.

Clasificación: Cualitativa nominal-discreta

Indicador: Morfología

Escala de medición: Azul, rojo, verde, magenta, etc

12. Forma

Definición: Apariencia física de las células de levadura durante el proceso de crecimiento y reproducción

Clasificación: Cualitativa nominal-discreta

Indicador: Morfología

Escala de medición: Circular, irregular, filamentosa

13. Tipo de borde

Definición: Apariencia y características del límite externo de una colonia de levaduras en un medio de cultivo sólido

Clasificación: Cualitativa nominal-discreta

Indicador: Morfología

Escala de medición: Entero, lobulado, desflecado, rizoide, etc.

14. Elevación

Definición: Es la altura o prominencia de una colonia de levaduras en un medio de cultivo sólido.

Clasificación: Cualitativa nominal-discreta

Indicador: Morfología

Escala de medición: Plana y extendida, elevada y limitada, umbilicada.

15. Textura

Definición: Características físicas y superficiales de una colonia de levaduras en un medio de cultivo sólido.

Clasificación: Cualitativa nominal-discreta

Indicador: Morfología

Escala de medición: Granulosa, pulverulenta, vellosa, aterciopelada, algodonosa.

16. Estructura de la pared celular

Definición: Composición y organización de la pared celular de las células de levadura.

Clasificación: Cualitativa nominal-discreta

Indicador: Morfología

Escala de medición: Forma, presentación, hifa o pseudohifa, gemación o ascosporas.

II.4.- PROCEDIMIENTOS, TÉCNICAS E INSTRUMENTOS PARA LA OBTENCIÓN DE DATOS.

Aislamiento Primario

Para la selección de los ambientes domésticos que se incluyen en el estudio se considerarán viviendas con características similares, como los departamentos de familias de clase media, en donde las cocinas cuenten con mesones de granito o mármol, además de lavaplatos manuales de acero inoxidable. La toma de muestras se realizará en distintas áreas de estos lavaplatos como los bordes, batea y la base; utilizando un hisopo estéril con solución salina. A continuación, las muestras serán introducidas y transportadas en tubos de solución salina estéril. En

el laboratorio, se realizarán diluciones seriadas de las suspensiones microbianas desde 10^{-1} a 10^{-4} . Seguidamente se inocularán 100 μ l de cada una de las diluciones de forma homogénea, con un rastrillo, sobre la superficie del agar Sabouraud-Dextrosa, medio universal para el cultivo de hongos. La incubación de los medios será a 30°C , por varios días hasta la visualización de colonias. Posteriormente, las colonias individuales se transferirán a un medio fresco con el objetivo de purificar las colonias aisladas. A continuación, se registrarán las características macroscópicas de la morfología y se preservarán las cepas puras en tubos con tapa de rosca que contenga agua destilada estéril.

Evaluación macroscópica y microscópica de los aislados de levaduras

Se registrará el aspecto de las colonias de cada aislado en diferentes medios de cultivo, prestando atención a características distintivas como el borde, elevación, color, textura, brillo, pigmentación y forma. Para determinar la morfología microscópica de las células, se prepararán suspensiones con solución salina de cada aislado y se visualizarán bajo el microscopio con diferentes aumentos (100X y 400X).

Estimación de la temperatura óptima de crecimiento

Se prepararán suspensiones de cada aislado, ajustadas a una densidad óptica de 0.5 en la escala McFarland. Estas diluciones se utilizarán para inocular 10 μ l en la superficie de 5 réplicas de medio agarizado (Sabouraud Dextrosa). Cada una de las réplicas se incubará a diferentes temperaturas: 5, 12, 20, 30 y 37°C . Después de 48 horas de incubación, se comparará el tamaño y apariencia de la biomasa de cada colonia.

Expresión de factores de virulencia

Se utilizará un medio agarizado enriquecido con sangre desfibrinada de cordero al 2,04% v/v y glucosa al 3% para la detección de hemolisinas (9).

Para evaluar la actividad de la fosfolipasa, se preparará medio Sabouraud Dextrosa al que se le agregará yema de huevo liofilizado al 3% (v/v), cloruro de sodio y cloruro de calcio (10).

Para la determinación de proteasas, se utilizará Agar Nutritivo al que se le añadirá leche semidescremada pasteurizada al 1% (11).

Cada una de las cepas de levadura se inoculará en la superficie de cada medio a partir de una suspensión ajustada a una densidad óptica de 0,5 unidades McFarland. A continuación, se incubarán las placas de Petri a la temperatura adecuada para su crecimiento, y se observará si se forman halos alrededor de las colonias, lo que indicaría actividad enzimática.

El protocolo de Cullen y colaboradores nos permitirá determinar la capacidad de penetración de sustratos agarizados. En primer lugar, se prepararán diluciones seriadas de suspensiones de levaduras en solución salina ajustadas a 0,5 unidades McFarland, desde 10^{-1} hasta 10^{-4} . A continuación, se colocarán en la superficie del medio de cultivo SD, 5 μ l de cada dilución. Los cultivos se incubarán a la temperatura óptima de cada aislado durante 5 días; tras ello, se eliminarán las células superficiales mediante lavado suave con agua destilada, aplicando un suave roce con un dedo húmedo. Para poder observar la penetración de las hifas bajo el microscopio óptico utilizando un aumento de 100X y 400X, se cortará el agar en láminas delgadas con ayuda de un bisturí estéril(12).

Extracción de ADN

Se empleará la técnica de lisis alcalina para extraer el ADN genómico de los aislados de levaduras. Se preparará una mezcla de suspensión de levaduras con una solución de SDS al 0.025% y NaOH al 0.025 N, la cual se incubará a 95 °C durante 20 minutos en un termobloque THERMO SCIENTIFIC. Luego de la incubación, se centrifugará el lisado obtenido a 12.000 × g y se almacenará a -20 °C hasta que sea necesario su uso.

Amplificación de la región ITS

Se emplearán los cebadores ITS1 - ITS4 para la amplificación por PCR de la región ITS (18). La mezcla de reacción para cada amplificación por PCR tendrá un volumen total de 25 µl y estará compuesta por 12.5 µl de Master Mix, 2.0 µl del cebador ITS1, 2.0 µl del cebador ITS4, 6.5 µl de agua ultra pura, y 2.0 µl de ADN. La amplificación se llevará a cabo en un termociclador Bioneer aplicando un programa térmico que inicia con una desnaturalización de 5 minutos a 95 °C, seguido por 38 ciclos de amplificación (1 minuto de desnaturalización a 58 °C, 1 minuto de alineación a 72 °C y 10 minutos de elongación a 72 °C), finalizando con una elongación de 10 minutos a 72 °C (13).

Electroforesis de ADN en geles de agarosa

La verificación de la amplificación de la región ITS se llevará a cabo por medio de una electroforesis en gel de agarosa, empleando SYBR Safe como intercalante fluorescente. Se procederá a preparar el gel con una concentración del 1.5% (p/v) en buffer TAE y la electroforesis se efectuará bajo una corriente constante de 90 voltios. Posteriormente, en un transiluminador de rayos UV se visualizarán los productos de la amplificación a través del uso de SYBR Safe.

Secuenciación y análisis de secuencias con BLAST-N

Para su secuenciación por medio del método de Sanger automatizado, los amplicones resultantes de la PCR se enviarán a la empresa Macrogen en Seúl, Corea del Sur, para que se procese. Una vez obtenidas las secuencias, se compararán con las que se encuentran disponibles en las bases de datos públicas y gratuitas de acceso, como GenBank y EMBL-EBI, mediante el uso del algoritmo BLAST-N (14).

II.5.1.- PROCEDIMIENTOS ESTADÍSTICOS Y ANÁLISIS DE DATOS

La presentación de los datos se realizará mediante paneles fotográficos que ilustrarán los resultados para cada cepa, y mediante tablas que resumirán la información obtenida.

II.6.- ASPECTOS ÉTICOS

Al tratarse de un estudio enfocado en el análisis de levaduras presentes en los lavaplatos, es decir, un objeto inanimado no es necesario solicitar permiso al CEISH.

CAPÍTULO III
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Resultados

III.1.- Descripción de los lavaplatos donde se realizó la toma de muestra

Se recolectaron muestras de 10 lavaplatos, específicamente elegidos de cocinas residenciales en la ciudad de Cañar (provincia de Cañar, Ecuador). Todos los lavaplatos compartían características similares, notándose especialmente la presencia de materiales como acero inoxidable y granito, en los cuales los lavadores están empotrados. Las muestras se tomaron de áreas accesibles para el usuario dentro de cada lavaplatos, tales como el sello de goma, el desagüe, la boquilla lateral y los bordes (Anexo 1).

En las Figuras 1 y 2 se observan las zonas específicas donde se tomaron las muestras de los 10 lavaplatos seleccionados. Estas zonas fueron seleccionadas considerando la presencia de biofilm negro, especialmente en los bordes de los lavaplatos, así como manchas que indican la posible presencia de microorganismos.

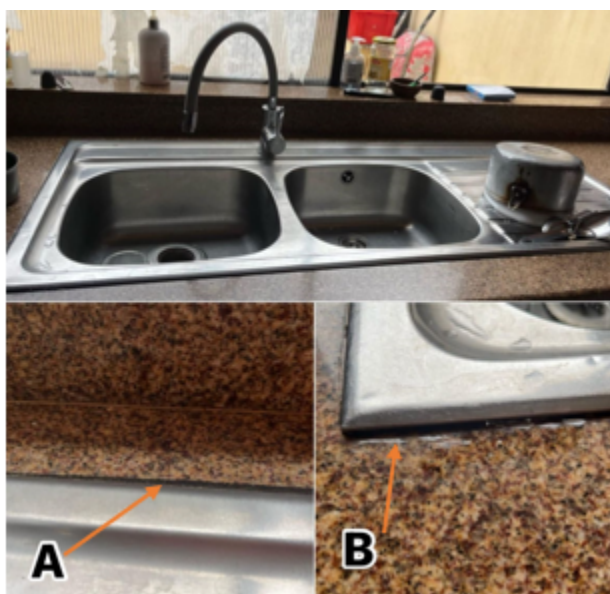


Figura 1. Zonas de muestreo del lavaplatos del departamento 1. (A) Biofilm formado en el vértice del granito (B) Biofilm formado en el borde esquinero



Figura 2. Zona de muestreo del lavaplatos del departamento 2. (A) Biofilm formado en la base del grifo (B) biofilm formado en el borde

III. 2.- Descripción de los aislamientos primarios de microorganismos.

Las muestras de los biofilms colectados en la mayoría de los lavaplatos evidenció una variedad de microorganismos, al observar los resultados de los aislamientos primarios (bacterias y hongos). En cada uno de los medios de cultivo, se identificó una diversidad considerable de formas microbianas que se manifestaron en variados colores y texturas. Se observó una gran variedad de colonias de color blanco, rosado y crema algunas de las cuales presentaban brillo y textura lisa (Figura 3).

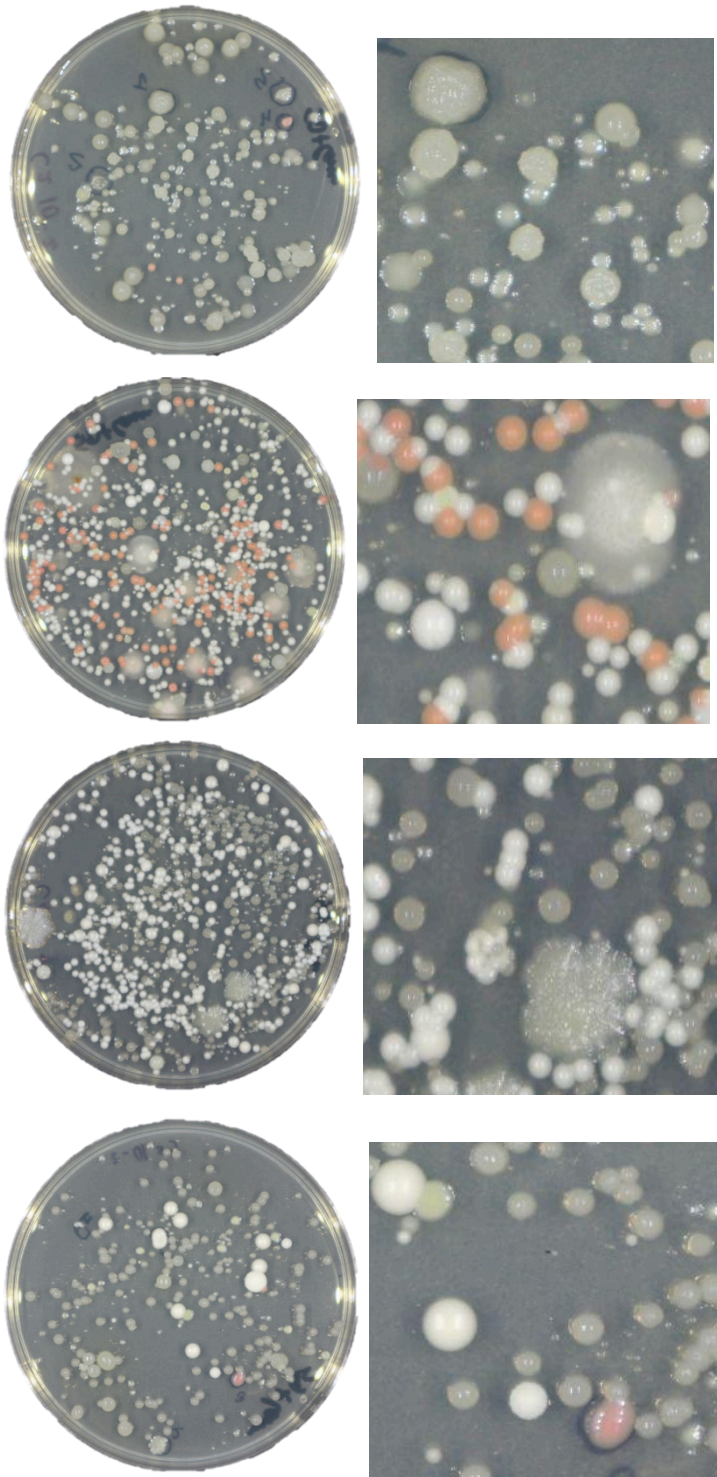


Figura 3. Aislamientos primarios. Se presentan los resultados obtenidos con algunas de las muestras

III.3.- Purificación de aislado

A partir de los cultivos primarios, se procedió a purificar un total de 45 aislados mediante repiques sucesivos (Anexo 3). En la Tabla 1, se presenta el desglose de los aislados puros obtenidos a partir de cada departamento. Mediante la caracterización morfológica de las células de cada aislado, llevada a cabo con la asistencia de un microscopio óptico, se logró distinguir entre bacterias y levaduras. Los aislados puros de levaduras (27 en total) fueron preservados en tubos que contenían agua destilada estéril, para su posterior identificación y caracterización.

Tabla 1. Aislamientos realizados según departamento y zona de muestreo.

Zona de muestra	Apartamento	Medio	N° Aislados	Total
Biofilm	1	Agar Sabourad	2	2
Biofilm	2	Agar Sabourad	1	1
Biofilm	3	Agar Sabourad	4	4
Biofilm	4	Agar Sabourad	2	2
Biofilm	5	Agar Sabourad	3	3
Biofilm	6	Agar Sabourad	3	3
Biofilm	7	Agar Sabourad	1	1
Biofilm	8	Agar Sabourad	4	4
Biofilm	9	Agar Sabourad	4	4
Biofilm	10	Agar Sabourad	3	3
			Total	27

III.4.- Selección de aislados para caracterización

Se llevó a cabo una selección minuciosa de 12 morfotipos de levaduras que presentaron claras diferencias después de ser sometidos a procesos de purificación. Las características destacadas de cada uno de los aislados seleccionados se presentan en la tabla a continuación.

Tabla 2. Caracterización morfológicas y celulares de los seleccionados, inoculados en Agar Sabouraud

Código	Apartamento	No. Colonia	Fenotipo Colonias									Otro
			Forma	Color	Brillo	textura	Borde	Tamaño	Elevación	Transparencia	Consistencia	
C1-1	1	1	C	B	B	L	E	P	C	O		Gemación
C1-2	1	2	I	C	S	L	R	P	C	O		Gemación
C3-9	3	9	C	R	B	L	E	P	C	O		Gemación
C4-1	4	1	C	B	B	L	E	M	E	O		
C6-6	6	6	C	R	B	L	E	G	P	O	M	Ovoide/ Gemación
C8-2	8	2	C	R	B	L	E	P	C	O		Ovoide/ Gemación
C8-3	8	3	F	C	S	R	F	P	C	O		Seudohifa
C8-4	8	4	C	C	S	L	E	P	C	O		Gemación
C9-2	9	2	C	R	B	L	E	P	E	O		Ovoide/ gemación
C9-4	9	4	C	C	B	L	E	P	E	O		Redondas
C10-1	10	1	I	B	B	R	R	M	C	O		
C10-3	10	3	I	B	S	R	R	P	U	O		Ovoide

Forma: C = circular; R = rizoide; F = filamentosa; I = irregular; Color: A = amarillo; C = crema; R = rosado; N = naranja; B = blanco; Textura: L = lisa; R = rugosa; Tamaño: G = grande; M = mediano; P = pequeño; p = puntiforme; Transparencia: O = opaca; T = transparente; Brillo: B = brillante; S = sin brillo; Borde: E = entero; R=rizoide; F = filamentoso; O = ondulado; L = lobulado; r = rizado; Elevación: C = convexa; P = plana; E = elevada; U = umbilicada; Consistencia: D = dura; S = suave; M = mucoide

Las características morfológicas de las cepas, discriminadas en colonias y células, se presentan en las Figuras 4 y 5. En cuanto a la forma de las colonias, se observaron ocho colonias con una forma circular, tres con forma irregular y una filamentosa. En términos de

color, cuatro colonias fueron blancas, otras cuatro fueron de tonos cremosos, y cuatro más variaron en tonalidades rosadas. En cuanto al brillo, la mayoría de colonias presentaron un brillo perceptible. Respecto a la textura, nueve colonias fueron lisas. En cuanto al borde, ocho colonias tenían un borde entero, tres rizoides y una filamentosa. En términos de tamaño, nueve fueron pequeñas, dos medianas y una grande. En cuanto a la elevación, siete colonias tenían una elevación convexa, tres elevadas, una plana y una umbilicada. Finalmente, todas las cepas mostraron una transparencia opaca.

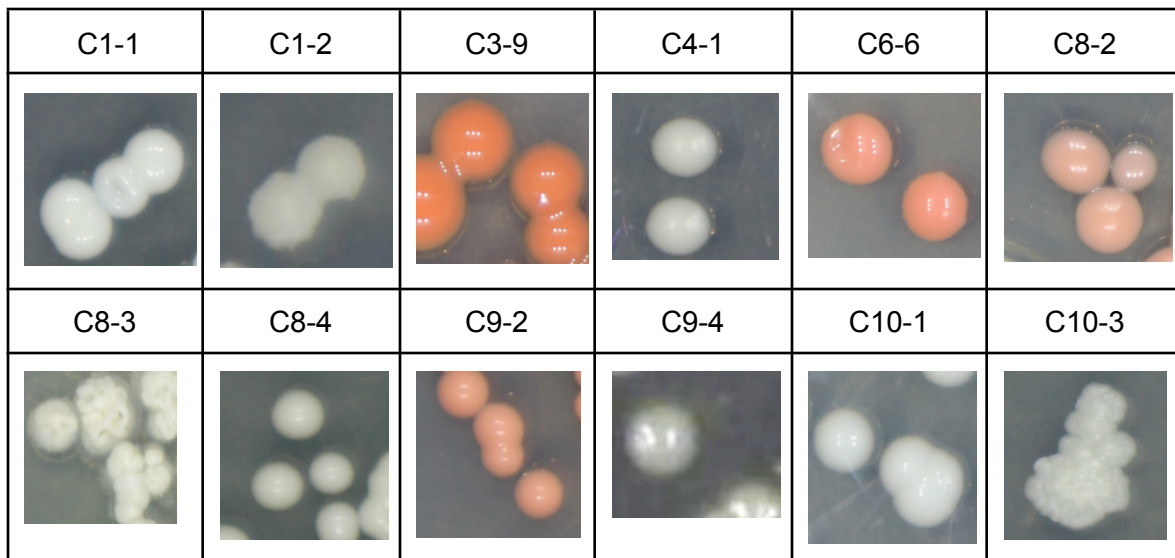


Figura 4. Características macroscópicas de las cepas aisladas

En cuanto a la morfología celular, las características principales de los aislados se pueden observar en la Figura 5. Como podemos observar, la mayoría de los aislados presentaron células ovoides con una reproducción por gemación.

C1-1	C1-2	C3-9	C4-1	C6-6	C8-2
------	------	------	------	------	------

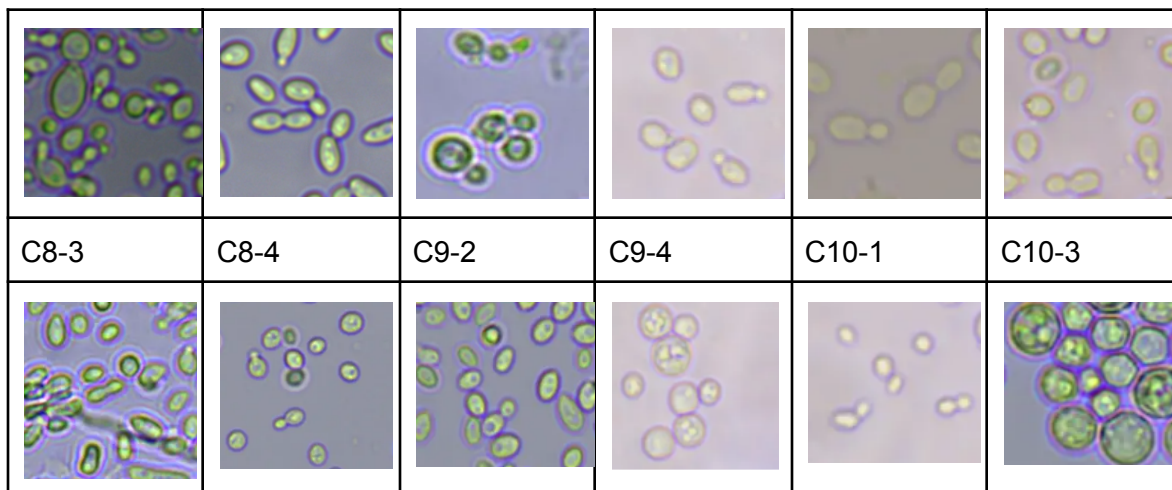


Figura 5. Características microscópicas de las 12 colonias aisladas

III.5.- Crecimiento de levaduras a diferentes temperaturas

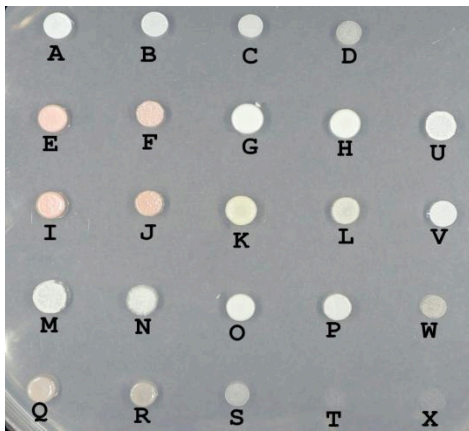
En la Tabla 3 y Figura 6, se observa que el desarrollo de las levaduras varió según la temperatura a la que estuvieron expuestas. Se encontró que la mayor cantidad de biomasa se obtuvo entre 25 °C y 30 °C. No obstante, al aumentar la temperatura, algunos de los aislados mostraron una marcada reducción en su crecimiento, excepto en el caso de los aislados (C9-4 y C10-3) que crecieron a 37 °C. Destaca el hecho de que casi todos los aislados, con excepción de dos (C9-4 y C10-3) son capaces de multiplicarse a temperaturas cercanas a los 15 °C, lo cual nos permite clasificarlas como posibles “psicrotolerantes”.

Tabla 3. Crecimiento de los 12 aislados a diferentes temperaturas

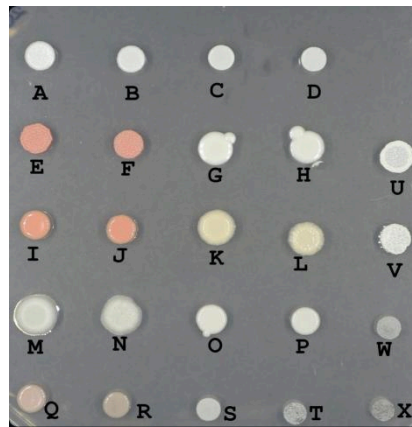
Código	Aislado	15 C	20 C	25 C	30 C	37 C
A	C1-1	++	++	++	+++	+
B	C1-1(10^{-1})	++	++	++	+++	-
C	C1-2	++	++	++	+++	+
D	C1-2 (10^{-1})	++	++	++	+++	+
E	C3-9	++	++	+++	+++	+

F	C3-9 (10^{-1})	++	++	+++	+++	-
G	C4-1	++	++	+++	+++	+
H	C4-1 (10^{-1})	++	++	+++	+++	+
I	C6-6	++	++	++	++	+
J	C6-6 (10^{-1})	++	++	++	+	-
K	C8-2	++	++	++	+++	+
L	C8-2 (10^{-1})	++	++	++	+++	-
M	C8-3	++	+++	+++	+++	+
N	C8-3 (10^{-1})	++	+++	+++	+++	-
O	C8-4	++	++	++	++	+
P	C8-4 (10^{-1})	++	++	++	++	-
Q	C9-2	++	++	++	++	-
R	C9-2 (10^{-1})	++	++	++	++	-
S	C9-4	+	+	++	+++	++
T	C9-4 (10^{-1})	-	+	++	+++	++
U	C10-1	++	++	+++	+++	+
V	C10-1 (10^{-1})	++	++	+++	+++	-
W	C10-3	+	+	++	+++	++
X	C10-3 (10^{-1})	-	+	++	+++	++

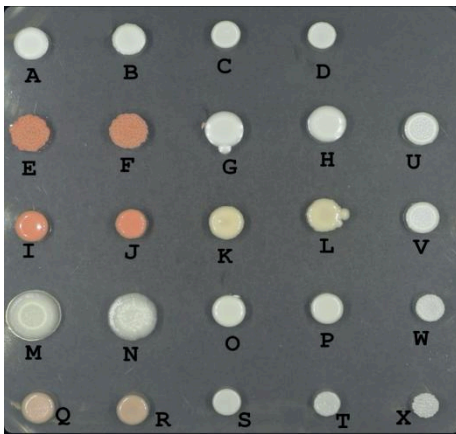
Además, como se muestra en la Figura 6, se pudo observar que los aislados experimentan cambios en su coloración a medida que la temperatura varía. Un caso destacado es el aislado K (C8-2) y L (C8-2 (10^{-1})), que inicialmente presenta un color blanco a temperatura ambiente (aprox. 20 °C), luego cambia gradualmente a un tono amarillento, volviéndose más evidente a los 30 °C.



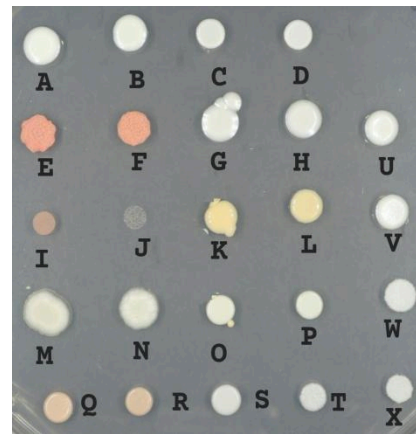
15°C



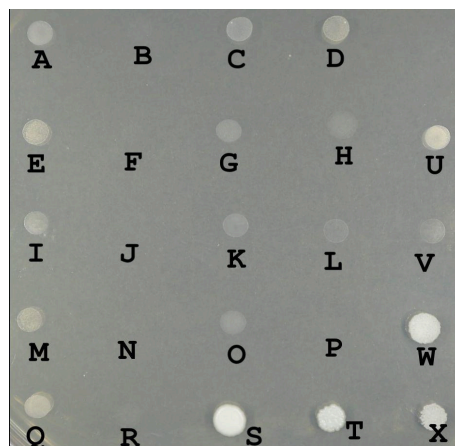
20 °C



25 °C



30 °C



37 °C

Figura 6. Crecimiento de los aislados puros a diferentes temperaturas en medio Sabouraud Dextrosa suplementado con Cloranfenicol

III.6.- Expresión de factores de virulencia

Se realizaron una serie de pruebas con el fin de explorar en mayor detalle las distintas características fenotípicas de cada aislado. A continuación, se presentarán los resultados obtenidos en estos ensayos.

III.6.1.- Actividad de fosfolipasas, proteasas y hemólisis

La Tabla 4 muestra los resultados de los ensayos realizados en Agar SD suplementado con yema de huevo para detectar la actividad fosfolipasa. A las 96 horas determinamos que solo 2 aislados producen fosfolipasas a una temperatura de 25 C.

En la misma tabla se presentan los ensayos realizados en Agar sangre para analizar la capacidad de producir hemólisis. A las 96 horas de incubación solo 3 aislados resultaron positivos para esta prueba.

El cultivo de los aislados seleccionados en medio agarizado con leche descremada permitió determinar, tras 72 horas de incubación, que la mayoría de ellos (11 en total) producen proteasas.

De todos los aislados, solo uno (el C3-9) produce las tres enzimas hidrolíticas, mientras que tres (C4-1, C6-6 y C10-1) producen dos de ellas.

Aislado	Actividad fosfolipasas	Actividad hemolisinas	Actividad proteasas
C1-1	-	-	+
C1-2	-	-	+
C3-9	+	+	++
C4-1	-	+	+
C6-6	+	-	+++
C8-2	-	-	-
C8-3	-	-	++
C8-4	-	-	+
C9-2	-	-	+
C9-4	-	-	++
C10-1	-	+	++
C10-3	-	-	++

Tabla 4. Actividad de fosfolipasas, proteasa y hemolisinas de los 12 aislados seleccionados

III.6.2.- Capacidad de penetración del sustrato.

Este ensayo, diseñado para determinar la capacidad de penetración de cada aislado cuando es cultivado en medio agarizado (simulando un tejido animal o vegetal) reveló que cuatro de ellos (C1-1, C1-2, C8-3 y C10-1) son capaces de hacerlo. Los resultados presentados en la Figura 7 muestran las superficies en agar SD antes y después de eliminar las células superficiales

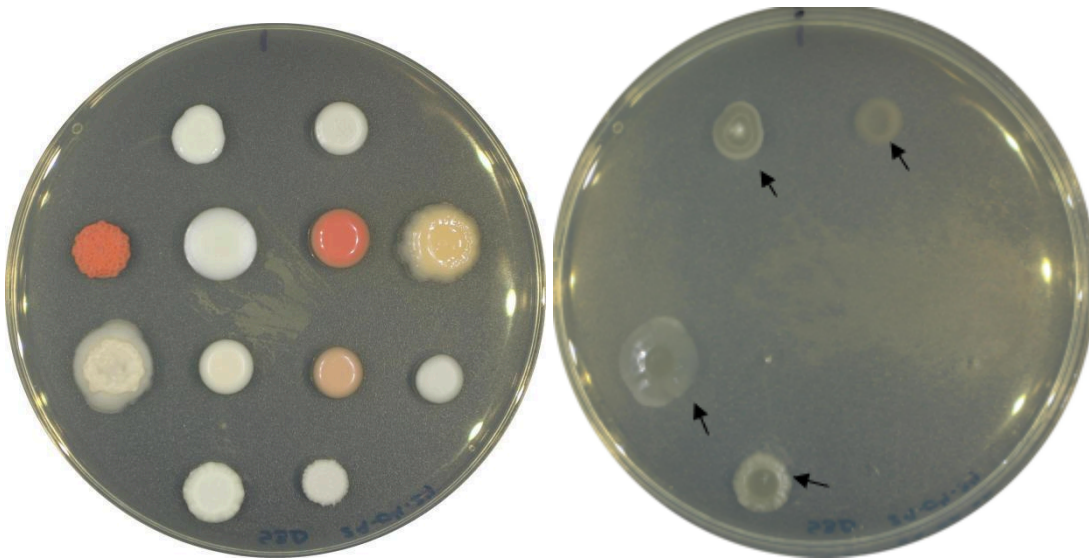
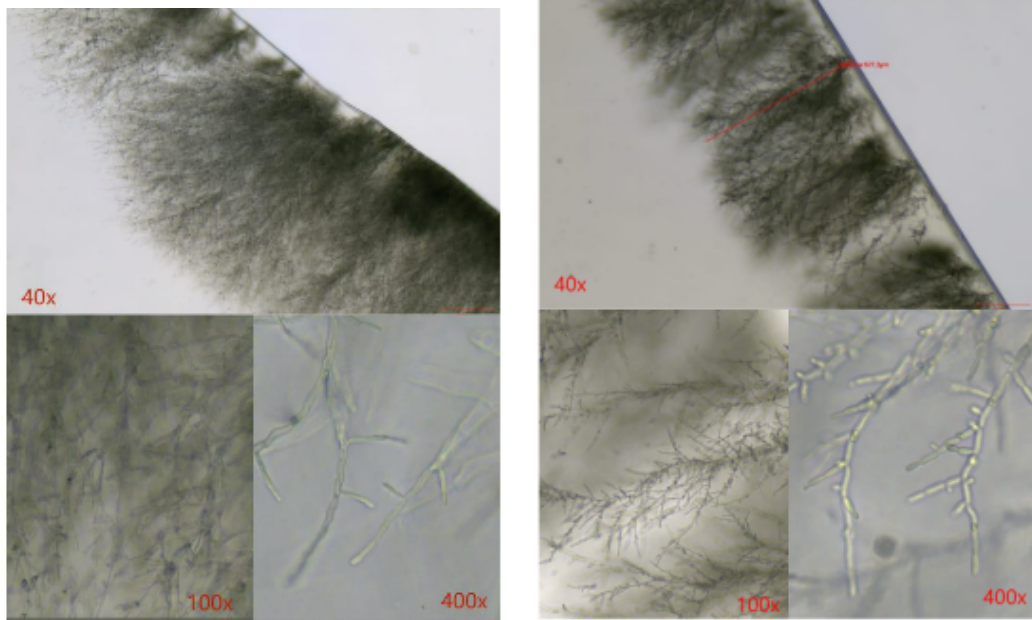


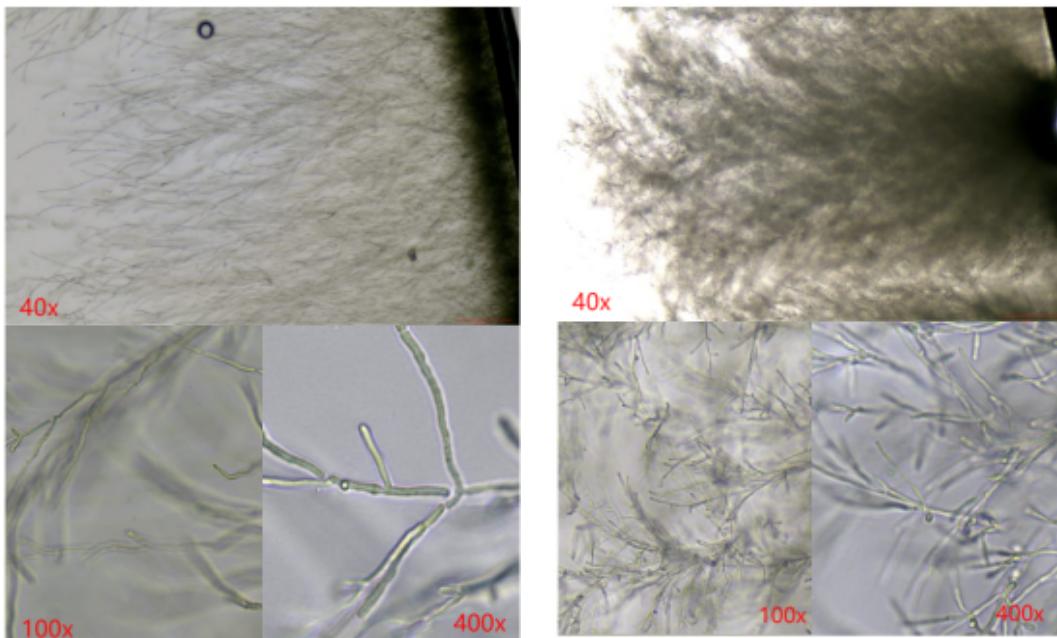
Figura 7. Capacidad de penetración de 12 aislados seleccionados sembrados en Agar SD antes y después del lavado. Las flechas señalan claramente a los 4 aislados que penetran activamente el sustrato.

Para confirmar estos hallazgos, se llevaron a cabo cortes transversales del medio de cultivo situado exactamente debajo de cada colonia para su observación bajo el microscopio. En la Figura 8 se muestran estos resultados, observados en ampliación de 40x, 100x y 400x. Se identifican hifas que penetran activamente el medio, así como ramificaciones de las mismas. En este contexto, la distancia mínima de penetración fue de 200 μm , seguida de 600 μm , y la mayor distancia de penetración observada fue de 1400 μm .



C1-1

C1-2



C8-3

C10-1

Figura 8. Penetración del sustrato agarizado por parte de los aislados de levaduras (observadas con el lente de 40X, 100X y 400X)

III.7.- Amplificación de la región ITS

Una vez extraído el ADN genómico mediante la técnica de lisis alcalina a altas temperaturas, se llevó a cabo la amplificación de la región ITS del genoma mediante PCR. Los resultados mostraron que en 8 de los 12 aislados se logró la amplificación, mientras que 4 aislados resultaron negativos para este procedimiento. En la Figura 9 se muestran las bandas correspondientes a los productos de amplificación obtenidos mediante PCR, tras ser sometidos a electroforesis en gel de agarosa.



Figura 9. Amplificación por PCR de la región ITS. Carril 1: control negativo; Carril 2: control positivo; Carril 3: Aislado C1-1; Carril 4: Aislado C 1-2; Carril 5: Aislado C 3-9; Carril 6: Aislado C 4-1; Carril 7: Aislado C 6-6; Carril 8: C8-2; Carril 9: Aislado C 8-3; Carril 10: Aislado C 8-4; Carril 11: Aislado C9-2. Carril 12: Aislado C 9-4. Carril 13: Aislado C 10-1; Carril 14: Aislado C 10-3

III.8.- Secuenciación y análisis de secuencias de la región ITS

A partir de los fragmentos de amplificación que se generaron mediante PCR con primers específicos para la región ITS, se obtuvieron secuencias nucleotídicas mediante la técnica de secuenciación automatizada de Sanger. Esto fue posible gracias al servicio prestado por la empresa Macrogen INC.(Seúl, Corea). Los resultados de esa secuenciación se presentan en el anexo 6, los espectrogramas que se generaron a partir de la secuenciación se presenta a título de ejemplo en el anexo 7.

A partir del análisis de estas secuencias mediante el programa BLAST-N, previa depuración manual de las regiones que no dieron origen a picos de fluorescencia, se logró determinar las secuencias con mayor porcentaje de identidad y, de esta manera al "vecino filogenéticamente más cercano" de cada una de los aislados, los resultados se presentan en la Tabla 5.

Cepa	Vecino más cercano (filogenia)	Longitud de la secuencia	Porcentaje de identidad	Porcentaje de cobertura	Referencia
C1-1	<i>Yamadazyma takamatsuzukensis</i> CBS 10916	598	98,98	98	KY105955.1
C3-9	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> CBS:6727	565	98,93	98	KY104848.1
C4-1	<i>Barnettozyma californica</i> XZ1995-1	530	100,00	99	MW710166.1
C6-6	<i>Rhodotorula glutinis</i> TY6	550	98,72	99	MK226290.1
C8-3	<i>Trichosporon otae</i> MF120	478	96,57	97	MH487608.1
C8-4	<i>Filobasidium uniguttulatum</i> CBS:4257	575	99,30	99	KY103443.1
C9-2	<i>Cystobasidium slooffiae</i> Y. H. Yeh I0327	525	99,04	99	MK336491.1
C10-1	<i>Yamadazyma takamatsuzukensis</i> CBS 10916	595	100	100	NR_144770.1

Tabla 5. Resultados del análisis de las secuencias nucleotídicas mediante la aplicación BLASTN

De los ocho aislados, que se lograron secuenciar, dos pertenecen al género *Rhodotorula*, otros dos a la especie *Yamadazyma takamatsuzukensis*, y los cuatro a las especies *Barnettozyma californica*, *Trichosporon otae*, *Filobasidium uniguttulatum* y *Cystobasidium slooffiae*.

Discusión

El propósito principal de esta investigación era determinar la variedad de levaduras psicotolerantes que existen en ambientes domésticos extremos en la región de la Sierra ecuatoriana. Esto se debe a que hay poco conocimiento sobre estas levaduras en Latinoamérica, particularmente en Ecuador. Los hallazgos muestran una amplia gama de cepas de levaduras psicotolerantes en los ambientes estudiados.

Entre los aislados estudiados están presentes cepas filogenéticamente muy cercanas a las especies *Rhodotorula mucilaginosa*, *Yamadazyma takamatsuzukensis*, *Barnettozyma californica* y *Trichosporon oatae*, identificadas gracias al empleo del algoritmo BLAST-N. Además, la mayoría de las cepas demostraron actividad proteolítica, mientras que una proporción más pequeña demostró la capacidad de producir fosfolipasas y hemolisinas, lo cual es esencial para sugerir su potencial patogénico. Por ello, esta investigación proporciona información útil sobre la variedad y características de las levaduras psicotolerantes en entornos domésticos extremos de la sierra ecuatoriana. Esto establece una base sólida para futuras estrategias de prevención y control de infecciones en estos entornos.

Los resultados obtenidos indican, además la presencia de una diversidad relativamente grande de levaduras en lavaplatos domésticos. En este grupo incluimos a bacterias y hongos con una diversidad de características morfológicas. En relación con este punto estudios recientes sobre microbiomas domésticos (3) han encontrado una amplia gama de microorganismos en ambientes similares que coinciden con la diversidad de morfotipos observados. La elevada frecuencia de colonias blancas, rosadas y crema, algunas con brillo y texturas lisas, refleja la capacidad adaptativa de estos microorganismos para sobrevivir en condiciones extremas.

Las diferentes etapas del proceso de purificación permitieron obtener 45 aislados puros, incluyendo bacterias y levaduras. Estos aislados se conservaron para estudios posteriores. La caracterización precisa de los microorganismos requiere este proceso. Hernández (2016) menciona que cuando se lleva a cabo la bioprospección de microorganismos en ambientes extremos, la preservación en tubos con agua destilada

estéril hasta su identificación final es una práctica estándar que garantiza la pureza y viabilidad de los aislados. Una identificación preliminar fue posible gracias a la caracterización morfológica por microscopía óptica, lo que facilitó las etapas posteriores de análisis genético y bioquímico (20).

Además, se utilizaron técnicas específicas para aislar y caracterizar microorganismos, utilizando Agar Sabouraud en la tabla para el cultivo de hongos y levaduras. La variabilidad en la distribución de los aislados por apartamento puede ser causada por factores ambientales específicos o diferencias en la colonización microbiana y la eficiencia del muestreo. La diferencia entre los 27 aislados de la tabla y los 45 aislados primarios mencionados se debe a que, en el estudio, solo se incluyeron las levaduras como muestra de estudio.

En el caso de la selección de aislados para la caracterización posterior, nos basamos en diferencias morfológicas evidentes. La diversidad fenotípica es un criterio clave para la selección de muestras representativas. De hecho, la variabilidad morfológica (fenotípica) observada (en forma, color, brillo, textura y otros parámetros morfológicos) pone de manifiesto la diversidad taxonómica de las levaduras en ambientes domésticos. Estos resultados van en la dirección de estudios anteriores (2) que destacan la gran diversidad de levaduras que colonizan este tipo de ambientes. La mayoría de los aislados mostraron reproducción por gemación y células ovóides, características comunes en levaduras psicrotolerantes adaptadas a temperaturas bajas.

Según los resultados obtenidos la temperatura ideal para el crecimiento de levaduras es entre 25 y 30 °C, con una marcada disminución a temperaturas más altas, excepto en algunos aislados. En investigaciones sobre levaduras psicrotolerantes (6), se descubrió que las temperaturas entre 25 y 30°C promueven el crecimiento óptimo, mientras que las temperaturas extremas altas limitan su proliferación. Este patrón de crecimiento observado es similar a los resultados obtenidos en el presente estudio.

Estos resultados comparados con el estudio de (17) es consistente con lo demostrado en el presente estudio sobre levaduras psicrotolerantes, las cuales sobreviven a temperaturas inferiores a 15°C. Liu et al., 2023 mostró que las levaduras psicrófilas se adaptan a temperaturas bajas mediante la síntesis de ácidos grasos poliinsaturados

(PUFAs), lo que incrementa la fluidez de sus membranas celulares. Esta capacidad, facilitada por la presencia de genes que codifican desaturasas de ácidos grasos, permite que las levaduras psicrófilas mantengan su funcionalidad a bajas temperaturas (17).

Los hallazgos obtenidos mediante la secuenciación de la región ITS del genoma de los aislados puros de levaduras domésticas, y su posterior análisis mediante el programa Blast-N, mostraron una importante diversidad genética. Entre las especies filogenéticamente relacionadas con las cepas aisladas figura una cepa de la especie *Yamadazyma takamatsuzukensis*. Se trata de una levadura conocida por su habilidad para adaptarse a una variedad de condiciones, incluidas las temperaturas bajas. Esta característica le permite sobrevivir y crecer en condiciones de estrés térmico. En estudios previos se ha aislado esta levadura en entornos fríos (18).

Otra cepa la C3-9, presentó una gran similitud con la especie *Rhodotorula mucilaginosa*. Esta especie es conocida por su pigmentación rosado, debido a la producción de pigmentos carotenoides, que le permiten resistir la radiación ultravioleta y el estrés oxidativo, entre otros factores ambientales. Esto le permite crecer en condiciones frías. Investigaciones realizadas por Pacia et al (2015) han demostrado que esta especie es común en climas extremadamente fríos en las regiones árticas y antárticas (19).

Por su parte, la secuencia obtenida a partir de la cepa C6-6 presentó un 98.72% de identidad con la de una cepa de *Rhodotorula glutinis*. Esta otra especie del género *Rhodotorula* es ampliamente conocida por su producción de lípidos y carotenoides, así como por su capacidad para crecer en ambientes fríos. Según los estudios de Mussagy et al, (2021) esta levadura se puede cultivar en temperaturas bajas, lo que la hace una posible candidata para fines biotecnológicos, debido a las particularidades de sus enzimas (21).

La secuencia correspondiente a la cepa C4-1 presentó una notable similitud con la de una cepa de *Barnettozyma californica*. Aunque esta especie ha recibido menos atención en comparación con otras cepas, Fang et al. (2021) mencionan que su identidad impecable indica su alta especificidad y adaptabilidad a ambientes particulares, posiblemente incluso a bajas temperaturas (22).

Por otra parte, la cepa C8-3, resultó muy cercana filogenéticamente hablando a la especie *Trichosporon oatae*. Esta especie es conocida por su capacidad para descomponer compuestos complejos y sobrevivir en condiciones frías. Hay suficiente evidencia sobre su presencia en ecosistemas árticos y su potencial biotecnológico para la producción de biodiesel en bajas temperaturas (23).

Por su parte, la secuenciación de la cepa C8-4 presentó una notable identidad (99.30%) con la de *Filobasidium uniguttulatum*. Se trata de una levadura criofílica, lo que significa que puede prosperar a temperaturas muy bajas. Su capacidad para desarrollarse en entornos árticos y antárticos ha sido confirmada por estudios, lo que la hace relevante para investigaciones sobre biotecnología en entornos fríos (16). Así también, la secuencia de la cepa C9-2 tiene un 99,9% de identidad con la de una cepa de *Cystobasidium slooffiae*. Esta especie se ha identificado en un estudio centrado en la contaminación del aire interior por levaduras en entornos sanitarios (24).

Finalmente, la cepa C10-1 es muy cercana a la especie *Yamadazyma takamatsuzukensis*. Esto mejora la adaptabilidad y versatilidad de esta levadura en varios ambientes, incluidas las bajas temperaturas (2).

Podemos por lo tanto afirmar que la mayoría de las cepas aisladas, caracterizadas e identificadas en el presente estudio tiene una estrecha relación filogenética con especies que han sido claramente clasificadas como psicotolerantes o, incluso, psicrófilas. De forma tal que claramente hemos podido cumplir con nuestro objetivo más importante enfatizando, además, que dichas cepas y especies de levaduras potencialmente extremotolerantes/extremófilas pueden colonizar ambientes domésticos como los lavaplatos.

Debemos, sin embargo, mencionar que este estudio presenta varias limitaciones. La primera de ellas es que las muestras recolectadas de lavaplatos en los hogares de la ciudad de Cañar no fueron numerosas, lo cual puede limitar la generalización de los resultados aquí obtenidos. La segunda limitación es que no pudimos identificar todas las cepas aisladas y purificadas debido a que, en algunos casos, no se amplifica la región ITS. Finalmente, debemos mencionar que la capacidad de multiplicarse a bajas temperaturas –es decir, por debajo de 15 °C, no se pudo evaluar. Esto se debió a

limitaciones en la infraestructura y el equipamiento disponible. A pesar de estas limitaciones, el estudio tiene fortalezas significativas. Por una parte, se trata del primer estudio en su tipo a ser ejecutado en la región andina, en general. Se trata por lo tanto de un estudio pionero en su género. Además, las cepas aisladas fueron caracterizadas en relación con su potencial patogénico. Factores de virulencia, como la producción de enzimas hidrolíticas y la capacidad de penetración del sustrato, fueron evaluados y proporcionaron información importante sobre el riesgo que podrían representar estas levaduras para los habitantes de las viviendas incluidas en el estudio. Por lo tanto, más allá de sus limitaciones, la relevancia y el rigor metodológico del estudio establecen una base sólida para futuras investigaciones y métodos de prevención de posibles infecciones.

En resumen, los hallazgos aquí presentados permiten deducir la presencia de una gran diversidad de cepas de levaduras psicotolerantes en los ambientes estudiados, incluyendo especies particularmente interesantes como *Rhodotorula mucilaginosa*, *Yamadazyma takamatsuzukensis*, *Barnettozyma californica* y *Trichosporon oatae*. Este estudio significa entonces una primera aproximación al conocimiento de la diversidad y las características de las levaduras psicotolerantes presentes en estos entornos domésticos. Como ya se dijo, se establece con el mismo una base sólida para desarrollar futuras estrategias de prevención y control de infecciones en la sierra ecuatoriana, debidas a este tipo de microorganismos extremotolerantes/extremófilos domésticos.

CAPÍTULO IV
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

IV.1.- CONCLUSIONES

- Los lavaplatos de los departamentos de la ciudad de Cañar presentan una amplia diversidad de levaduras psicotolerantes, capaces de desarrollarse tanto a bajas temperaturas como a 37 grados centígrados.
- Algunas de las especies identificadas manifiestan rasgos que se asocian con los de levaduras patógenas oportunistas
- La presencia de estas levaduras destaca la necesidad de implementar estrategias de prevención y control de infecciones en la sierra ecuatoriana, debido a su capacidad de crecer a temperaturas corporales y soportar condiciones frías, lo que las convierte en un posible riesgo para la salud pública.

IV.2.- RECOMENDACIONES

- Se recomienda realizar una investigación más detallada sobre las levaduras aisladas. Esto incluye estudios genéticos y filogenéticos para identificar las relaciones evolutivas entre las especies y su adaptación a diferentes temperaturas.
- Es de suma importancia profundizar acerca de la presencia de las levaduras que son consideradas patógenos oportunistas que se encuentran en estos ambientes. Se recomienda realizar un análisis de riesgo que evalúe las implicaciones de la presencia de estas levaduras para la salud pública, en especial para los ambientes extremos domésticos de la región de Cañar. Esto incluye estudios de la virulencia de estas especies y resistencia a antibióticos.
- Otro aspecto importante que se debe abordar son las condiciones ambientales en las cuales se multiplican estas levaduras. Esto incluye factores como pH, disponibilidad de nutrientes además de la temperatura, que pueden influir en el crecimiento y la diversidad de las especies encontradas. Una comprensión más profunda de estos factores permitirá establecer un contexto más claro sobre cómo se adaptan estas levaduras a ambientes extremos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Gostinčar C, Grube M, Gunde-Cimerman N. Evolution of Fungal Pathogens in Domestic Environments? *Fungal Biology*. 1 de octubre de 2011;115(10):1008-18.
2. Zalar P, Novak M, de Hoog GS, Gunde-Cimerman N. Dishwashers – A man-made ecological niche accommodating human opportunistic fungal pathogens. *Fungal Biology*. 1 de octubre de 2011;115(10):997-1007.
3. Zupančič J, Babič MN, Zalar P, Gunde-Cimerman N. The Black Yeast *Exophiala dermatitidis* and Other Selected Opportunistic Human Fungal Pathogens Spread from Dishwashers to Kitchens. *PLOS ONE*. 11 de febrero de 2016;11(2):e0148166.
4. Kulesza K, Biedunkiewicz A, Nowacka K, Dynowska M, Urbaniak M, Stępień Ł. Dishwashers as an Extreme Environment of Potentially Pathogenic Yeast Species. *Pathogens*. abril de 2021;10(4):446.
5. Novak Babič M, Gostinčar C, Gunde-Cimerman N. Microorganisms populating the water-related indoor biome. *Appl Microbiol Biotechnol*. agosto de 2020;104(15):6443-62.
6. González J, Romero-Aguilar L, Matus-Ortega G, Pablo Pardo J, Flores-Alanis A, Segal-Kischinevzky C. Levaduras adaptadas al frío: el tesoro biotecnológico de la Antártica. *TIP*. 2020;23(20):14.
7. De Maayer P, Anderson D, Cary C, Cowan DA. Some like it cold: understanding the survival strategies of psychrophiles. *EMBO reports*. mayo de 2014;15(5):508-17.
8. Madhu S, Bansal V, Garg VK, Chhillar AK. Microbial extremophiles: a source of high-temperature enzymes for industrial applications. *Enzyme Microb Technol*. 2020 Jul;138:109564
9. Elfeky DS, Gohar NM (2016) Evaluation of virulence factors of *Candida* species isolated from superficial versus systemic candidiasis. *Egypt J Med Microbiol* 38(87):1–10
10. Cafarchia C, Iatta R, Danesi P, Camarda A, Capelli G, Otranto D (2018) Yeasts isolated from cloacal swabs, feces, and eggs of laying hens. *Med Mycol* 57(3):340–345
11. F. Gardini, R. Tofalo, N. Belletti, L. Iucci, G. Suzzi, S. Torriani, M.E. Guerzoni, R. Lanciotti (2006) Characterization of yeasts involved in the ripening of Pecorino Crotonese cheese *Food Microbiol.*, 23: 641-648

12. Cullen PJ, Sprague GF et al. Glucose depletion causes haploid invasive growth in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(25):13619–24.
13. White, T. J., Bruns, T., Lee, S. J. W. T., & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: a guide to methods and applications*, 18(1), 315-322.
14. Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J. (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215:403-410
15. Koichiro Tamura and others, MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11, *Molecular Biology and Evolution*, Volume 38, Issue 7, July 2021, Pages 3022–3027
16. Gilbert JA, Hartmann EM. The indoors microbiome and human health. *Nat Rev Microbiol*. 19 de julio de 2024;1-14.
17. Liu H, Zheng G, Chen Z, Ding X, Wu J, Zhang H, et al. Psychrophilic Yeasts: Insights into Their Adaptability to Extremely Cold Environments. *Genes*. 6 de enero de 2023;14(1):158
18. Nagatsuka Y, Ninomiya S, Kiyuna T, Kigawa R, Sano C, Sugiyama J. *Yamadazyma kitorensis* fa, sp. nov. y *Zygoascus biomembranicola* fa, sp. nov., nuevas levaduras del interior de la cámara de piedra del túmulo de Kitora y cinco nuevas combinaciones en *Yamadazyma* y *Zygoascus* para especies de *Candida*. *Int J Syst Evol Microbiol* [Internet]. 2016;66(4):1692–704. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1099/ijsem.0.000930>
19. Pacia MZ, Turnau K, Baranska M, Kaczor A. Interplay between carotenoids, hemoproteins and the “life band” origin studied in live *Rhodotorula mucilaginosa* cells by means of Raman microimaging. *Analyst*. 2 de marzo de 2015;140(6):1809-13.
20. Zavala H, Elizabeth M. Caracterización hidrogeoquímica y diversidad microbiana en ambientes extremos, casos: Villa Juárez, San Luis Potosí y Rincón de Parangueo, Guanajuato [Internet]. 2023 [citado 16 de septiembre de 2024]. Disponible en: <https://repositorioslatinoamericanos.uchile.cl/handle/2250/7544376>
21. Mussagy CU, Guimarães AAC, Rocha LVF, Winterburn J, Santos-Ebinuma V de C, Pereira JFB. Mejora de la producción de carotenoides a partir de *Rhodotorula glutinis* CCT-2186. *Biochem Eng J*. 15 de enero de 2021;165:107827.
22. Fang J, Liao S, Zhang S, Li L, Tan S, Li W, et al. Characteristics of a novel heterotrophic nitrification-aerobic denitrification yeast, *Barnettozyma californica* K1. *Bioresource Technology*. 2021 Nov 1;339:125665.

23. Brar KK, Sarma AK, Aslam M, Polikarpov I, Chadha BS. Potencial de la levadura oleaginosa *Trichosporon* sp . para la conversión de hidrolizado de bagazo de caña de azúcar en biodiesel. *Bioresour Technol.* 1 de octubre de 2017;242:161-8.
24. do Nascimento JPM, dos Santos R, dos Santos Silva MS, de Araújo MA, Anhezini L, dos Santos DÉ, et al. Indoor Air Contamination by Yeasts in Healthcare Facilities: Risks of Invasive Fungal Infection. *Aerobiology.* septiembre de 2023;1(1):3-18.

ANEXOS

Anexo 1: Zona de la toma de muestra en los 10 departamentos en Cañar

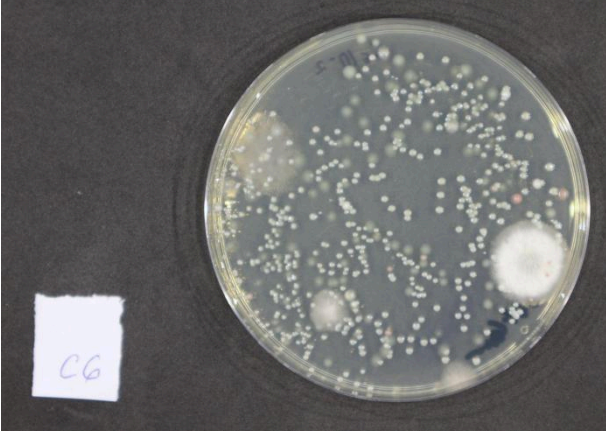
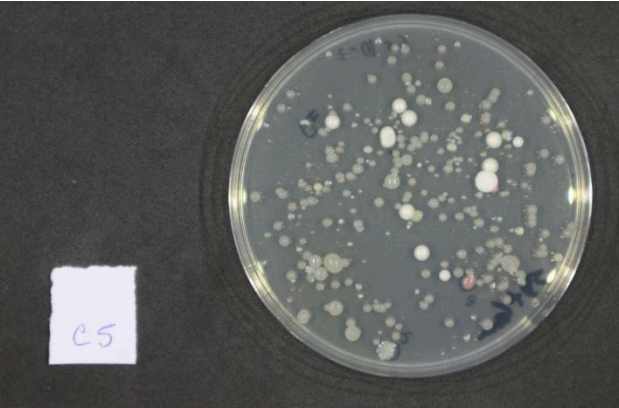
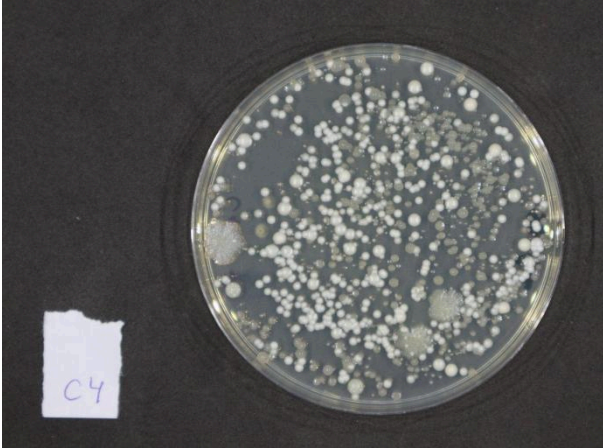
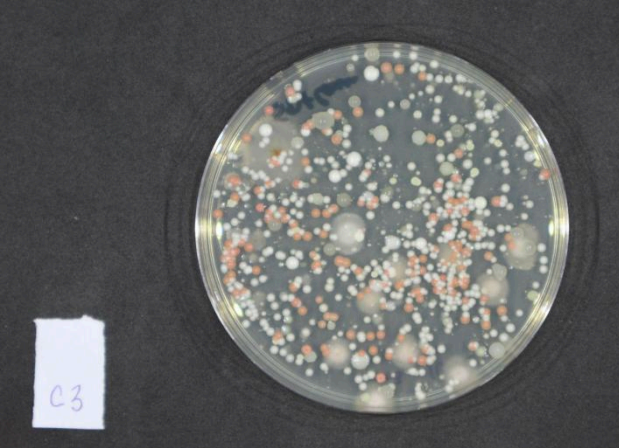
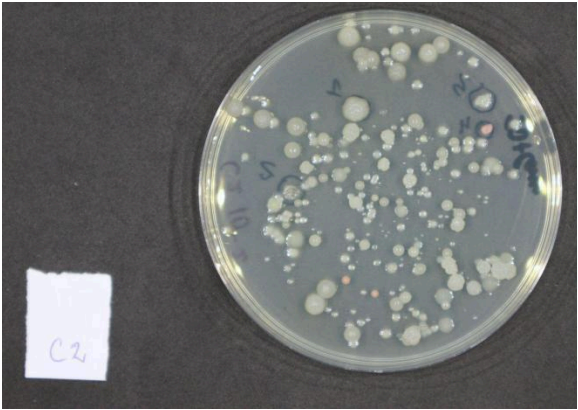
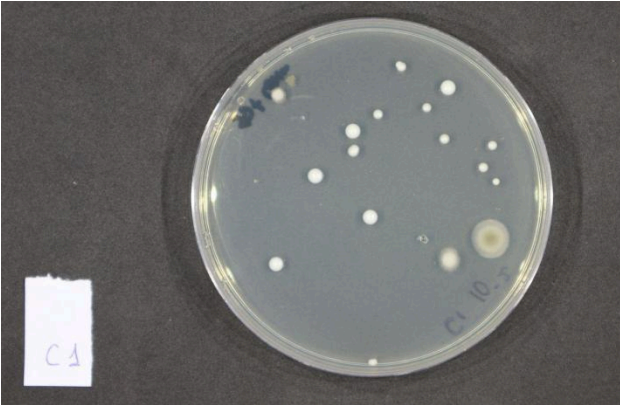


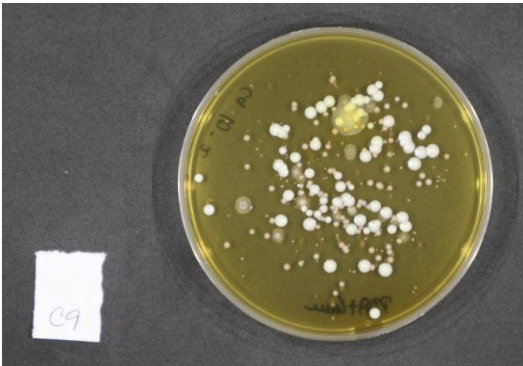
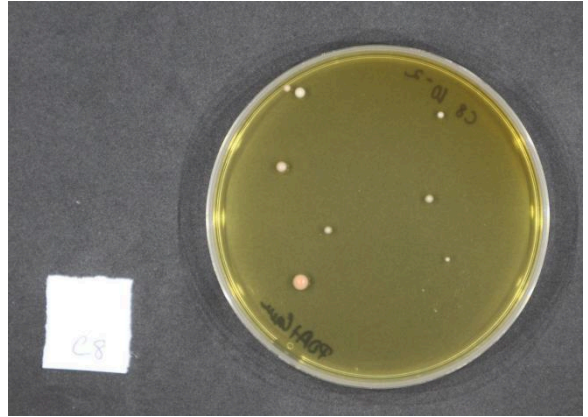
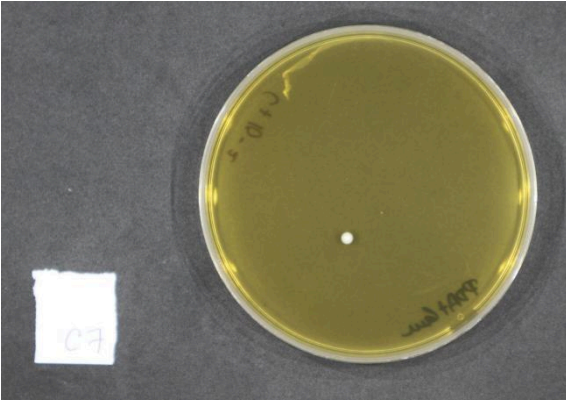




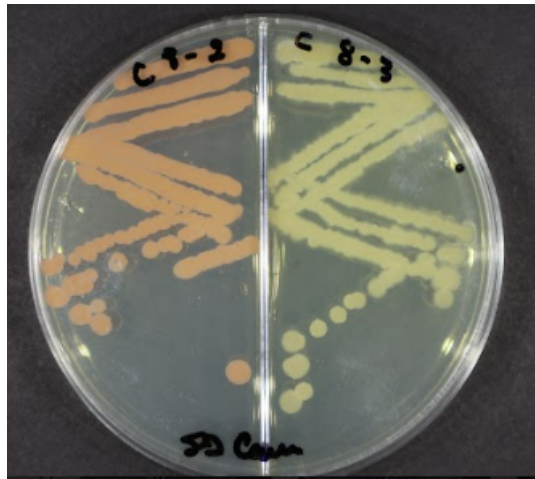
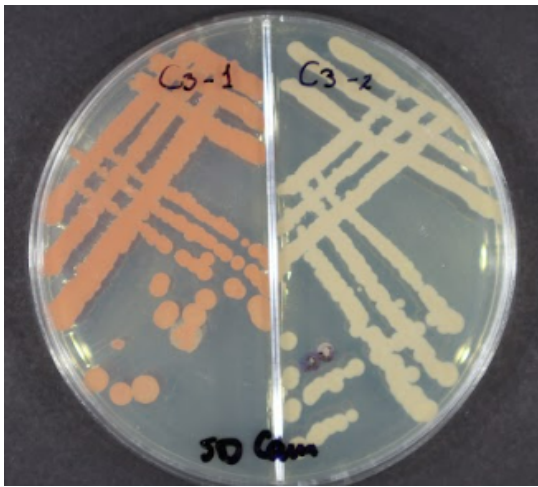


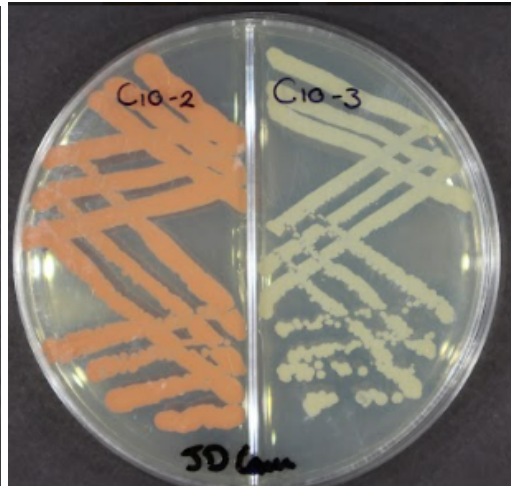
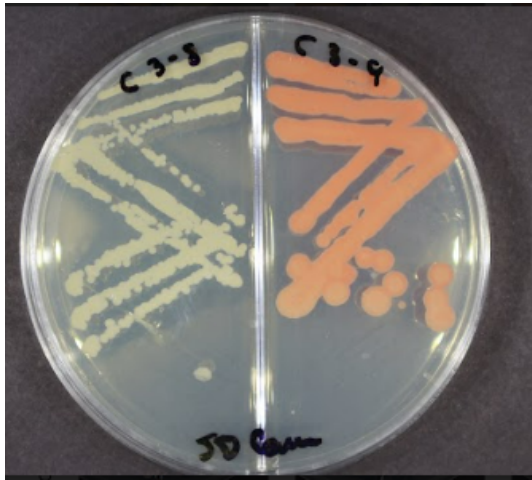
Anexo 2: Aislamientos primarios de las cepas de cada departamento

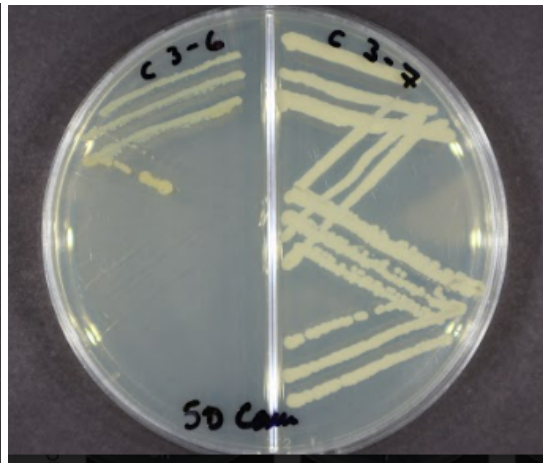
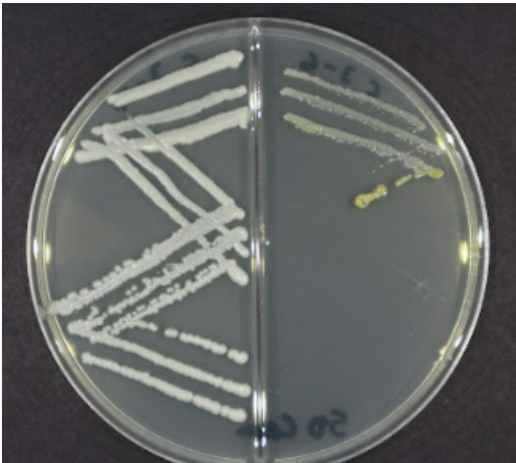


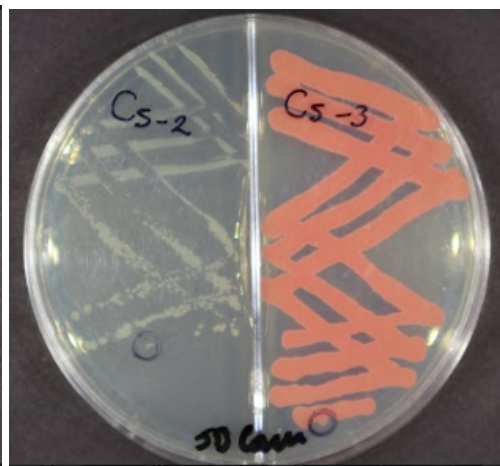
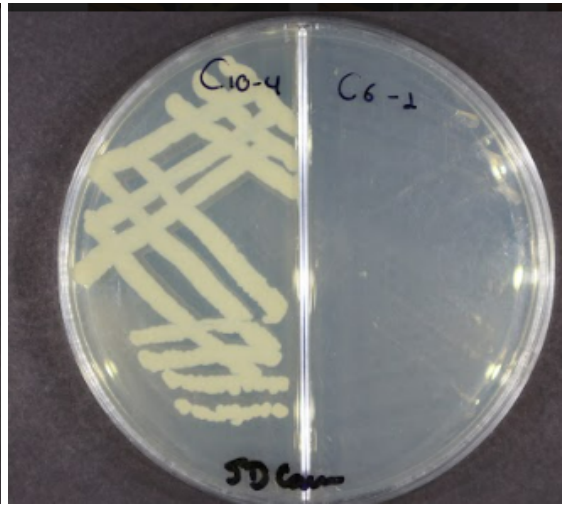


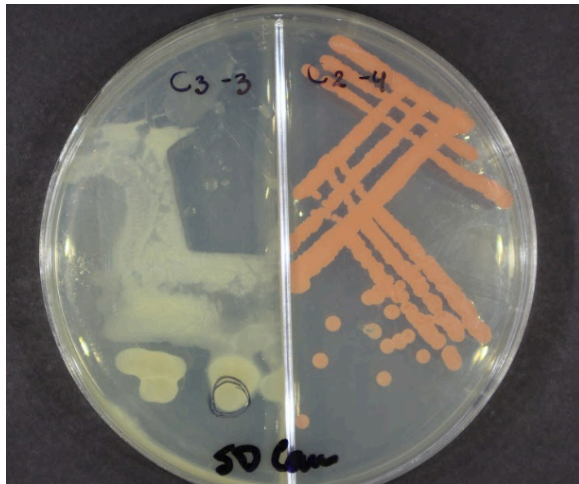
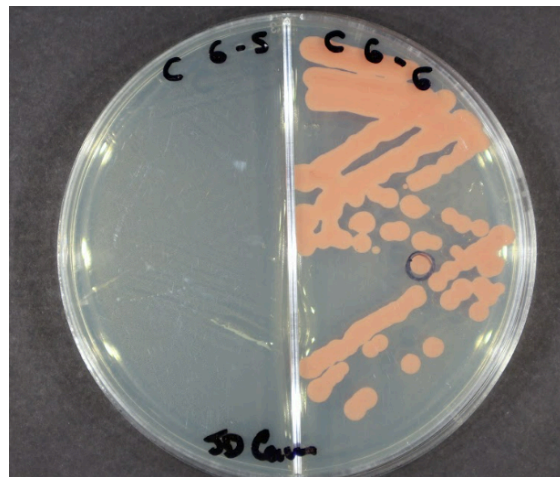
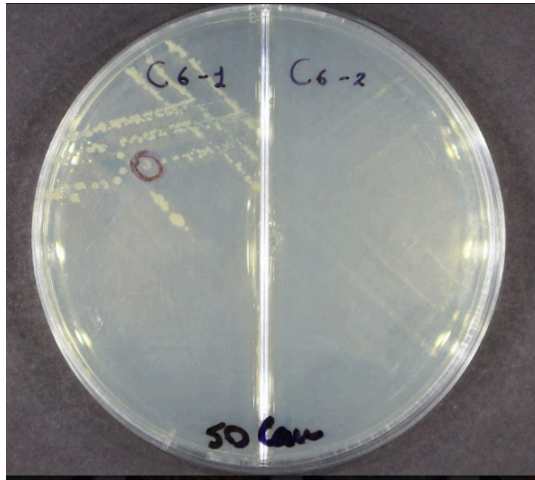
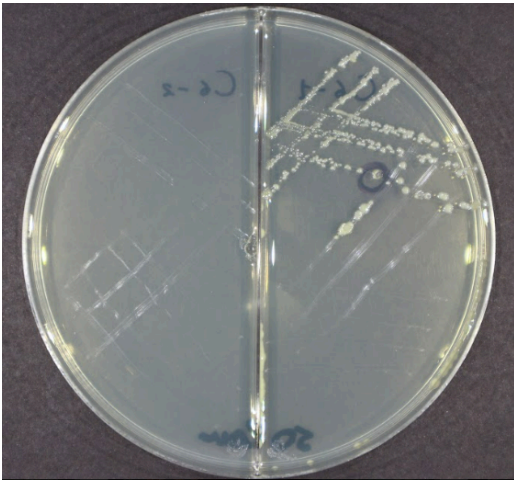
Anexo 3: Aislamiento de cepas puras

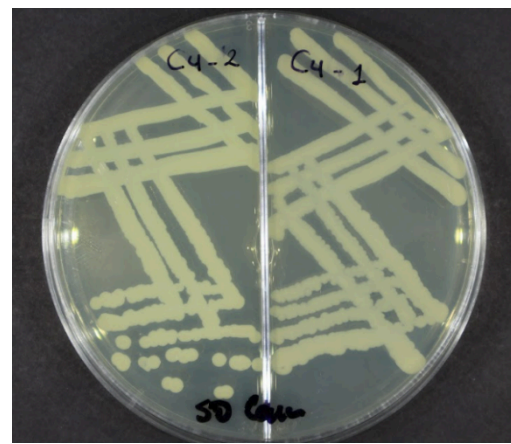
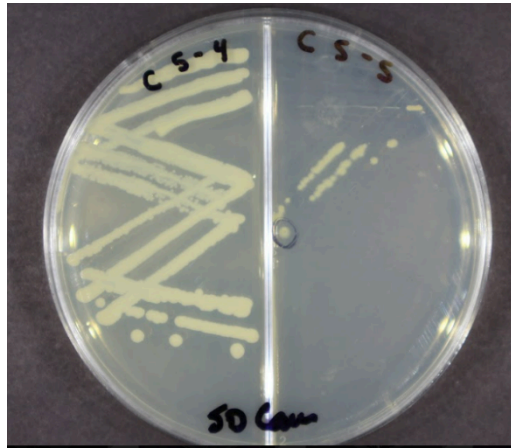


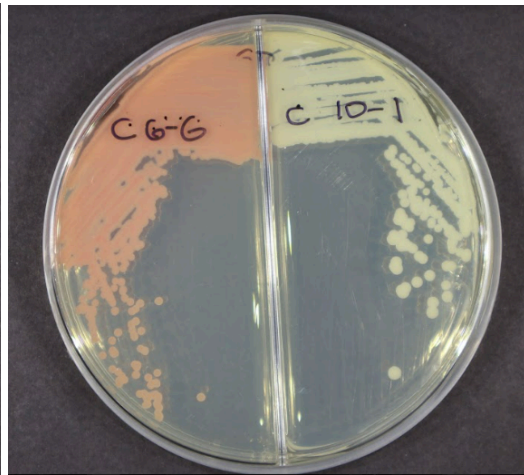
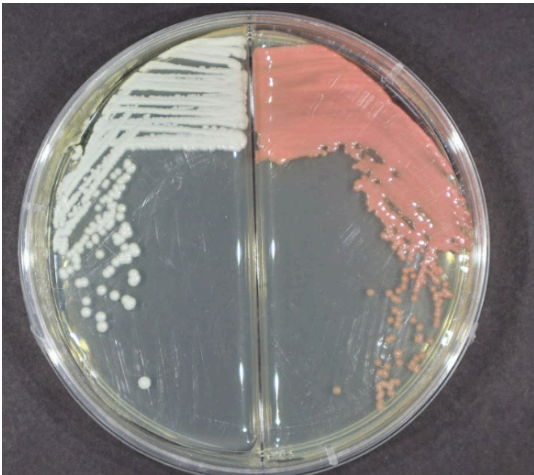
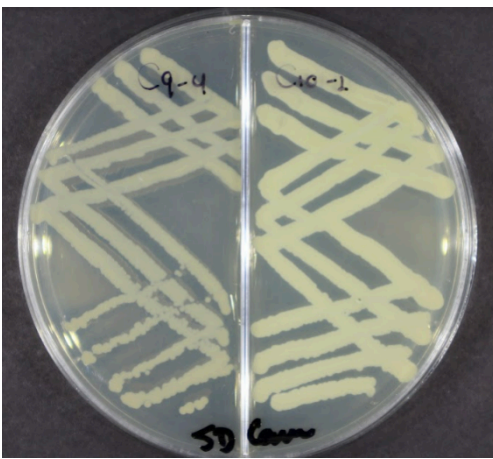
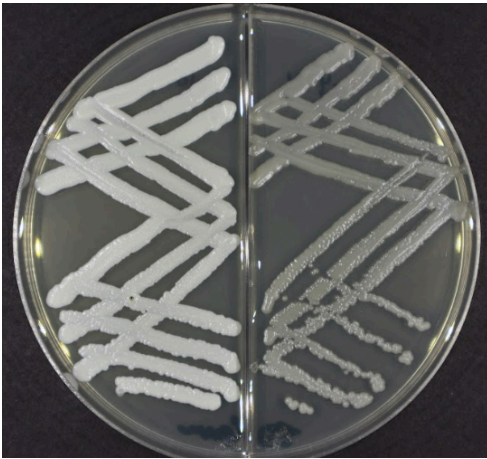


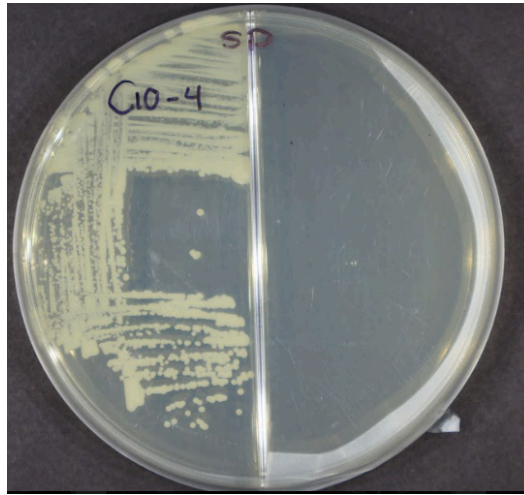
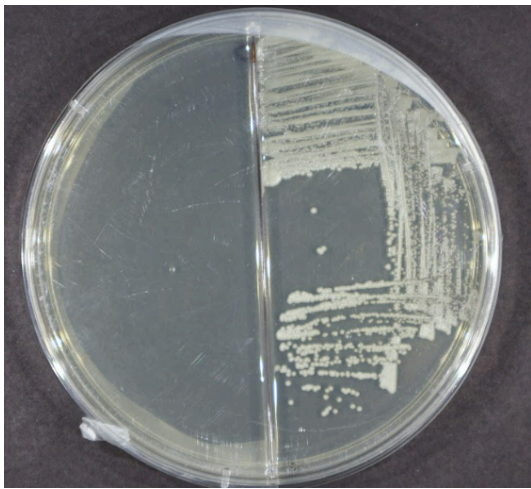




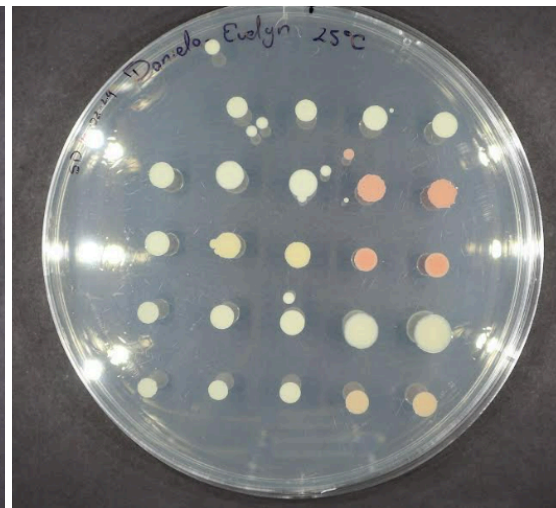
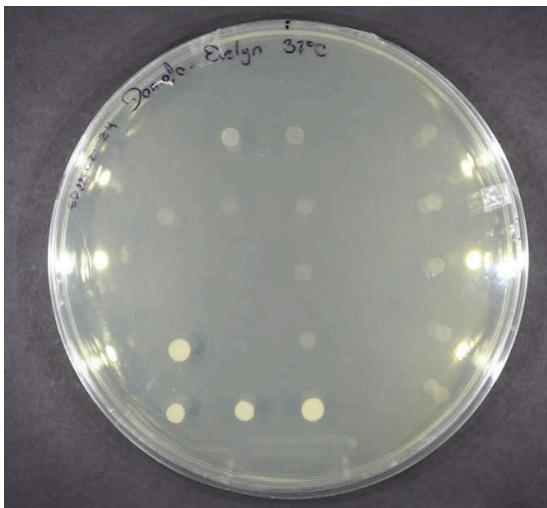
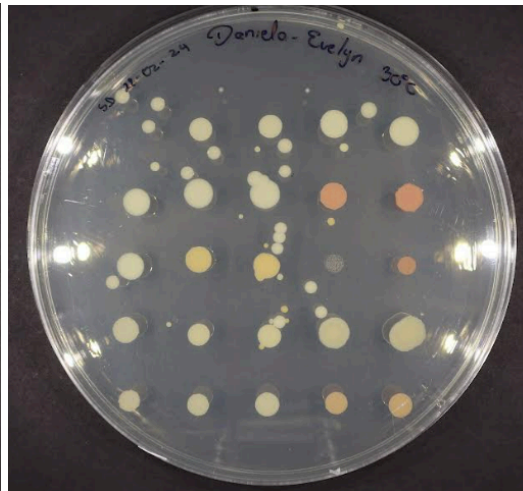
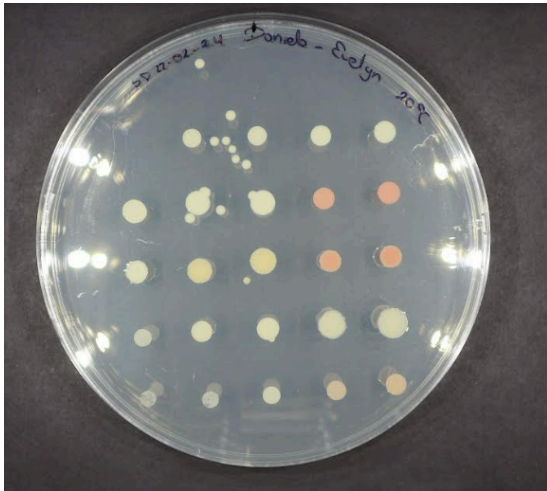


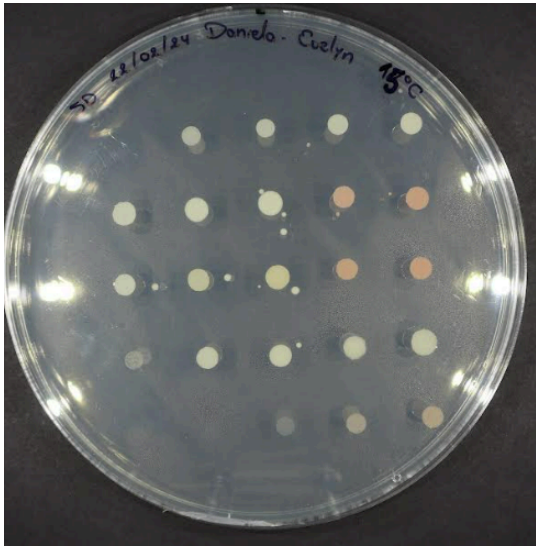




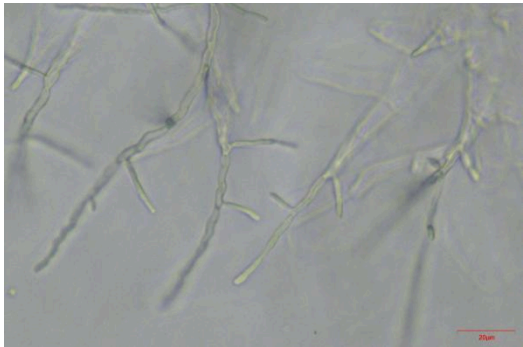
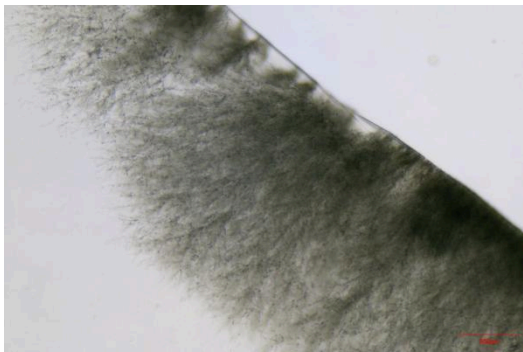


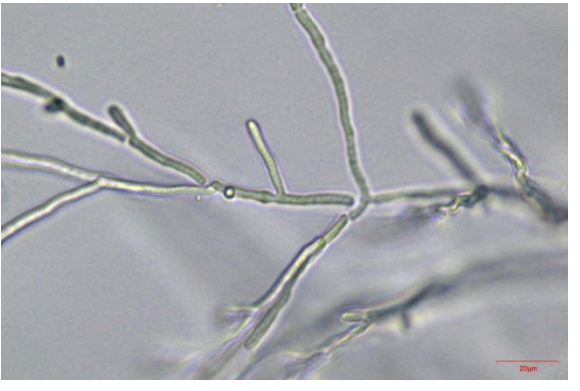
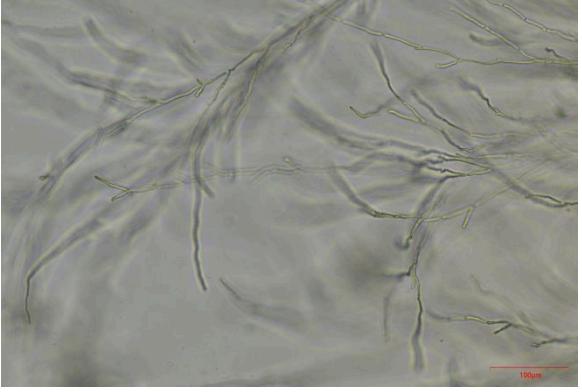
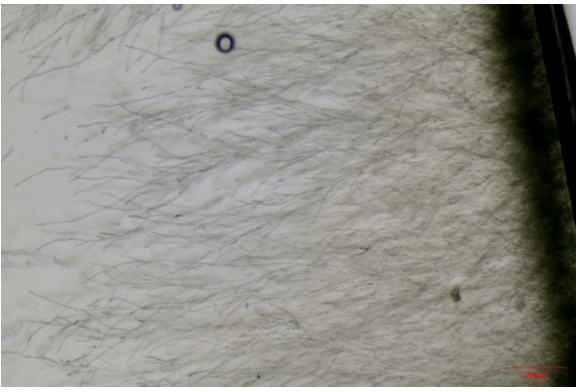
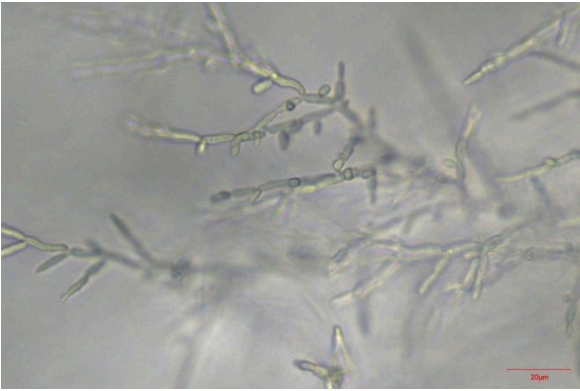
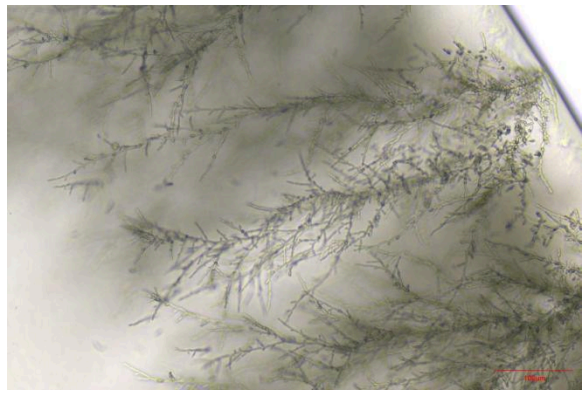
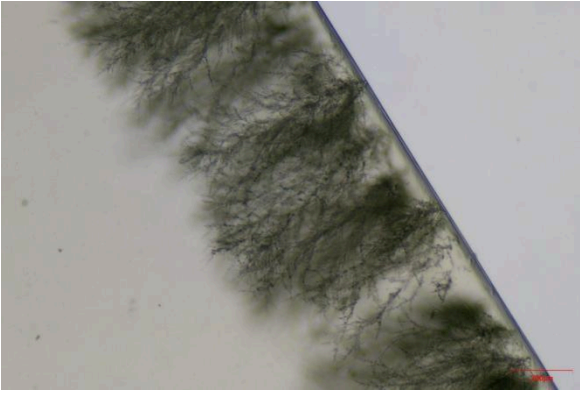
Anexo 4: Crecimiento de las levaduras a diferentes temperaturas

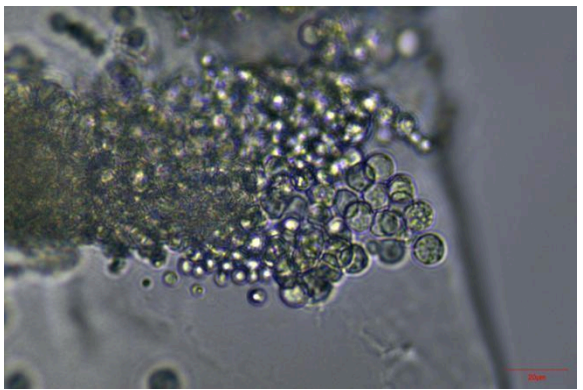
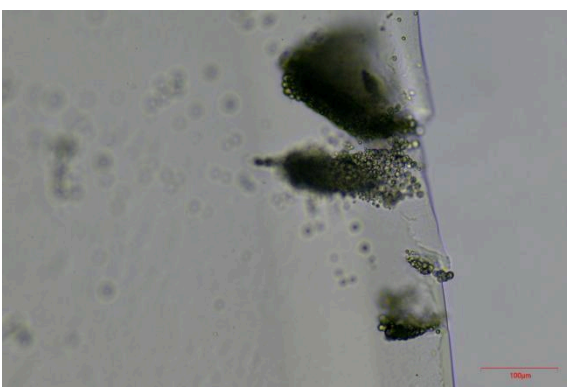
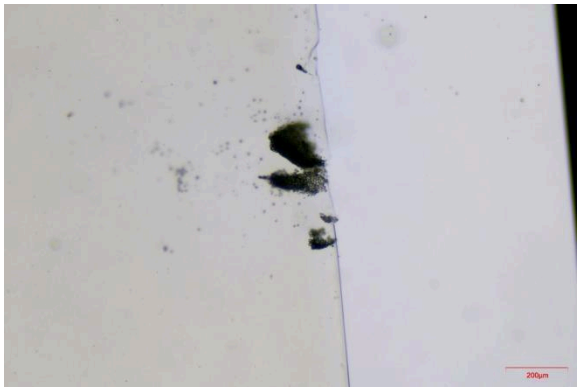
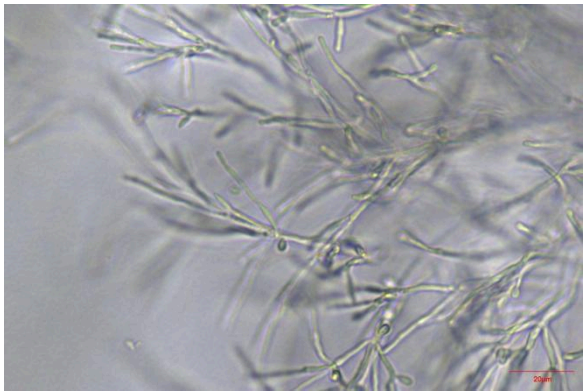
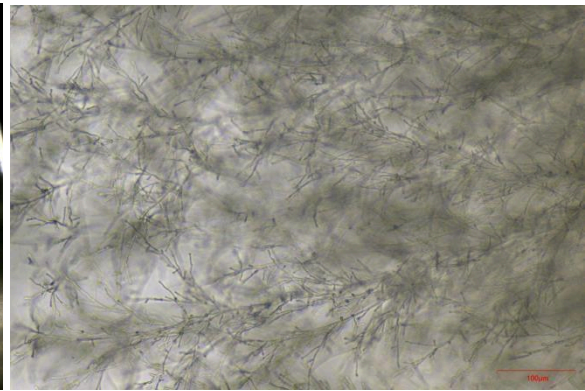
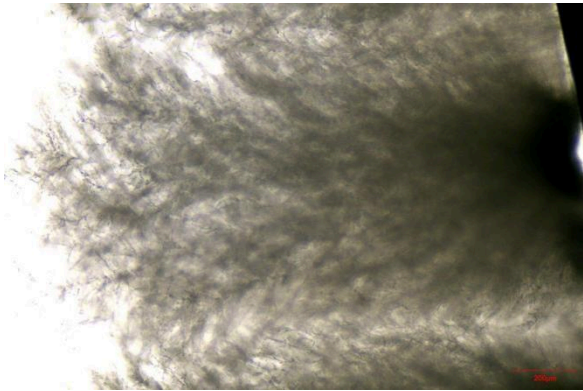




Anexo 5: Resultados de ensayo de capacidad de penetración a 4x, 10x y 40x







Anexo 6: Secuenciación de las cepas

```
>H240625-003_I04_26_ITS1.ab1 1587
GGGCAACTAGTTACATTGGTTTCTAGCCAGCGCTTCAATTTAGCGCGGCC
GGTGTAACTAAAACCTTACACACAGTGTTTAAATTACTTTAAAAGAAATTTG
CTTCTGGTTTGGCCCTTCGGGTTGGCCAGAGGTTTTACACAAAACCTCAAT
TTTTTATTGAATTTTTTAAATTTTGTGTCATGTTTTGTTTTGATTAATT
TCAAAAATCAATCTTCAAAAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCA
TCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGAATTGCAGATTTT
CGTGAATCATCGAATCTTTGACGCACATTGCGCCCTTGGTATTCCATG
GGGCATGCCTGTTGAGCGTCATTTCTTTCAAACCTTTGGGTTTGGTA
TTGAGTGATACTCTTAGTCGGACTAGGCGTTTGTGAAATGGAACGGCA
TGAGTGGTACGAGATAGTACTTTCTGATAATTCAATGTATTAGGTTTATC
CAACTCGTTGAACGGTCGGTGGTAAATTTCTGGTATTATGGCTCGGCCTT
ACAACAACAACAAGTTTGACCTCAAATCAGGTAGGAATACCCGCTGAAC
TTAAGCATATCAAAACGGGAAAGAAAAATGTCCCTGCTGTCTCCAGA
AAACGAGAAGAAAAACATTGACACTGAAAGGAACAGCTTGGTTGTGTAC
TTGTTAACGACACACTAGCCGCTAATACGAGGAAAGGTCGGGAAGAACA
CAGAGGGGAGGTCAACTCACAACGGATTCTTGCAGTTTGTGGCGCGT
ACCCCTACCCGCGCTCAGTGAGGAATGGGCCAAAACACGGCCACAGGTA
AAAAGGGAGCTGGAGTCCAGGGAGGGCTCAGGACCTGGCACACAGTGTG
CAGGACACGATCAACCAGAAGAAGCACCTCACGCAAGTCCCGGAGGGGGG
CCATGGGGCGGGGACAGTGGCGGACCCGGGACCGTAGCAGAAGGGGGG
CAAGCCGTGGGTGTAGCCTGTCCGTCCGGGCGAGGTGCTTCTGTCTGCC
TCAACCAGTGAAGTAGCATGTCTGATGTCGTCAACCAGATCGATGCCAAT
GTGGAACGTGCTTCGGGAGTGGGCGGGGAATGGACGAGTCGAGGGGCTC
AGCGGGCCGACGGTCGGTCTGTTATCATCCATCCACGTTGTGTGCT
CAGGCTCCGGGACTGGGGGATGGCGGGTGCAGCGCTCGCAGCGCATCCACA
ACGACTCGATGATGAGGGCCCATCAATTCGTTGACCTCCGCTCAAACCTT
TCGTATCAATGCAACTCAGCTTCTCCTCGCGGGAACCTGGATGACTTGGT
AGGTGTCAATGACGACACGCCTCGCCTCCATCGATCAGAGTCACGTTGCA
CATCCACACTCGCTCGGAGTCGGGACATCTTCCGCGTGCCTGTCTGCTC
CGGATGATCAGGACTCGGGCTCTCGCAATGTGCAAGATCGACTCGAGC
CTAGGCACAACATTACGTAAGACATGGAGGAGTCGACTCAGCGGATGGT
CTCGTCGGACATTGATCGTCGATTATGATCTGTGGC
```

```
>H240625-003_A06_32_ITS1.ab1 1587
AGAAAACCTGAATGCCTTTTTCTGCTCCACTTATCCTCAACACCTGTTGAAC
TGTTTCGATTGAATCTTCTCTTGTATCACGATCCACAACAACATCGTGTA
ATGAACGTCATTAGATCATAACAATGAAAAACCTCATCAACAACGGATCT
CTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTG
AATTCGCAAGATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCAACTTGCCTC
TCTGGTATTCGGAGAGCATGCCTGTTGAGTGTCTGAAATCTCAACCA
TTAGGGTTTTTAAATGGCTTGGATCTGGACGTGTGGCAGTTTACTGCCTC
GTCTTAAAAGAGTTAGCAAGTTAACTATTGCTGTCTGGCGTAATAAGTTT
CGCTGGTAAATGCATTGTGAAGCGTCTTAAATCGTCTTCGGACAATTAC
TTTGACTCTGGCCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAAGCATA
CAAAACCCGGGAAAAAAAAGCTTCTCGCGGGTACTGTGCCCTATGCCCT
CGGGTGAAAAATGACTAGCCGATGAGTTAGACTCTGAGTACCGCGCTGT
CGATGCTAAGTGGTCAAGTACGTTGGAGGCGCACGTGGCGTAACCCAC
TAGGTGTCTGGCGCAGCGTCGACAGCGGGTACAGGAATGGACGGCGGCA
GATGGCTTGTCCGGGGACCTATGACAGTCTCTCGCGAGAGATTGCGAGG
GGAGCAGCGGTGGGGCTTGGCGCCGGGCAAGTATCACCGTCAATTGCAC
GACTACATGGGGGGTGCCTCTAGGAGGCGTACCTCAGGCGCCTAAGT
GCTTCGGACCCCGACTGGGGGAGACGTGGGCGGAGGGGCTGAGGTA
TGGCCACTGGGGCACTGTACGGCGGGGGGCGAGATAAGTTAAGTCCC
ATGATGTCAACGAAACCTGGCTCTCAGAATGTCCCGTGGGATTTTG
GCTGGGGATTGGATGGAGGTGCCGTGGGGTGGATCTTGGACCGGGGGT
CCCGGGGTGTTACCCATACCCGAAGGCGGATCACCTGGATCAGGCTAGG
GCCCGGTGACCACTGGGGACCCCGGACCTTGGGGTTAACATGTGGGGG
GGGGGGGCGCGAGACCGGGGGGGGGGGGAGTGGGCGGACCGCGGGG
GGCGGGGAGGCAACACCGGGGGGGGGCGGCCACTTCCGGGTTGGGTGG
GCGGGGGGGCTCATCCTAACACCCATAAGTGGGGGCTGTTCCGCCATA
CCATGTTGAACATTCCACGGCGCGCACGGCTCATCCCCACGGGGG
GGTGGGACGTGTGTAGAGGGGATAAAAACACTTCTACTATATCGCG
CCTTCGTGGAAGACGCGACGATCGTCCATCGCGAGTCAACTCCTCGCG
TTGTTTACCCGGGCTAATGTCTGTTCTCATCTCACTCGACGGCTC
TCCACCCACAAGTAAACCATCATCGGGGGTCCGTCGCAATCATTTCTG
GTTTATATGACGATTTCTGTCGTGCTCTCGTTACT
```

>H240625-003_M04_29_ITS1.ab1 1535
GGGAATTATTTTTTTGACGACTGTGCTGCGAGCACGATCTCTCACAT
ACACACTTTGTCTAGACATAGATTATTTGCTTAGGTGGCGTATCCGTCC
GCCTTTGGCTTTAACCTATAAAAAATTTATATGAAAAACATAATCACAT
TAACGATAATAAATATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGC
AACGATGAAGAACGCAGCGAATTGCGATAAGTATTGTGAATTGCAGATTT
TCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTGTGGTATTCCAC
AGGGCATGCCTGTTTGAGCGTCATTTCTCCTTCAAACCTCTAGTTTGAT
TTGGGCTTGGGAAGCTTTATACCCAGCCTGAAATAGTGGGTGAAACATA
TGCTATTAGTTTTACACAATGAGTTAGGTTCTGCCAGTTCGTTGAATA
AAATCTATGTGAAGATGCTTCAATACCCAGCCATTTTATACCCCCCAA
TTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATA
AGCCGGAGGAACACTCTGACATATCAACTTCACGCAAAAGCGGGAAAGA
ATGACCCCGAAATGGGTAATAGCGGAGGGGAGAAATGAGTACGGTGAGG
GAGCCACTTTCTTGGGCGAGAAGGATGGTAGTAATCCGTTAGTTATC
TAAGCAGTTCGGGGGAAAGACTGAGAGGCTTGCGGGGGTGGAAGGGTC
ATGAGTAATTCCTTTTTCGCTGTGTATTCTGAGGAAGGGTAGACTCGC
TGTGCCAACTCGCTGGATAATTGGCCCAACATGGAGCGAAGAGTAGGA
AGGGGGGAGGTGCTGTCGGGGCGTAGGGTACCTATGCTTTTACGGTTAA
GCTGAGCGGACCAAAGAGGTACATATCGTACGGAGTGTGGGGGGGAGT
GAGAAGAAGTCTGAGATAATTCGGGCGATGAAATGCTAAGAGTAATATG
GGGGAAACATGCAACGGGGCGGAACCTTGATTGGCGTCGCGATGAAGTG
AAATCTTGAGTGAAGTGCACGGTGTAAAGACGTGTGCGGATGGGAGGGATG
AAGAAGTGGTTGTCGGGACCCACGTGCGCCGGTGTATGGAATCGTAC
ACCTGATACCCGACTCACCCGACGTGTGGCGGATTGCGGCGAAGCGGGT
ATCGAACTGCATGTGGGAGATGAAGATTGTGAGCTCTGGTACCCGCGGA
ACTGTAGTAGTCCGCGTACTGCGAGAAGTGAAGAGGGGTAAACGGCTGATT
GATCCGGTTTCGCATGTGGACGAAAACCGTCGGAGGCGACAAGTACATC
GCTCGAACGCGAGTCCGACTCTCGGCCGCTCAATTTCAACGCGATCGAT
GGACGCGAGTCTGACTCGCGCACACTCGCACTATGCGTCAGGACTCGTG
GACGACATTTGACGGGACAGATCGTGATCGTGGCTCGAATGACGAATCATC
CTCCGTCGGAAGTCGCATCGTCACTCATTATTTTC

>H240625-003_004_30_ITS1.ab1 1414
GGATAACTGAACTCGACGCTCCACTTCAAACCTTGGAGTCCGAACTCTCACT
CTCTAACCTGTGCATCTGTTAATTGGAATAGTAGCTCTTCCGGAGTGAACC
GCCATTACACTTATAAAAAACACAAAGTCTATGAATGTATACAAATTTATA
ACAAAACAAAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAG
AACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATCGCAGAATTCAAGTGAATCA
TCGAATCTTTGAACGCACCTTGCCTCCTTGGTATTCCGAGGAGCATGCC
TGTTTGAGTGTATGAAATCTTCAACCCACCTCTTCTTAGTGAATCTGG
TGGTCTTGGTTTCTGAGCGCTGCTCTGCTTCCGGCTTAGCTCGTTCGTAA
TGCATTAGCATCCGCAACCGAACTTCCGATTGACTTGGCGTAAATAGACTA
TTCGCTGAGGATTCTAGTTTACTAGAGCCGAGTTGGGTTAAAGGAAGCTC
CTAATCCTAAAGTCTATTTTTGATTAGATCTCAAATCAGGTAGGACTAC
CCGCTGAACTTAAGCATATCAAACCGGGGGAAGAAAAAAGTACGG
AAAAAAGATCAAATAAGTGGGGAAAAAATTTATTTAAAAA
CAGAAGAACGTGCCACGCAGGGCGCGAGGGGTAGCCTTGTACTAG
TGACAGTAGTGTGCGATTCTATAAGATAAAGTGTGCTGTTACACCG
ATAAGGACGGTGCCTAAAACCGCGTCTGCCATAAACAGTTTAGAGGGACA
CAAGTGTTACTGATAATGCTCTACGGAGGTGACAAAACCGCGACTGGC
AGCGTGCAACAGGAAAAGTGATTCTCGTATGCAGCGTGGCGGTGTTAAC
ACGCTGTGATAGTACGGCACGGCGTGAATCACCACAGGAAGCGAATAA
GTGCCAAGAGCGAGTCACTGTAGCATGGTTTTGCATTTGTACAAGAATA
TAGACTGGGATTAGGCGTAAGGGTGGTAAGTATGGGGCAGCACCAATAG
CAAAGCGACAACAGACGGGATACAAGGGCAGACCTACCGTTTACTCAGTG
GTGACAGAGGTGGCTTCCGGGACAATAGGGCTTTTGTGAGTTGGTACG
GACGGCACCTACGGGGCGTACGCCCATAAAGCTGACGACGGCGGATGTGC
GCCGAGCGGCTGTCTGACGAGTGTCCATTCTCGAAGTGCAGGCGAAGGA
TAGCGGGTTATCGATCGCTCCCGGGGTTGAGATTATTCTACGACACCA
TGGTTGTGATGATGTCGAGACTCGAGCATGACTAACCATCACCGCGCGG
TGTATAGTGCATCCGCCACTCGTTCCGACCCGCTCACTCCGGTGGGGT
TGGGGTGTGTAGG

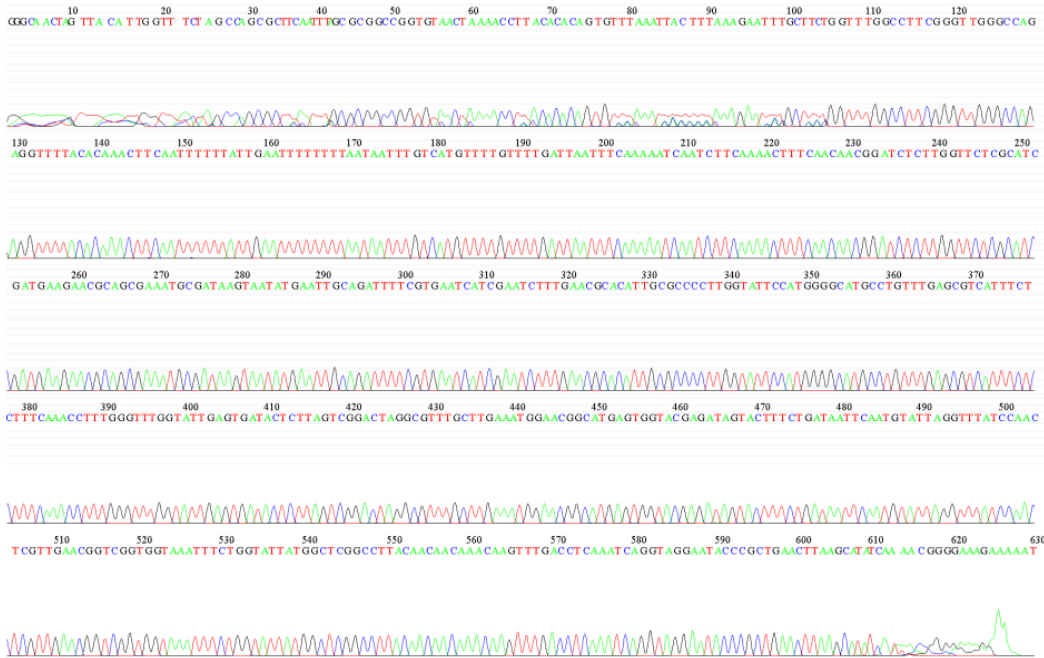
>H240625-003_C06_33_ITS1.ab1 1596
AGATACTGTATGCAGTTTGTCTGGCTTCTCGCCGACGACGATTCATT
ATTCCATAACACCTGTGCACTGTTGGATGTTAATACATCCGTTTTACAC
TAAACAATATTGTTACAAATGTAGTCTTATTATAACATAATAAACTTTC
AACACGGATCTCTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACCAGCGAAATGCG
ATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGC
ACCTTGCCTCCTTGGTATTCCGAGGAGCATGCCTGTTGAGTGTATGA
AACTCTCAAACCTTGTGGATGCAAACTCTTGCCTTGAGTTGGACTT
GGTGTGGCCGGTGATGAACCGACTCGCCTTAAACATATTAGCTGGACT
TGCTATATGACTGGTTTACTTGGCATAAAGTATTTTGTAAAGGACA
TCTTCGGATGGCCAGTACCTAGGCTCTGTGTCTGCTAACTAAACCATCAC
TTGGAGTGCATCTTTATGGTGTGCTTCTGTGTATACCTTTGACATCTGA
CCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAAAAACGGG
GGGAAAAATGATTGGATACTGTTCTATTTAACGTCAAAAAGAGAGGGAA
AACCTCCGTGTAGCGAGGAGATGCGAGACATCGCGCAGGAGCAATGTACG
CGATGGTACTACTCGGTGTAGCCATTCGACGGTCAGGCGGGAAATG
ACTCGAGGGGCATAAAGGGGGCTGGATACCCCGGGCTAGGGCCACGGC
CGTTACATCAGGAGTGGTAAATTCGTTGCGAGGGGTACCGCCGTTA
AAGCGTGAGCTGCAGACCGGCTGAAGGACGACGGCCCTGGAGGATCAC
AGCCGGAAGGGCTTGTAGGAAAAACGAGTTGAAGTGAAGGTCAGGAGC
TGGGGGGGGCCAGGAGGTGAATGCTATGCCACGCCATAACCAAGGCA
CGAATGGGCACTACTGACGACCCGCGAGGGAAGGGGGTAGCCCTAG
GGGGAAAGGGTGGAGAGGGGGGGGAGGGTGGGGGGTGGGGGGGATTGT
GAACCTACCCGGGGCCATACCCGGCTCAACGTGCGACACCCTAAGAG
AAATTGGCCTCACACACTGTAAAGGGGGAAATTAAGCGGGGGGGCGGGG
GGGGCAACGAACAAAAGGAGGGGTGGGGTGAATACACGCATAGACGATC
CGACGGGCGCATCAATAATCCGGGGCGCGTGCACCTCGCTTCTTCTA
CGAGAGGGGGGGGGGGGGGGGGCCACAACAAACAAAGTGAAGGGG
AAGAACCCACAACCCCACTCATGGTACAATCGACAGGAAAGGGCGTAT
CTCCCTCAACAATGGGAAGGGGGGGTATGAAAGGGGAGAAATCGGGCTCG
CGATGATCCGCTGGCGGGATAACGCACCTCCAGATGTGATCCTCCGGG
TTGTGCTTGGGGTGTCCCGCGGGCGGGCCGAGGAGCCGCTGAGGAA
CATCGGGGGACGCACCATCAGATCTGGGGTCCGGACCGGGTTC

>H240625-003_E06_34_ITS1.ab1 1916
GGGATCTGAATGCACGACGTTCTTTTCTCGAGTCCGACCTTTTCATTTT
TCTTACACCGTGCACACACTTACTTTTTACACACACTTTAACACCTTA
GTATAAGAATGTAATAGTCTTAATTCGAGCATAAATAAAAACAAAAT
TTCAGCAACGGATCTCTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAT
GCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAA
CGCACCTTGCACTCTTGGTATTCCGAAGAGTATGCTGTTGAGTGTCA
TGAAACTCTCAACCCCTTATTTTGAATGAGATGGCGTGGCTTGGAT
TATGGTTGCTGTTGGCGTAATTGCCGGCTCAACTGAAATACACGAGCAA
CCCTACTGAAATAAACGGTTTGACTTGGCGTAATAATTTTGCCTAAGG
ACGTTTTCTCAATATAAGAGGTGCTTCAATTCGCTTCTAATAGCATT
TAAGCTTTAGACCTCAAATCAGTCAGGGCTACCCGCTGAACTTAAGCATA
TCAAGAAGGGGAAAAAAGATGAGTCTGATGTTAATCACATAACAG
CGGAGGAAAAAAGTGTACTGGTGCAGTGTGGGCTTACAAATACACGGG
AAGACCCGGATGCGCAGAGGCGAGAGACGAGGAGAAAAACGGCGGCGA
ATGACAACGTCTGGTCAAGTCTGACAGTCAGGCGAGGAGAGACAAGGG
CAGCAACGGGAGTGGATACAGTGGCCAGGGCAGTACGCTACGAAAAAG
ACAATTAGTTGTGAAAGTTTGGCGCTCAACGACGAGGGCCATCAGACC
ACCTTGAGGGTAGCTACGGCCCTGCTCGGACTGGGGGAAACGACGCGGG
GAGTGAATACGCGAGAAGGAAAAATTAAGTGACCGGGCCGGGAGAAAGGG
CCGCTTGAAACCCCTGGTCTGGATTTAACAGGCGCTCAGATGCAAAACG
GTCCAAAATTAACCAACTCCACCGTGAATCCCTTGTCTTGCCTATG
TGATGGAAACCGCTGCGATAGAGAACAATGAGATAGGGCTCAAACACGC
ATCTCCGGGGGTGGAAGGCTCGCTCGGGAGCCAGAGGGGAACGCACCT
CTATTGGAACCTGGGATGGCTCATTACCTCATGAGGAGCGATCACCTT
TCGCGACAATATTCTCCGCGCAGTGTCTGTCGACAAAGATCACCTCGTGC
AACAAATCGATCATCGCTTTGACACGACCGCTCTCGCGCAGTGGAGGCTT
CTACAATGCGCGCGCAACACATCACACTCTCGATCACCTCGTGTGGTG
GGATAACACCTAGATCAGGCGGGGAGCTCGGCGGTGCGCGGTGGCGAC
GAAACAAGGGTGAAGAAGAAGGAGAGCGGGGGCAGTGTGGGTGCATCTC
AAAATCTCAGTCCGGAGGGGGCGCATCTCTACATATGACTCGTGGG
GGTTTGCACACGCTCGGTGACGCGCTCGTGGGGTGGTGAAGGAGGGG
AGGGCGTGCACAACAAAAACACGCCATAAGGTAGGGGGAGCTGACCAAC
CTACGAATCTCTTTATAAATCCCAATAGACACGAGATTTTATACCACT
CTTACACGGAGGTGTGAGAAGGAGATGAGGTGGTGTGTCGCGCTCCCT
CGTCGAGTCTCGCTCCGCTGTGGACGTCGCGCTTTTCGACGCGCGTGC
ACACTCTCGCTCGGGTGTGATGCTCGCGGGTGGTTCGCGACCACTCGCG
CTCTCGCTCTCGCGAGAGGTGTATCGTCGCGGAGACAACAACTCACTC
GACCGGGCGCTGGCTTATGGAGTCCGGATGGGTCTCGATCAAAGTTCA
ATTTGACTCTTGAAT

```
>H240625-003_G06_36_ITS1.ab1 1442
GCCTTTCGGTTTATTGGTTTACTAGCCAGCGCTTAATTGCGCGGCCGGTG
TAACTAAACCTTACACACAGTGTTTAAATTTTTTAAAGAATTTGCTTT
GGTTTGGCCTTCGGGTTGGGCCAGAGGTTTTACACAACTTCAATTTTT
ATTGAATTTTTTTAATAATTTGTCATGTTTTGTTTTGATTAATTTCAAA
AATCAATCTTCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGAT
GAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGAATTGCAGATTTTCGTGA
ATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTGGTATTCCATGGGGCA
TGCTGTTTGAGCGTCATTTCTTTCAAACCTTTGGGTTTGGTATTGAG
TGATACTCTTAGTCGGACTAGGCGTTTGCTTGAATGGAACGGCATGAGT
GGTACGAGATAGTACTTTCTGATAATCAATGTATTAGGTTTATCCAAC
CGTTGAACGGTCGGTGGTAAATTTCTGGTATTATGGCTCGGCCTTACAAC
AACAAACAAGTTTGACCTCAAATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAAG
CATATCAATAAGACCCGGAAGGAAAAAGGGCACAAGTGGGCGGGGAATCAC
GAAGTGAGGAGAAAGAAGAGGAAACGGAGGAGAAGGAAGCGAAGGAGACT
GCTGGGGACCGCGAGTGCGGGGAGAAACAGGAGAGAACCAGGGAGGCC
CGTGCAAGGCAGGTCTCAGTGTAGGGGAATACTGCGAAATGCGGATGTAC
GCGGACCTAGCCCCGAAGAGCACGGCCGCGACTAAGACCGGGGTTGAG
GGGGACAAAATAAAAGAGGGGCGGAGGGGACTGAACCGAGGCCGTGCCAG
GACAAGTACCGCCATTAAAAGGACGGACCCTGGAGCAAAGAGGACCGG
GGTTGGAACAAAGAATCGGGAGGGCGGGGTGGGGGAAAGTTCGGGGTGGGA
GATGCGTGGGATAAAACCACCACGAGGGCAAAACCTGGCCTTCTCACGGC
CGAAGAACACCCGGGAACACCCCCGGGGAAACAGAGCGGGGGGGGGGG
GGGGAAAAGGTGTGGGGCGTCATGGGGCGGTGAGGGGGGGGTAAAACCG
GGGGACTCGCGCTGCGGGGGGGGGAGGTGCACAAAAACAACCAAAGAGG
GGTGACACCCGCCCTTGGTGACAAAGAAGGATCCAATACCCACTGGGGG
GGGGAGAGAGGGGGGGGTGACGGGTTCCGCGTCTCCGCCGTTGGGAGGAC
GCACTCCCGGCGCGGGCCCCGCGGGGAGGCGTAGGGGGCGGGGACTCGC
GCCTCGGCCTGCGCGGGGTGGGGGAAGGTGGACACATCGCGCAGGAGGTG
CGTGGGGTGTACGGAGGCCGGGCGCGCGTGGGACTGGG
```

Anexo 7: Espectroferograma de la cepa C1-1

File: 26 ITS1.ab1 Run Ended: 2024/6/25 22:40:15 Signal G:3416 A:6180 C:8744 T:12828
Sample: 26 ITS1 Lane: 8 Base spacing: 15.512072 1587 bases in 20675 scans Page 1 of 2





Autorización de publicación en el repositorio institucional

Evelyn Tatiana Camposano Reyes y Daniela Fernanda Serrano Vera portadoras de las cédulas de ciudadanía N° 3040031043 y N° 0107419178. En calidad de autoras y titulares de los derechos patrimoniales del trabajo de titulación “**Levaduras psicotolerantes en ambientes extremos domésticos de la Sierra Ecuatoriana**” de conformidad a lo establecido en el artículo 114 Código Orgánico de la Economía Social de los Conocimientos, Creatividad e Innovación, reconocemos a favor de la Universidad Católica de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos y no comerciales. Autorizamos además a la Universidad Católica de Cuenca, para que realice la publicación de éste trabajo de titulación en el Repositorio Institucional de conformidad a lo dispuesto en el artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, 3 de octubre de 2024

F: 

Evelyn Tatiana Camposano Reyes

C.I. 3040031043

F: 

Daniela Fernanda Serrano Vera

C.I. 0107419178