



**Universidad Nacional del Comahue**  
**Centro Regional Universitario Bariloche**

Trabajo de Tesis para optar al Título de Doctora en Biología:

**COMUNIDADES DE HONGOS POLIEXTREMÓFILOS  
DE LA PATAGONIA ARGENTINA: BIODIVERSIDAD  
Y BIOTECNOLOGÍA**

Lic. Rubí Azul Duo Saito

Directora  
Dra. Virginia de Garcia

Co-Director  
Dr. Diego Libkind Frati

~ 2022~

Este trabajo de Tesis fue realizado en el Centro de Referencia de Levaduras y Tecnología Cervecera, del Instituto Andino Patagónico de Tecnologías Biológicas y Geoambientales (IPATEC, UNComahue – CONICET) en el Centro Regional Universitario Bariloche (CRUB), de la Universidad Nacional del Comahue (UNComahue).

**Lic. Rubí Azul Duo Saito**

Centro de Referencia de Levaduras y Tecnología Cervecera - CRELTEC (UNComahue – CONICET)

**Dra. Virginia de Garcia**

Instituto de Investigación y Desarrollo en Ingeniería de Procesos, Biotecnología y Energías Alternativas - PROBIEN (UNComahue – CONICET)

**Dr Diego Libkind Frati**

Centro de Referencia de Levaduras y Tecnología Cervecera - CRELTEC (IPATEC, UNComahue – CONICET)

## **AGRADECIMIENTOS:**

A mi directora de tesis, Dra Virginia de Garcia, gracias por tu eterna paciencia, tu energía y apoyo incondicional.

A mi co-director, Dr. Diego Libkind, por su apoyo y guía invaluable.

A la Universidad Nacional del Comahue y en particular al Centro Regional Universitario Bariloche (CRUB) por ser el espacio que me permitió llevar a cabo mis ensayos y por brindarme las herramientas para completar mi formación profesional

Al Doctorado en Biología por brindarme el marco institucional y académico para hacer mi carrera de posgrado.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por la Beca Doctoral Interna otorgada, que fue fuente de recursos y motivador de este trabajo de investigación.

A los miembros evaluadores, asesores, y docentes por sus valiosísimos aportes y por el gran esfuerzo realizado.

Al personal del CRUB, del Instituto de Investigaciones en Biodiversidad y Medio Ambiente (INIBIOMA) y del Instituto Andino Patagónico de Tecnologías Biológicas y Geoambientales (IPATEC) por su asesoramiento y colaboración técnica y administrativa.

Y con quienes compartimos espacios de trabajo, por brindarme su compañía y colaboración durante todos estos años. A todos los profesionales que me han acompañado en algún momento de este proceso. En particular a la Dra. Andrea Trochine, Dr. Martin Moline, Dra. Ayelen Carron, Dr. Juan Eizaguirre, Lic. Lucia Pajarola, Lic. Mailen Latorre, Lic. Denise Moguilevsky por su ayuda y aportes en las actividades de campo, de laboratorio y otras actividades académicas.

A mi compañero Mauricio, quien vió mis pequeñas y grandes batallas y me acompañó en cada una de ellas. A mi madre Marisa y a la memoria de mi padre Emilio, por ser el apoyo incondicional que necesité en los momentos difíciles. A mis hermanos (Amiel, Mikael y Alín) por su complicidad y compañerismo. A mi abuelo Alberto, por su amor y su ejemplo de resiliencia.

# Índice

|               |    |
|---------------|----|
| ÍNDICE.....   | I  |
| RESUMEN.....  | IV |
| ABSTRACT..... | VI |

## **CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN GENERAL**

|  |    |
|--|----|
| 1.1 AMBIENTES EXTREMOS.....  | 2  |
| 1.2 AMBIENTES GLACIARIOS .....   | 3  |
| 1.3 GLACIARES DEL MONTE TRONADOR: PARQUE NACIONAL NAHUEL<br>HUAPI, PATAGONIA ARGENTINA.....          | 5  |
| 1.4 BIODIVERSIDAD MICROBIANA: MÉTODOS DE ESTUDIO.....  | 8  |
| 1.5 BIODIVERSIDAD MICROBIANA: HONGOS Y LEVADURAS.....  | 8  |
| 1.6 ESTRATEGIAS DE ADAPTACIÓN A LOS AMBIENTES EXTREMOS FRÍOS Y<br>OPORTUNIDADES BIOTECNOLÓGICAS..... | 9  |
| 1.7 LEVADURAS OLEAGINOSAS.....   | 11 |
| 1.8 HIPOTESIS Y OBJETIVO GENERAL.....  | 12 |
| 1.9 OBJETIVOS PARTICULARES.....  | 12 |
| 1.10 ORGANIZACIÓN DE LA TESIS.....   | 13 |

## **CAPÍTULO II: BIODIVERSIDAD DE LEVADURAS CULTIVABLES ASOCIADAS AL SISTEMA GLACIAR DEL MONTE TRONADOR**

|  |    |
|--|----|
| 2.1 INTRODUCCIÓN.....  | 15 |
| 2.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....                                    | 16 |
| 2.2.1 RECOLECCIÓN DE MUESTRAS.....                               | 16 |
| 2.2.2 DISEÑO EXPERIMENTAL.....                                   | 20 |
| 2.2.3 PROCESAMIENTO DE MUESTRAS.....                             | 21 |
| 2.2.4 AISLAMIENTO Y PRESERVACIÓN DE LEVADURAS.....               | 21 |
| 2.2.5 IDENTIFICACIÓN MOLECULAR.....                              | 22 |
| 2.2.6 EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE ADN GENÓMICO PARA<br>PCR..... | 22 |
| 2.2.7 AMPLIFICACIÓN DE ADN GENÓMICA (PCR).....                   | 23 |
| 2.2.8 ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAR.....                         | 23 |
| 2.2.9 ANÁLISIS DE SECUENCIAS DE LA REGIÓN ITS.....               | 23 |

|  |    |
|--|----|
| 2.2.10 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.....                  | 24 |
| 2.3 RESULTADOS.....                                | 24 |
| 2.3.1 RECUENTO Y AISLAMIENTO DE LEVADURAS.....     | 24 |
| 2.3.2 BIODIVERSIDAD DE LEVADURAS POR SUSTRATO..... | 32 |
| 2.3.3 BIODIVERSIDAD DE LEVADURAS POR SITIO.....    | 35 |
| 2.4 DISCUSIÓN.....                                 | 37 |
| 2.5 CONCLUSIONES PARCIALES.....                    | 43 |

**CAPÍTULO III: BIODIVERSIDAD DE LEVADURAS Y HONGOS DE GLACIARES DEL MONTE TRONADOR UTILIZANDO MÉTODOS MOLECULARES LIBRE DE CULTIVO**

|   |    |
|---|----|
| 3.1 INTRODUCCIÓN.....                                       | 46 |
| 3.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....                               | 47 |
| 3.2.1 RECOLECCIÓN DE MUESTRAS Y DISEÑO EXPERIMENTAL.....    | 47 |
| 3.2.2 EXTRACCIÓN TOTAL DE ADN.....                          | 47 |
| 3.2.3 AMPLIFICACIÓN DE ADN.....                             | 48 |
| 3.2.4 SECUENCIACIÓN POR PIROSECUENCIACIÓN 454.....          | 48 |
| 3.2.5 SECUENCIACIÓN POR ILLUMINA MISEQ.....                 | 48 |
| 3.2.6 PROCESAMIENTOS DE DATOS.....                          | 49 |
| 3.2.7 ANÁLISIS FILOGENÉTICOS.....                           | 49 |
| 3.2.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.....                            | 50 |
| 3.3 RESULTADOS.....   | 50 |
| 3.3.1 DATOS DE SECUENCIACIÓN.....                           | 50 |
| 3.3.2 DIVERSIDAD Y ESTRUCTURA DE LAS COMUNIDADES FÚNGICAS.. | 51 |
| 3.3.3 ESTRUCTURA DE CADA SITIO DE MUESTREO.....             | 54 |
| 3.3.4 SISTEMA DE ESTUDIO DEL MONTE TRONADOR.....            | 64 |
| 3.4 DISCUSIÓN.....  | 70 |
| 3.5 CONCLUSIONES PARCIALES.....                             | 79 |

**CAPÍTULO IV: LEVADURAS EN AMBIENTES FRÍOS: MONTE TRONADOR Y OTROS AMBIENTES GLACIARIOS**

|   |    |
|---|----|
| 4.1 INTRODUCCIÓN.....   | 82 |
| 4.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....                                   | 83 |
| 4.2.1 ANÁLISIS FÍSICO-QUÍMICOS DE LOS DIFERENTES SUSTRATOS..... | 84 |

|   |            |
|---|------------|
| 4.2.2 DATOS AMBIENTALES.....  | 84         |
| 4.2.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.....  | 84         |
| 4.3 RESULTADOS.....   | 85         |
| 4.3.1 ANÁLISIS FÍSICO-QUÍMICOS DE LAS MUESTRAS.....                                     | 85         |
| 4.3.2 ANÁLISIS COMPARATIVO DE LAS METODOLOGÍAS DE ESTUDIO DE<br>DIVERSIDAD FÚNGICA..... | 88         |
| 4.4 DISCUSIÓN.....  | 95         |
| 4.5 CONCLUSIONES PARCIALES.....   | 101        |
| <b>CAPÍTULO V: PRODUCCIÓN DE LÍPIDOS EN LEVADURAS<br/>EXTREMOTOLERANTES</b>             |            |
| 5.1 INTRODUCCIÓN.....   | 104        |
| 5.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....   | 106        |
| 5.2.1 PRODUCCIÓN DE BIOMASA Y LÍPIDOS.....  | 106        |
| 5.2.2 CARACTERIZACIÓN DE LOS PERFILES DE ÁCIDOS GRASO.....                              | 109        |
| 5.3 RESULTADOS.....   | 110        |
| 5.3.1 PRODUCCIÓN LIPÍDICA – ENSAYO PRELIMINAR.....                                      | 110        |
| 5.3.2 PRODUCCIÓN LIPÍDICA – ENSAYO EXTENDIDO.....                                       | 111        |
| 5.3.3 PRODUCCIÓN LIPÍDICA – ENSAYO SELECTIVO.....                                       | 114        |
| 5.4 DISCUSIÓN.....  | 117        |
| 5.5 CONCLUSIONES PARCIALES.....   | 121        |
| <b>CONCLUSIONES FINALES.....</b>  | <b>122</b> |
| <b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>   | <b>126</b> |
| <b>ANEXOS .....</b>   | <b>149</b> |
| ANEXO I.....  | 150        |
| ANEXO II.....   | 160        |
| <b>ARTÍCULO DE RESPALDO .....</b>   | <b>161</b> |

## **RESUMEN**

Los ambientes fríos representan cerca del 80% de la superficie del mundo, ya sea de forma periódica o permanente. Estos ambientes son diversos y abarcan desde las profundidades oceánicas, los casquetes polares, y los glaciares de montaña, estos últimos son numerosos en la Patagonia Argentina. Los ambientes extremos fríos son propicios para el desarrollo microbiano, haciendo de estos un reservorio importante de microorganismos adaptados a las bajas temperaturas. La variedad de metodologías existentes para el estudio de comunidades microbianas nos permite estudiar el mismo ambiente con diferentes perspectivas, las metodologías clásicas de cultivo permiten obtener los microorganismos para su estudio y posible aplicación. En los últimos años se ha intensificado el uso de la secuenciación de amplicones a gran escala en el estudio de la ecología microbiana, lo que permite evaluar la estructura de la comunidad y sus cambios espaciotemporales. La popularidad de estas herramientas se deriva de la capacidad de estudiar microorganismos cultivables y no cultivables. Los hongos son microorganismos clave en los ambientes fríos, pueden presentarse como simbioses en micorrizas o líquenes y como saprótrofos que contribuyen al ciclo de nutrientes. También, constituyen uno de los grupos de eucariotas más activos metabólicamente en los glaciares y presentan diferentes estrategias para sobrevivir en los ambientes extremos que los hacen interesante para el estudio de diferentes mecanismos de resistencia y para su prospección biotecnológica.

Por todo lo mencionado se planteó como objetivo principal de esta tesis contribuir al conocimiento sobre la biodiversidad de las comunidades fúngicas de los ambientes naturales andino-patagónicos, con especial énfasis en las levaduras poli-extremófilas, expuestas a bajas temperaturas y condiciones oligotróficas. También se evaluó la potencialidad biotecnológica de las levaduras nativas como fuente de ácidos grasos de interés industrial.

Se estudiaron 3 zonas en el Monte Tronador: glaciar Castaño Overa, río Castaño Overa y glaciar Ventisquero Negro, donde se tomaron muestras de suelo, hielo, nieve y agua. Se aislaron un total de 441 levaduras de las cuales, 106 fueron identificadas a nivel de especie por medios moleculares. La mayoría de las levaduras aisladas, para todos los sustratos, correspondieron al phylum Basidiomycota. Se aislaron dos posibles especies nuevas, pertenecientes a los géneros *Cryolevonia* y *Solicoccozyma*.

En base a la secuenciación masiva de amplicones (metagenómica), se registró por primera vez la presencia de quitridios en glaciares patagónicos. De la misma manera se pudo observar la prevalencia de hongos filamentosos ascomicéticos en el suelo y de secuencias pertenecientes a

la clase Microbotryomycetes del phylum Basidiomycota en el hielo, la nieve y el agua. El ambiente estudiado corresponde a un ambiente oligotrófico y la mayoría de las levaduras y hongos identificados, ya sea por medio convencionales de aislamiento o mediante metagenómica, correspondieron a saprobios de vida libre. Dentro de las levaduras nativas seleccionadas en este trabajo, el 42% produjo vacuolas lipídicas, utilizando efluente cervecero como medio de cultivo.

Este trabajo representa el primer estudio de relevamiento metagenómico de comunidades de hongos en glaciares del Monte Tronador (Patagonia, Argentina), permitiendo tener un registro de los grupos taxonómicos presentes en estos, comparando estos resultados con los obtenidos para levaduras cultivables. Las levaduras aisladas fueron identificadas y en un grupo de levaduras seleccionadas se analizó la capacidad de producir lípidos utilizando efluentes de la industria cervecera como medio de cultivo. Este trabajo muestra la importancia del estudio de las comunidades de levaduras que habitan los ambientes glaciarios, no solo por la potencialidad biotecnológica que poseen, y su importancia para el desarrollo tecnológico, si no también porque identifica las especies más relevantes en estos ambientes fríos, muchos de los cuales, probablemente desaparezcan en los próximos años.

## **ABSTRACT**

Cold environments represent about 80% of the world's surface, either periodically or permanently. These environments are diverse and range from the ocean depths, polar ice to mountain glaciers, the latter are numerous in Patagonia Argentina, and represent an important reservoir of microorganisms adapted to low temperatures. The application of different approaches for their study enables the investigation of the same environment with different perspectives. The classic methodologies allow to cultivate microorganisms for their study and its possible application. In recent years, the use of next generation sequencing for the study of microbial ecology has been intensified, allowing the evaluation of community structure and its spatio-temporal changes. The popularity of these tools stems from the ability to study cultivable and non-culturable microorganisms. Fungi are key microorganisms in cold environments, they can occur as symbionts in mycorrhizae or lichens and as saprotrophs, and they may have a significant ecological role in organic matter decomposition and nutrients in glacial environments. Also, are the eukaryotes more metabolically active in glaciers, and present different strategies to survive in extreme environments, which make them interesting for the study of different resistance mechanisms and for biotechnological prospecting.

For all the above, the main objective of this work was to contribute to the knowledge of the biodiversity of the fungal communities of the Andean-Patagonian glacial environments, with special emphasis on poly-extremophiles yeasts, exposed to low temperatures and oligotrophic conditions. The biotechnological potential of native yeasts as a source of fatty acids of industrial interest was also evaluated.

Soil, ice, snow, and water samples were taken from 3 sampling zones on Mount Tronador: Castaño Overa Glacier, Castaño Overa River, and Ventisquero Negro Glacier. A total of 441 yeasts were isolated, and based on their morphological characteristics 106 were selected and identified to species level. Most of the isolates were related to the phylum Basidiomycota. Two possible new species were obtained related to *Cryolevonia* and *Solicoccozyma* genera.

Due to metagenomics analysis, the presence of chytrids in glaciers was recorded for the first time for Patagonia Argentina, also the prevalence of ascomycetic filamentous fungi in soil and sequences belonging to Microbotryomycetes class in ice, snow and water, were detected. The studied environments are oligotrophic and the majority of the yeasts and filamentous fungi identified, corresponded to free-living saprobes. A group of 52 selected isolates, were studied in their ability of accumulate lipid vacuoles, using brewery effluent as culture medium and our results showed that 42% of these isolates presented significant lipid accumulation.

This is the first work that includes metagenomic analysis of the fungal community in glaciers of Mount Tronador (Patagonia, Argentina). The taxonomic groups detected were compared with those obtained for cultivable yeasts. This work shows the importance of studying yeast communities that inhabit extreme environments such as glaciers, not only because of their biotechnological potential and their importance for technological development, but also because it registers the most relevant species in these cold environments, many of which will probably disappear in the next few years.

# **CAPÍTULO I**

## **INTRODUCCIÓN GENERAL**

## 1.1 AMBIENTES EXTREMOS

Un ambiente es catalogado como extremo cuando las condiciones físico-químicas que este presenta se alejan de los parámetros considerados óptimos para la vida, como por ejemplo aquellos que permiten el desarrollo de organismos modelos como *Escherichia coli*, y que se acercan al óptimo desde una mirada antropocéntrica (Antranikian, 2009; Canganella & Wiegel, 2011, Tesei et al., 2019). En el planeta tierra existen múltiples hábitats con características consideradas extremas, estos incluyen ambientes como el fondo oceánico, aguas termales, salinas, ríos ácidos, desiertos, glaciares, zonas de altura, entre otros. Los microorganismos que han logrado adaptarse a los ambientes extremos se denominan, en términos generales, como extremófilos y pueden dividirse en dos grandes grupos: los obligados, que solo pueden crecer y reproducirse en estas condiciones extremas y los facultativos, que pueden tolerarlas, pero se desarrollan mejor en condiciones más favorables para el crecimiento y reproducción. También pueden definirse según el parámetro extremo al que se han adaptado, como, por ejemplo: ambientes ácidos: acidófilos/acidotolerantes; ambientes cálidos: termófilos/termotolerantes, ambientes fríos: psicrófilos/psicrotolerantes, ambientes con alta concentración de solutos orgánicos: osmófilos/osmotolerantes; ambientes con alta concentración de solutos inorgánicos: halófilos/halotolerantes, etc. A su vez, los microorganismos que están adaptados a más de una de estas condiciones extremas, se denominan poliextremófilos (Herbert, 1992; Pennisi, 1997; Margesin et al., 2007; Canganella & Wiegel, 2011, Tiquia-Arashiro & Grube, 2019). La extremofilia, en particular la poliextremofilia, ha sido asociada mayormente a los microorganismos procariotas, sin embargo, esta característica se extiende en los tres dominios de la vida (Rothschild & Mancinelli, 2001; Hassan et al., 2016).

En general, los ambientes con condiciones ambientales extremas y/o gran dificultad para los asentamientos humanos por su aislamiento geográfico, representan escenarios ideales para examinar el proceso evolutivo de los microorganismos nativos, puesto que este mismo proceso de conservación favorece la especiación de organismos endémicos (Gostincar et al., 2009; Cantrell et al., 2011). Los ambientes fríos representan uno de los ambientes extremos más extendidos, dado que el 85% de la superficie de la tierra se encuentra a 5°C de manera estacional o permanente (Gupta et al., 2020). Se encuentran representados por los casquetes de hielo y nieve árticas y antárticas, el permafrost, los glaciares de montaña, el hielo marino y el agua de los océanos profundos. Estos ambientes presentan factores físico-químicos asociados, que condicionan el desarrollo de la vida, como por ejemplo la alta radiación UV, la baja actividad de agua, baja disponibilidad de nutrientes, alta presión hidrostática y estrés oxidativo, entre otros (Goordial et al., 2013, Buzzini et al., 2018).

La temperatura de la superficie terrestre de los últimos 5 años ha sido la más elevada desde que se comenzó a registrar en 1880 (Cole & McCarthy, 2018). La magnitud de estos cambios de temperatura impulsa el estudio de ambientes de frío extremo, y microorganismos adaptados a estos ambientes, pues dichos hábitats podrían perderse en pocos años. Los estudios paleobotánicos demuestran que los hongos del suelo del Ártico han respondido al calentamiento climático, y el aislamiento y conservación de los hongos extremófilos se considera un medio para evitar su posible extinción (Zalar & Gunde-Cimerman, 2014).

En nuestro país existen numerosos glaciares de montaña, que comprenden un vasto territorio con una riqueza microbiológica muy amplia y en parte desconocida (de Garcia et al., 2014; de Garcia et al., 2020). Por todo lo mencionado, resulta esencial el estudio y conservación de los recursos genéticos propios para evitar la pérdida de biodiversidad y el acceso a genomas y características diferentes a las de otras regiones geográficas.

## 1.2 AMBIENTES GLACIARIOS

La criósfera es un ambiente cuyos componentes, como el suelo y la atmósfera, se encuentran sujetos a temperaturas por debajo de 0°C durante al menos una parte del año (ACIA, 2005). Los glaciares conforman sólo una parte de la criósfera, junto con el permafrost, las coberturas de nieve estacionales y el suelo congelado (Lehmann-Konera, et al., 2017). Los glaciares son cuerpos de hielo, dinámicos, frágiles y compactos. Se ubican en el ambiente terrestre, formados a través de la recristalización de la nieve y tienden a avanzar por su propio peso (Singh, et al., 2011).

Según el Inventario Randolph de glaciares (RGI, *Randolph Glacier Inventory*, colección de datos globales digitalizados de glaciares), el área total glacializada en el mundo es de 726800 km<sup>2</sup>. Donde la región con la mayor cantidad de hielo es la Antártida y el área subantártica (que incluye el sur de la Cordillera de los Andes) con 132900 km<sup>2</sup>, seguido por el Ártico y la zona norte de Canadá con 104900 km<sup>2</sup> (Pfeffer et al., 2021). La cordillera de los Andes se extiende por al menos 8000 km en la region sur de America Latina, presentando la region montañosa con la mayor diversidad de condiciones climáticas y topográficas del mundo, siendo la región subtropical semi-árida de los Andes de Chile y Argentina una de las áreas con la mayor cantidad de glacières montañosos que existen (Zalazar et al., 2020). Los Andes incluyen, además, la mayor area glacializada en el hemisferio sur fuera de la Antártida, y presentan la mayor extensión de nieve estacional y permafrost de montaña en esta parte del globo (Masiokas et al., 2020).

Los glaciares de montaña se desarrollan en regiones montañosas altas, a menudo fluyen desde campos de hielo, que abarcan varios picos o incluso una cadena montañosa completa (Sigh et

al., 2011). Estos glaciares pueden dividirse en 3 hábitats o ecosistemas: supraglacial, englacial y subglacial, cuyas condiciones, en términos de radiación solar, contenido de agua, contenido de nutrientes y potencial redox, difieren considerablemente unas de otras (Hodson et al., 2008). La zona supraglacial abarca la interfaz entre la superficie de hielo/nieve y las condiciones atmosféricas; los principales hábitats del ecosistema supraglacial son la capa de nieve, los hoyos de criocónita, los arroyos supraglaciales y las morenas (García-López et al., 2019). La zona englacial no sólo incluye ambientes profundos y enterrados, sino también las paredes verticales de grietas y molinos glaciares<sup>1</sup>, que pueden transportar agua, nutrientes, gases atmosféricos y biota hacia el interior del glaciar (Hodson et al., 2008). La zona subglacial comprende el área donde el hielo de los glaciares interactúa directamente con el lecho rocoso y el agua de deshielo e incluye cualquier hábitat que esté perpetuamente cubierto por hielo glaciar (Ren et al., 2019). Los ambientes de alta montaña moldeados por glaciares se caracterizan por ubicarse en las altas cumbres por encima del límite superior del bosque conocido como *treeline* o *timberline*. Ecológicamente y en el estudio de comunidades, los ambientes de alta montaña son muy importantes, ya que conforman una de las principales fuentes de agua dulce, funciona como refugio de flora y fauna, con una elevada biodiversidad gracias a la variabilidad ambiental y la baja influencia humana (Pauli et al., 1996; Ferreyra et al., 1998b). En su geología presentan un relieve con laderas suaves y escarpadas, suelos rocosos y arenosos, inestables, inmaduros y superficiales, clima frío la mayor parte del año, abundantes precipitaciones en cualquier estación, acumulación de nieve en invierno, humedad relativa baja, elevada amplitud térmica, alta radiación, fuertes vientos y bajas presiones parciales de oxígeno y dióxido de carbono (Ferreyra, 1995).

En Argentina los ambientes de alta montaña, presentan numerosos glaciares que se encuentran distribuidos a lo largo de la cordillera de los Andes, estos incluyen los Hielos Patagónicos, que representan el 60% del área glaciar en el hemisferio sur fuera de la Antártida. Este hielo de origen glaciar almacena cerca de 33 millones de km<sup>3</sup> de agua dulce. Siendo que la mayoría de los glaciares continentales del mundo están en proceso de retroceso (Delgado Granados et al. 2007; Ruiz y Trombotto Liaudat, 2012), parece imprescindible trabajar para la conservación de los recursos genéticos presentes en estos, ya que sólo una pequeña fracción ha sido estudiada a nivel microbiológico. Los glaciares presentes en la Patagonia Norte no son una excepción (Villarosa et al., 2008). La mayoría de los glaciares actuales estudiados en esta zona se encuentran

---

<sup>1</sup> Molino glaciar: se le denomina a una cascada producida en una especie de sumidero en la superficie de un glaciar y que se forma en una grieta o pozo en el hielo con las aguas fundidas en la superficie por la acción de los rayos solares.

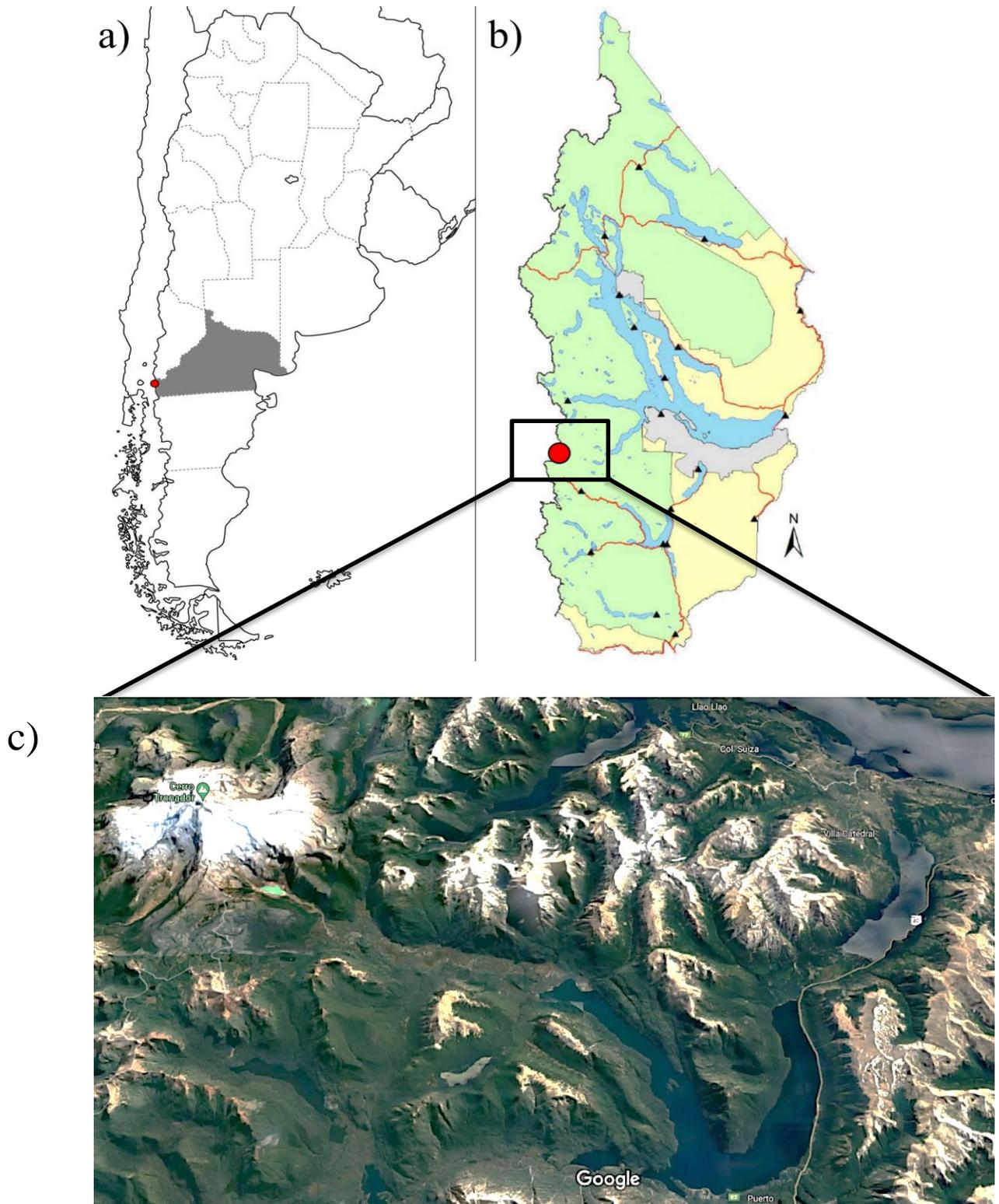
relacionados con aparatos volcánicos activos e inactivos y poco se conoce sobre la verdadera distribución de los glaciares, el permafrost de montaña (glaciar de escombros) y el suelo desnudo asociado a estos (Ruiz & Trombotto, 2012; Ruiz et al., 2017).

Las particulares características físicas y ambientales de los Andes Patagónicos, hacen que la zona posea un altísimo potencial para estudios glaciológicos y paleoclimáticos (Stuefer et al., 2007; Villarosa et al., 2008, Ruiz et al., 2017). Estos ambientes tienen una gran importancia y su estudio provee un gran aporte a diferentes áreas de la ciencia como microbiología, biotecnología, ecología, biología molecular, paleontología y astrobiología (Gilichinsky et al., 2007; de Garcia et al., 2014; Libkind et al., 2016).

### **1.3 GLACIARES DEL MONTE TRONADOR: PARQUE NACIONAL NAHUEL HUAPI, PATAGONIA ARGENTINA**

El Parque Nacional Nahuel Huapi (PNNH) se encuentra localizado en los Andes patagónicos en la frontera de Argentina y Chile, al noroeste de la Patagonia Argentina. Posee un clima templado frío e incluye vastas áreas naturales con poca o ninguna influencia humana. Dentro de este parque nacional se encuentra el Monte Tronador (3554 m snm), antiguo estratovolcán extinto que posee un casquete de 12 glaciares, los que incluyen glaciares de valle (Verde, Casa Pangué, Manso y Blanco) y de montaña (Alerce, Castaño Overa, Frías, Norte, Peulla, Mistral, Parra y Vuriloches) (Ruiz et al., 2017). La temperatura media anual en el área es de 8,3 °C, con temperaturas bajo cero en los meses de invierno. La precipitación media anual registrada por la Autoridad Interjurisdiccional de Cuencas entre los años 2013 y 2017 llegó a los 1186 mm (Hotel Tronador, 41°9.6'S, 71°23.4O, 815 m snm) (Figura 1.1).

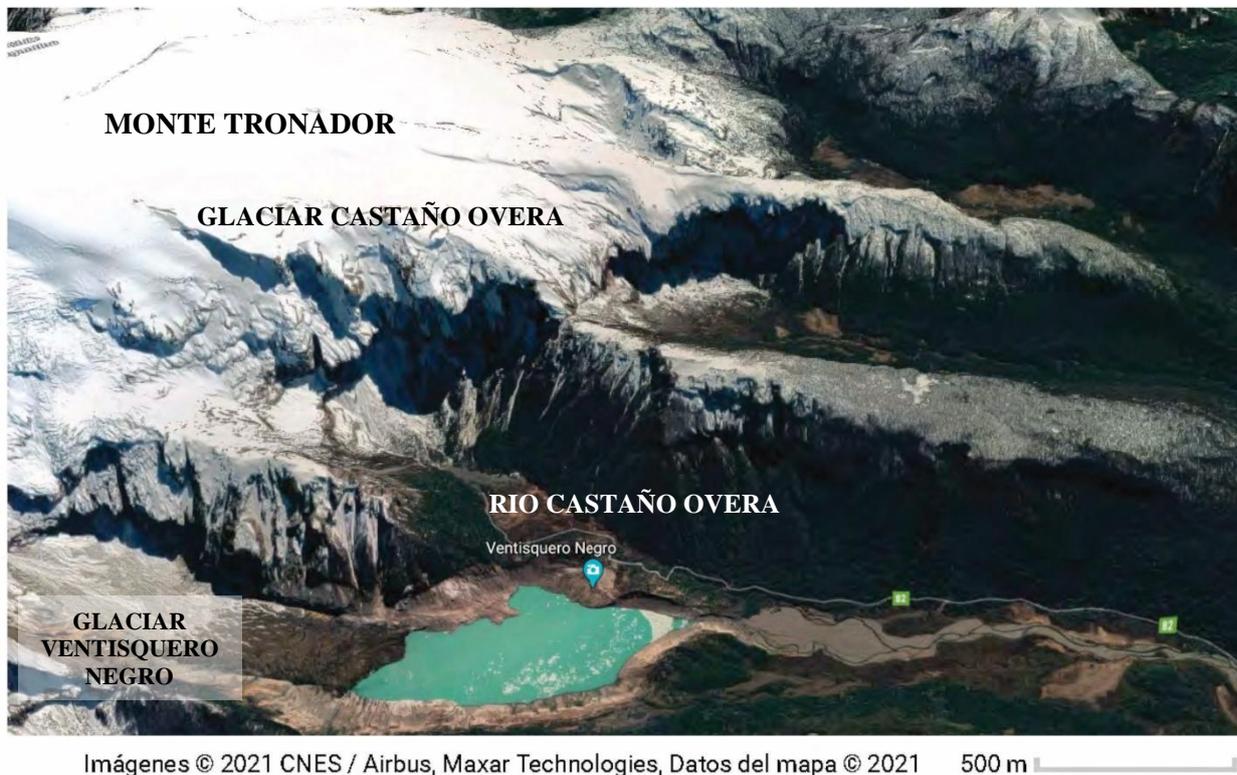
**Figura 1.1: Ubicación geográfica del Cerro Tronador y las zonas de interés de este trabajo**  
 a) Mapa político de Argentina, en gris la provincia de Río Negro; b) Mapa geográfico del Parque Nacional Nahuel Huapi; el punto rojo indica la ubicación del Cerro Tronador; c) Imagen satelital obtenida de Google earth del Monte Tronador y lagos circundantes.



Dentro de los glaciares de interés para este estudio se encuentran el glaciar Castaño Overa (glaciar de montaña) y el Ventisquero Negro (glaciar de regeneración), ambos glaciares están ubicados en el territorio argentino y han registrado una continua recesión en los últimos años (Ruiz et al., 2017) (Figura 1.2).

**Figura 1.2: Ubicación geográfica de las zonas de muestreo en el Monte Tronador**

Imagen satelital obtenida de Google earth del Monte Tronador y lagos circundantes.



El glaciar Castaño Overa se encuentra por encima de los 2114 m snm, al este del sistema glaciar del Monte Tronador (Ruiz, et al., 2015). Es un glaciar relativamente pequeño en comparación con otros de la cuenca del río Manso superior (glaciar Manso y Alerce) (Villarosa et al., 2008). De este glaciar nace el río de deshielo Castaño Overa que transcurre hacia el río Manso superior. El glaciar Ventisquero Negro está cubierto por una gruesa capa de escombros y es alimentado por nieve, hielo y sedimentos provenientes del glaciar Manso (Worni et al., 2012). Se ha observado una recesión entre principios de la década de 1990 y el presente (Masiokas et al., 2008; Ruiz, et al., 2017; Worni, et al., 2014), aumentando el volumen del lago proglaciar circundante (lago proglaciar Ventisquero Negro). Este tipo de lagos proglaciares se caracterizan por fuertes aportes de arcilla glacial (Peter & Sommaruga, 2016) lo que se traduce en un aumento de las partículas en suspensión y de la turbidez. El agua proveniente de ambos glaciares contribuye al río Manso superior y posteriormente al Lago Mascardi.

#### **1.4 BIODIVERSIDAD MICROBIANA: MÉTODOS DE ESTUDIO**

Los métodos de estudio de la biodiversidad microbiana en ambientes naturales han evolucionado en los últimos años, lo que ha permitido desarrollar herramientas que agilizan la recopilación de datos. La metagenómica es un campo que combina los últimos avances en biología molecular (ej. métodos de secuenciación de última generación) haciendo posible la descripción de las comunidades microbianas de forma rápida y sin depender del método de cultivo. Se estima que, en las condiciones de cultivo provistas en el laboratorio, sólo el 1% de los microorganismos logran crecer, por lo que los estudios metagenómicos proveen información valiosa para la descripción y para complementar la información de la biodiversidad microbiana (Ranjard et al., 2001; Riesenfeld et al., 2004; Schloss & Handelsman, 2008).

Los métodos de secuenciación de última generación incluyen tecnologías recientemente desarrolladas que secuencian paralelamente de forma masiva una mezcla de fragmentos de ADN diversos (Boundy-Mills, 2014). Dentro de los métodos más utilizados se encuentran la pirosecuenciación, empleada por el sistema 454 de Life Sciences (Roche) y la plataforma Illumina, que en la actualidad es de las más utilizadas en secuenciación de amplicones y estudios de comunidades microbiológicas (Nilsson et al., 2019a). Debido a que son necesarias regiones hipervariables y de alto valor taxonómico para los estudios de secuenciación de ADN ambiental, en general se emplean secuencias relacionadas con la síntesis de los ribosomas. En los estudios de identificación de hongos, se utiliza mayoritariamente la región ITS (*Internal Transcribed Spacer*) que se encuentra descrita como código de barras para estos organismos (Buée et al., 2009; Petrosino et al., 2009) y que posee una amplia selección de bases de datos (Nilsson et al., 2019b). Al mismo tiempo y complementando los estudios de amplicones, los métodos basados en el cultivo de microorganismos poseen la ventaja de permitir el estudio de las propiedades fisiológicas, metabólicas y el desarrollo biotecnológico posterior, en donde es necesario el cultivo puro de los microorganismos a estudiar (Boundy-Mills, 2014).

#### **1.5 BIODIVERSIDAD MICROBIANA: HONGOS Y LEVADURAS**

Los hongos cumplen un rol importante a nivel ecológico, ya que son organismos de formas de vida heterótrofa, que están relacionados con el ciclo, la movilización de nutrientes y juegan un papel esencial en los procesos de producción de biomasa (Brunner et al., 2017). Tienen perfiles nutricionales heterogéneos; pueden ser unicelulares (aquellos predominantemente unicelulares son denominados levaduras), formar filamentos (micelio) y cuerpos fructíferos a los que se denomina hongos filamentosos, o poseer ambas fases (unicelular y filamentosa) y ser catalogados como hongos dimórficos (Palm & Chapela, 1997, Treseder & Lennon, 2015). Las

características que presentan algunos taxones de hongos como la reproducción sexual y asexual, producción de estructuras de resistencia, síntesis de pigmentos y metabolitos secundarios podrían considerarse pre-adaptaciones que facilitan la persistencia y la eventual adaptación a diferentes ambientes extremos (Cantrell et al., 2011; Collins & Margesin, 2019). Los hongos pueden crecer en condiciones de baja actividad de agua (aw), incluso mucho menor que las bacterias, y son capaces de sobrevivir a fuertes fluctuaciones osmóticas y térmicas, así como a bajas temperaturas ambientales, alta radiación UV y baja concentración de nutrientes (Gunde-Cimerman et al., 2003; Frisvad et al., 2008, Maggi et al., 2013; Tiquia-Arashiro & Grube, 2019). Los estudios realizados en ambientes extremos fríos han mostrado una amplia diversidad fúngica, alojada en diversos sustratos, como suelo desnudo de la Antártida y el Ártico (Connell et al., 2006; Sterflinger et al., 2012), agujeros de crioonita de diferentes glaciares de montaña (Bergauer et al., 2005; Singh & Singh, 2012), hielo glaciar y agua de deshielo de los Alpes (Turchetti et al., 2008; Branda et al., 2010) y hielo glaciar y agua de deshielo de la Patagonia Argentina (de Garcia et al., 2007; 2012; 2014; Libkind et al., 2009b; 2010; Brandão et al., 2011).

Las levaduras son un grupo de gran importancia dentro de los ambientes fríos. En los últimos años se ha incrementado el conocimiento de levaduras adaptadas a ambientes extremos en diferentes niveles, desde ecológicos hasta biotecnológicos (Turchetti et al., 2008; Buzzini et al., 2012; de Garcia et al., 2012, Buzzini & Margesin, 2014). En la Patagonia Argentina se han realizado, desde los años 1990, estudios sobre la biodiversidad de levaduras cultivables adaptadas al frío. Estos incluyen estudios sobre levaduras de hielo glaciar, agua de deshielo, agua de lagos y lagunas ultraoligotróficas, suelos, exudados de árboles, flores, corteza y hojas de plantas nativas (de Garcia et al., 2014, Libkind et al., 2017). En los estudios realizados en la Patagonia Argentina muchas de las levaduras aisladas han sido seleccionadas por presentar una amplia proyección biotecnológica, que abarca desde enzimas activas a bajas temperaturas, fermentaciones en frío, producción de exopolisacáridos, bioconversión de productos de desechos y/o contaminantes, producción de pigmentos, lípidos, compuestos fotoprotectores, entre otros (Libkind et al., 2008a; 2008b; Johnson, 2013a; 2013b; Moliné et al., 2014).

## **1.6 ESTRATEGIAS DE ADAPTACIÓN A LOS AMBIENTES EXTREMOS FRÍOS Y OPORTUNIDADES BIOTECNOLÓGICAS**

Se ha demostrado que en los ambientes extremos fríos existe una gran diversidad metabólica, asociada principalmente a bacterias, cianobacterias, arqueas, levaduras, algas y protozoos (Buzzini & Margesin, 2014; Margesin & Collins, 2019). Los microorganismos presentes en estos ambientes están expuestos a grandes variaciones de temperaturas en cortos periodos de tiempo,

alternando períodos de congelamiento y descongelamiento sucesivos. Además, deben tener la capacidad de crecer con baja actividad de agua, debido a que, al congelarse, deja de estar biológicamente disponible, llevando a la deshidratación celular. Cuando el hielo se derrite, los microorganismos liberados se encuentran expuestos a condiciones hiposalinas cercanas a los valores del agua dulce, por lo tanto, las bajas temperaturas causan estrés osmótico y oxidativo (Gunde-Cimerman et al., 2003; Turk et al., 2004). Esta clase de estrés puede activar la síntesis de diferentes metabolitos que pueden ayudar a la supervivencia de las células (acumulación de solutos compatibles y/o crioprotectores, adaptación de la composición de membrana, producción de proteínas anticongelantes, etc.) (Georlette et al., 2004; Gunde-Cimerman et al., 2004; Turk et al., 2004). A bajas temperaturas y alta concentración salina, la habilidad de los microorganismos de modular la flexibilidad de las membranas es crucial para su supervivencia. En respuesta a estas condiciones, microorganismos psicrófilos y halófilos incrementan los ácidos grasos insaturados de sus membranas, lo que les permiten mantener la fluidez en estas condiciones (Taha et al., 2013)

Los principales cambios que ocurren en todos los microorganismos como resultado de la disminución de la temperatura están relacionados con la composición de ácidos grasos (Russell, 2008). Los microorganismos eucariotas (levaduras, hongos filamentosos y algas) poseen esteroides que son filogenéticamente específicos, siendo el ergosterol el más común para los hongos. La composición de esteroides usualmente no cambia significativamente con las alteraciones de la temperatura: en cambio, la proporción relativa de esteroides totales y fosfolípidos es la característica clave de la regulación de la flexibilidad de membrana a bajas temperaturas en microorganismos eucariotas (Russell, 2008). Otra característica importante de los hongos de ambientes extremos fríos, es la producción predominante de ácidos grasos poli-insaturados (PUFAs por sus siglas en inglés) que conforman una variedad de ácidos grasos esenciales para la industria alimenticia (como los ácidos grasos Omega-3). La industria farmacéutica posee además interés en el uso de compuestos de alto valor como los carotenoides, astaxantina y fenoles (Ranga Rao et al., 2010; Goiris et al., 2012). Rossi et al. (2009) correlacionó la presencia de este tipo de ácidos grasos en levaduras, con la habilidad para crecer a bajas temperaturas, ya que observó un aumento significativo de producción de PUFAs a temperaturas cercanas a 4°C. La producción de PUFAs en un grupo pequeño de levaduras pigmentadas aisladas de lagos y lagunas de altura de la Patagonia fue estudiada, encontrándose perfiles de ácidos grasos típicos de microorganismos adaptados a bajas temperaturas y concluyendo que algunas de ellas podrían ser consideradas una fuente interesante de PUFA esenciales (Libkind et al., 2008c, Favier, 2019).

## 1.7 LEVADURAS OLEAGINOSAS

Las levaduras son los microorganismos de mayor aplicación industrial y con la mayor variedad de usos. En la actualidad se les presta cada vez mayor atención como fuente de compuestos lipídicos, para la generación de biodiesel, productos alimenticios y médicos (Adrio & Demain, 2003; Johnson & Echavarri-Erasun, 2011; Johnson, 2013a; 2013b). Un microorganismo oleaginoso está definido por su capacidad de acumular lípidos por encima del 20% de su peso seco, y por lo tanto puede ser interesante para su utilización en procesos biotecnológicos (Beopoulos et al. 2009; Ageitos et al., 2011). Las levaduras, junto con otros microorganismos como los hongos filamentosos, algas y plantas, pueden generar lípidos a partir de diferentes fuentes de carbono, muchas de las cuales derivan de desechos de productos industriales, como por ejemplo residuos enriquecidos en azúcares, polisacáridos, N-acetilglucosamina, hidrolizados de diversos productos o subproductos, aceites vegetales, residuos grasos, alcanos, etanol, glicerol y ácidos orgánicos. Todos estos constituyen fuentes de alimento de bajo costo que pueden ser utilizados eficientemente por los hongos oleaginosos (Iassonova et al., 2008; Ageitos et al., 2011; Papanikolaou & Aggelis, 2011a).

Si bien aún no se encuentra ampliamente distribuido en la industria, la producción de lípidos microbianos, especialmente de hongos oleaginosos, presenta la ventaja de ser fácilmente cultivables, poseer ciclos de vida cortos, altas tasas de crecimiento, no se ven afectados por el espacio, luz o condiciones climáticas (a diferencias de las plantas y algas productoras de aceites) y pueden utilizar una amplia variedad de fuentes de carbono (Papanikolaou & Aggelis, 2011b; Khot et al., 2012). Para que la producción de metabolitos de interés biotecnológico sea potencialmente rentable a nivel industrial, es ventajoso que los microorganismos oleaginosos sean capaces de utilizar sustratos de bajo costo, como derivados de subproductos o residuos de otros procesos biotecnológicos (Raimondi et al., 2014). Por otro lado, los hongos extremófilos o poliextremófilos ofrecen una doble solución para la producción de diferentes metabolitos a gran escala, ya que poseen mayor eficiencia en la conversión de nutrientes en biomasa (Rossi et al., 2009) y disminuyen la probabilidad de contaminaciones al prosperar en condiciones de pH, osmolaridad o temperaturas no convencionales, reduciendo así la competencia con otros microorganismos y abaratando los costos de la sanitización (Santamauro et al., 2013).

El escalado de los procesos de industrialización involucra la elección de materiales crudos, que comprenden el sustrato fermentativo y los reactivos químicos utilizados durante todo el proceso, la selección de los organismos oleaginosos, la fermentación con el diseño de la maquinaria y su construcción, el procesado, empaquetamiento y venta del producto (Huang et al., 2013). Sin embargo, el costo de las materias primas puede representar hasta el 88% de los totales (Haas et

al., 2006), y dentro de esta categoría el sustrato fermentativo constituye un 60% del valor total (Fei et al., 2011) y condiciona la factibilidad económica del proceso de producción de lípidos microbianos (Ykema et al., 1988; Huang et al., 2013).

### **1.8 HIPOTESIS Y OBJETIVO GENERAL**

Por todo lo expuesto, se hipotetiza que los ambientes fríos y oligotróficos de la Patagonia andina, albergan una amplia e interesante diversidad de microorganismos fúngicos autóctonos, que presentan adaptaciones fisiológicas a las condiciones extremas reinantes, entre las cuales se destaca la acumulación de elevadas concentraciones de ácidos grasos con potencial biotecnológico. Además, se espera una distribución diferencial de los diferentes taxones de hongos con respecto al sustrato que habitan.

Con esto se plantea el siguiente objetivo general: contribuir al conocimiento sobre la biodiversidad de las comunidades fúngicas de los ambientes naturales andino-patagónicos, con especial énfasis en las levaduras poliextremófilas, expuestas a bajas temperaturas y condiciones oligotróficas, y evaluar su potencialidad biotecnológica como fuente de ácidos grasos de interés industrial.

### **1.9 OBJETIVOS PARTICULARES**

- 1.-** Estudiar la diversidad de levaduras cultivables en ambientes fríos, incluyendo diferentes sustratos: hielo glaciar, nieve y suelo libre de vegetación de la Patagonia Andina Argentina.
- 2.-** Estudiar la diversidad fúngica mediante métodos metagenómicos de estos ambientes. Comparar con los resultados obtenidos en los análisis de comunidades cultivables.
- 3.-** Contrastar la información obtenida con los datos existentes de otros lugares del mundo con condiciones equivalentes y de otros sustratos naturales de la región Andino-patagónica (Hielo glaciar, agua de deshielo del Monte Tronador, del Glaciar Perito Moreno, suelo asociado a vegetación).
- 4.-** Obtener levaduras potencialmente oleaginosas, empleando medios de cultivos que favorezcan el desarrollo de cepas con mayor acumulación de ácidos grasos.
- 5.-** Detectar cepas de interés biotecnológico por su producción cuantitativa y cualitativa de ácidos grasos, en particular de PUFAs.

### **1.10 ORGANIZACIÓN DE LA TESIS**

Para la presentación de los resultados obtenidos en este trabajo, se decidió organizar esta tesis en 5 capítulos, siendo el presente (Capítulo I) la introducción general para darle un marco teórico a todo lo trabajado. En el capítulo II se enfoca en el estudio de levaduras cultivables de todos los sustratos, recuentos, aislamiento e identificación de levaduras, el capítulo III complementa el capítulo II ya que describe el estudio metagenómico de hongos presentes en los sustratos estudiados.

Para tener una visión global del ambiente y poder explicar qué pasa con las comunidades de hongos presentes en los diferentes sustratos/sitios estudiados en el Monte Tronador, realizamos además análisis y/o registros de la concentración de nutrientes (N, C, P), temperatura y pH de todos los sustratos y de la humedad presente en el suelo. Todos estos resultados serán abordados en profundidad en el capítulo IV, en donde se discutirá los resultados asociados a diversidad de hongos cultivables (levaduras) (Capítulo II), no cultivables (levaduras y hongos filamentosos, Capítulo III), y los parámetros fisicoquímicos que moldean las comunidades fúngicas para un ambiente extremo como son los glaciares de montaña en la Patagonia andina. Finalmente, en el Capítulo V se aborda la producción de lípidos de levaduras aisladas en este trabajo, en diferentes condiciones de cultivo y con utilización de sustratos obtenidos de efluentes de la industria cervecera.

## **CAPÍTULO II**

# **BIODIVERSIDAD DE LEVADURAS CULTIVABLES ASOCIADAS AL SISTEMA GLACIAR DEL MONTE TRONADOR**

## 2.1 INTRODUCCIÓN

Las levaduras extremotolerantes adaptadas al frío pueden ser aisladas de numerosos ambientes fríos; como permafrost, desiertos fríos, hielo de glaciares, agua de deshielo, sedimentos, el fondo oceánico, entre otros (Buzzini & Margesin., 2014). Además de las condiciones de bajas temperaturas, las levaduras son capaces de crecer expuestas a baja disponibilidad de agua, condiciones oligotróficas e incluso mostrar osmo/halotolerancia. Todas estas condiciones deben ser tenidas en cuenta al abordar el estudio de biodiversidad desde una perspectiva de aislamiento y cultivo de las levaduras. Estos métodos nos permiten, además, contar a futuro con cepas tanto para el estudio del ciclo de vida de estos microorganismos, como para la producción de metabolitos de interés o para procesos biotecnológicos (Boundy-Mills, 2014).

Los tipos de métodos de cultivos más utilizados para el aislamiento y la enumeración de microbios son: dilución y filtración por membrana, seguido por recuento y posterior aislamiento de las colonias seleccionada en una nueva placa con el medio de cultivo elegido (Kurtzman et al., 2011). Seleccionar las condiciones de cultivo es muy importante, teniendo en cuenta siempre el ambiente y tipo de microorganismos a cultivar, ya que la concentración de nutrientes y actividad de agua puede afectar la recuperación de microorganismos viables. Por ejemplo, los microorganismos que se encuentran adaptados a ambientes oligotróficos pueden no crecer en medios tradicionales, pudiendo ser aislados con mayor facilidad en medios diluidos (Hattori, 1980, Bartelme et al., 2020).

Vishnivetskaya et al. (2000) observó que el aislamiento de bacterias de muestras de permafrost fue más exitoso usando el medio generalista TSA (agar de Soja Trypticase) diluido 1/10. En el caso de las levaduras de ambientes fríos oligotróficos, los medios utilizados son MYP, YPD, PDA, entre otros (Boundy-Mills, 2014), siendo YPD y MYP los más utilizados. El medio YPD es más rico en nutrientes y es más utilizado para el estudio de levaduras asociadas a ambientes terrestres (Kurtzman et al., 2011, Connell et al., 2008). Mientras que el medio MYP está más asociado a trabajos donde el sustrato es oligotrófico (Libkind et al, 2003, 2008; de Garcia et al., 2012; Brandão et al, 2011). Microorganismos provenientes de agua, hielo y suelos oligotróficos, como los de interés en esta tesis, serán favorecidos en su desarrollo con el uso de medios bajos en nutrientes (Butinar et al., 2011, de Garcia et al., 2012).

Los estudios de levaduras psicrófilas se han ido llevando a cabo desde 1961, con una mayor prevalencia en los últimos 10 años (PubMed, 2022). Teniendo en cuenta las bajas temperaturas y la distribución generalizada de hielo y permafrost, los polos (Antártida y el Ártico) fueron los primeros lugares de interés para el estudio de levaduras psicrófilas y psicrotolerantes

(Buzzini & Margesin, 2014). Por otro lado, los estudios en ambientes fríos no polares (Patagonia, Alpes, Meseta Tibetana, etc) (Hassan et al., 2016), se concentran mayoritariamente en hábitats asociados con los sistemas glaciares, con énfasis en los sedimentos recolectados en la superficie o debajo de las masas de hielo (supraglacial y subglacial, respectivamente), núcleos de hielo, agujeros de crioconita, agua de deshielo, nieve y suelo circundante (incluido el permafrost) (Sannino et al., 2017).

Pese a la amplia distribución geográfica de los diferentes estudios de levaduras tolerantes al frío, los taxones más relevantes para estos ambientes, casi siempre, corresponden a los mismos órdenes y especies de los phylum Basidiomycetes y Ascomycetes. Los representantes del phylum Basidiomycota muestran una prevalencia en los ambientes extremos fríos, donde los órdenes y géneros Leucosporidiales (género: *Leucosporidium*), Kriegeriales (géneros: *Glaciozyma* y *Phenolipheria*) Sporidiobolales (género: *Rhodotorula*), Cystofilobasidiales (géneros: *Mrakia* y *Tausonia*), Filobasidiales (géneros: *Filobasidium*, *Goffeauzyma*, *Naganishia* y *Solicoccozyma*) y Tremellales (géneros: *Dioszegia*, *Vishniacozyma*) se aíslan de forma mayoritaria (Buzzini et al., 2017, 2018; Yurkov & Pozo, 2017; El Baidouri et al., 2021). Por otro lado, los órdenes más comunes del phylum Ascomycota, corresponden a Saccharomycetales (géneros: *Candida*, *Debaryomyces* y *Wickerhamomyces*) y Dothideales (género: *Aureobasidium*).

La exploración y la conservación sistemática de hongos, es esencial para la preservación de los recursos genéticos fúngicos de forma sostenida, algo fundamental para la investigación básica y aplicada. Así mismo, el desarrollo de estrategias para superar la destrucción en curso de los hábitats naturales, es esencial a fin de compensar la pérdida de una reserva genética diversa y poco estudiada. En este capítulo utilizaremos técnicas dependientes de medios de cultivo para aislar y estudiar la diversidad de las levaduras cultivables de diferentes sustratos (suelo, hielo, nieve y agua) del sistema glaciario asociado a dos glaciares del Monte Tronador de la Patagonia Andina Argentina.

## 2.2 MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.2.1 RECOLECCIÓN DE MUESTRAS

En el glaciar Castaño Overa (41° 09'S, 71° 53'O) se colectaron muestras de suelo, nieve y hielo en enero de 2015. En el glaciar Ventisquero Negro (41°12'17"S, 71°50'00"O) y el río de deshielo del glaciar Castaño Overa (41° 11' 11.651" S, 71° 48' 33.118" O), las muestras de suelo, hielo y agua fueron colectadas en el período de marzo y abril del 2016. Cada punto de muestreo fue rotulado de acuerdo a las iniciales del lugar donde se tomaron las muestras

(Castaño Overa, CO; Ventisquero Negro, VN y río Castaño Overa, RCO), sustrato (S: Suelo, H: Hielo, A: Agua) y el número de muestra de recolección. Todas las muestras fueron colectadas con permiso de Parques Nacionales N° 1305. La posición de cada punto fue registrada *in situ* por GPS, los datos se detallan en la Tabla 2.1 y Figura 2.1 a 2.2.

**Tabla 2.1: Detalles de los puntos de muestreo en cada área estudiada: glaciar Castaño Overa, río Castaño Overa y glaciar Ventisquero Negro**

CO: Castaño Overa, RCO: río Castaño Overa, S: Suelo. Lat.: Latitud; Long: Longitud, Alt.: Altura, m snm: metros sobre el nivel del mar.

| Zona                  | Etiqueta                  | Sustrato                    | Ubicación                                   | Lat. / Long.                | Alt. (m snm)                |      |
|-----------------------|---------------------------|-----------------------------|---|-----------------------------|-----------------------------|------|
| Glaciar Castaño Overa | COS1                      | Suelo desnudo               | Ladera a 187mts refugio Otto Meiling        | 41°10'28.1"S - 71°49'04.0"W | 1833                        |      |
|                       | COS2                      |                             |   | 41°10'28.1"S - 71°49'03.8"W | 1832                        |      |
|                       | COS3                      |                             | 41°10'28.0"S - 71°49'03.9"W                 | 1828                        |                             |      |
|                       | COS4                      |                             | Ladera a 1,317 mts del refugio Otto Meiling | 41°10'51.9"S - 71°49'38.5"W | 1912                        |      |
|                       | COS5                      |                             |   | 41°10'52.1"S - 71°49'38.9"W | 1912                        |      |
|                       | COS6                      |                             | 41°10'52.4"S - 71°49'38.4"W                 | 1920                        |                             |      |
|                       | COH1                      | Hielo                       | Grieta 1                                    | 41°10'39.9"S - 71°49'18.9"W | 1879                        |      |
|                       | COH2                      |                             | Grieta 2                                    | 41°10'40.1"S - 71°49'18.4"W | 1874                        |      |
|                       | COH3                      |                             | Grieta 3                                    | 41°10'39.7"S - 71°49'18.3"W | 1870                        |      |
|                       | CON1                      | Nieve                       | Sobre Grieta 1                              | ≈ 500 mts del refugio       | 41°10'39.9"S - 71°49'18.9"W | 1879 |
|                       | CON2                      |                             | Sobre Grieta 2                              |                             | 41°10'40.1"S - 71°49'18.4"W | 1874 |
|                       | CON3                      |                             | Sobre Grieta 3                              |                             | 41°10'39.7"S - 71°49'18.3"W | 1870 |
|                       | CON4                      |                             | Cercana Grieta 3                            |                             | 41°10'39.7"S - 71°49'18.3"W | 1870 |
|                       | Glaciar Ventisquero Negro | VNS1                        | Suelo desnudo                               | ≈ 150 mts del glaciar       | 41°12'07.2"S - 71°50'11.1"W | 956  |
| VNS2                  |                           | 41°12'07.3"S - 71°50'11.7"W |   |                             | 952                         |      |
| VNS3                  |                           | 41°12'06.9"S - 71°50'10.6"W |   | 967                         |                             |      |
| VNS4                  |                           | ≈ 200 mts del glaciar       |   | 41°12'07.9"S - 71°50'08.4"W | 939                         |      |
| VNS5                  |                           |                             |   | 41°12'07.3"S - 71°50'07.2"W | 942                         |      |
| VNS6                  |                           | 41°12'07.6"S - 71°50'06.3"W |   | 946                         |                             |      |
| VNH1                  |                           | Hielo                       | Hielo flotando en el lago Ventisquero Negro | 41°12'8.03"S - 71°50'4.9"W  | 933                         |      |
| VNH2                  |                           |                             |   | 41°12'8.03"S - 71°50'4.9"W  | 934                         |      |
| VNH3                  |                           |                             |   | 41°12'5.2"S - 71°49'59.4"W  | 934                         |      |
| VNH4                  |                           |                             |   | 41°12'5.2"S - 71°49'59.4"W  | 934                         |      |
| VNH5                  |                           |                             |   | 41°12'03.8"S - 71°49'53.9"W | 928                         |      |
| VNH6                  |                           |                             |   | 41°12'03.4"S - 71°49'55.2"W | 927                         |      |
| VNA1                  |                           | Agua                        | ≈ 200 mts del glaciar                       | 41°12'7.9"S - 71°50'7.61"W  | 944                         |      |
| VNA2                  | Mismo lugar que VNH2      |                             | 41°12'8.03"S - 71°50'4.9"W                  | 933                         |                             |      |
| VNA3                  | Mismo lugar que VNH3      |                             | 41°12'5.2"S - 71°49'59.4"W                  | 928                         |                             |      |
| Río Castaño Overa     | RCOS1                     | Suelo                       | Naciente del Río                            | 41°11'15.2"S - 71°48'44.2"W | 1095                        |      |
|                       | RCOS2                     |                             |   | 41°11'16.4"S - 71°48'44.0"W | 1091                        |      |

|       |                        |                             |                             |      |
|-------|------------------------|-----------------------------|-----------------------------|------|
| RCOS3 |                        | 41°11'17.7"S - 71°48'42.2"W | 1073                        |      |
| RCOS4 |                        | 41°12'29.4"S - 71°46'42.4"W | 871                         |      |
| RCOS5 | Río inicio del Sendero | 41°12'29.4"S - 71°46'41.2"W | 867                         |      |
| RCOS6 |                        | 41°12'30.2"S - 71°46'41.0"W | 859                         |      |
| RCOA1 | Agua                   | Naciente del Río            | 41°11'15.4"S - 71°48'44.0"W | 1069 |
| RCOA2 |                        | Río inicio del sendero      | 41°12'25.2"S - 71°46'42.9"W | 905  |
| RCOA3 |                        | 41°12'30.2"S - 71°46'40.9"W | 864                         |      |

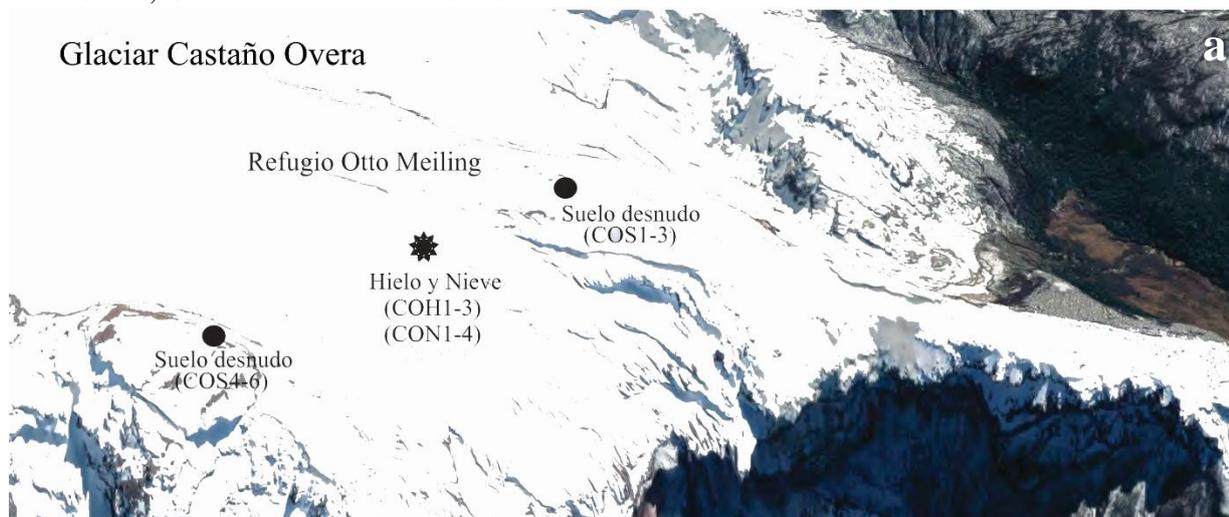
**Figura 2.1: Foto satelital del sistema glaciar del Monte Tronador y la disposición de las tres áreas de muestreo**



Imágenes © 2021 CNES / Airbus, Maxar Technologies, Datos del mapa © 2021 500 m

**Figura 2.2: Detalle de los distintos sitios de muestreo y de la localización de toma de las muestras y sustratos en el Monte Tronador**

a): Sitios de muestreos del glaciar Castaño Overa; b) Sitio de muestreo del río Castaño Overa, c) Sitio de muestro del glaciar Ventisquero Negro; Gota: Muestras de agua; Círculo: Muestras de suelo; Círculo dentado: Muestras de hielo/nieve.



### 2.2.2 DISEÑO EXPERIMENTAL

La recolección de muestras fue realizada de acuerdo al sustrato estudiado, cada diseño experimental se detalla a continuación:

#### *SUELO*

En la zona supraglaciaria se seleccionaron 2 sectores libres de vegetación (suelo desnudo) circundantes a los glaciares Castaño Overa, Ventisquero Negro, y al río Castaño Overa. En cada sector seleccionado se marcaron 3 parcelas de 1x1 mts separadas entre sí por 5 m o más y dentro de cada parcela se colectaron 5 submuestras de suelo (Connell et al., 2006) (Figura 2.1). Las submuestras se tamizaron con tamiz de 2mm de poro en el lugar. De cada submuestra se colectaron aproximadamente 20 g en bolsas plásticas estériles, las cuales se transportaron y conservaron en refrigeración hasta su procesamiento en el laboratorio, el cual fue realizado en las 24 horas siguientes al muestreo.

#### *HIELO Y NIEVE*

Sobre el glaciar Castaño Overa se identificaron 3 grietas, pertenecientes a la zona englacial, que permitieron la recolección de muestras de forma segura. En cada grieta se colectaron, con piquetas limpias y sanitizadas con etanol al 70%, 3 muestras de hielo a 30 cm de profundidad, y cada muestra de hielo contenía aproximadamente 700 mL. Sobre cada una de las grietas se tomaron 3 muestras de nieve y se incluyeron 4 muestras de nieve adicionales de un sector cercano a las grietas muestreadas, en una sección de fácil acceso. Todas las muestras de nieve se colectaron con cucharas limpias y sanitizadas con etanol al 70%, cada muestra contenía aproximadamente 500 mL.

En la superficie del lago Ventisquero Negro (lago proglacial) generado en la zona de ablación del glaciar Ventisquero Negro, se tomaron 6 porciones de hielo flotante, provenientes de este glaciar. Las muestras fueron colectadas con guantes de látex sanitizados con alcohol 70%.

Todas las muestras de hielo y nieve fueron colocadas en bolsas plásticas estériles y mantenidas en refrigeración hasta su procesamiento en el laboratorio, realizado en las 24 horas siguientes al muestreo.

#### *AGUA*

En la zona proglacial se colectaron muestras de agua en la superficie del lago generado en la zona de ablación del glaciar Ventisquero Negro y en el río Castaño Overa, de cada cuerpo de agua se tomaron 3 muestras con 3 submuestras cada una. En el lago proglacial del glaciar Ventisquero Negro, las muestras se colectaron a 200 mts aproximadamente una de la otra,

tomando como punto de referencia la cercanía al glaciar. En el río Castaño Overa la primera muestra se tomó en el nacimiento del río (1069 m snm) y las 2 muestras restantes a 4 km de la primera, la colección se realizó de acuerdo a la accesibilidad del lugar. Todas las muestras fueron colectadas en botellas de vidrio estériles (aproximadamente 300 mL) y transportadas en refrigeración hasta su procesamiento en el laboratorio, realizado en las 24 horas siguientes al muestreo.

### 2.2.3 PROCESAMIENTO DE MUESTRAS

El procesamiento de las muestras fue realizado de acuerdo al sustrato estudiado y tal como se detalla a continuación:

#### *SUELO*

Se colocó un inóculo inicial de 1 gr de suelo de cada submuestra, en 10 mL de solución fisiológica (0,9% de NaCl), esta solución se agitó a 150 rpm a 4°C durante 1h (Connell et al., 2006; con modificaciones), y luego se realizaron diluciones seriadas, en concentraciones que iban de  $10^{-1}$  hasta  $10^{-3}$ . De cada dilución se sembraron 100 ul, esparcidos con espátula de Drigalsky, en la superficie de placas de Petri con medio sólido MYP 10% con antibióticos (en g L<sup>-1</sup>: extracto de malta 0,7; extracto de levadura 0,05; peptona de soja 0,25; agar 15; cloranfenicol 0,2; ampicilina 0,1; pH 4,5) e YPD con antibióticos (en g L<sup>-1</sup>: extracto de levadura 10, peptona 20, glucosa 20, 0,2 cloranfenicol y 0,1 de ampicilina; agar 15; pH 4,5). Para las muestras de suelo estos medios fueron suplementados con colorante Rosa de Bengala (25 mg L<sup>-1</sup>) para inhibir el crecimiento de hongos filamentosos. Para favorecer el crecimiento de levaduras adaptadas a bajas temperaturas, las placas fueron incubadas a 4°C entre 1 y 2 meses, hasta la aparición de colonias.

#### *HIELO, NIEVE Y AGUA*

Las muestras de hielo y nieve se fundieron a 4°C, el agua obtenida se procesó de la misma manera que las muestras de agua. Se tomaron alícuotas de cada muestra de 50 a 100 mL, las que se filtraron a través de filtros Millipore® (diámetro 47 mm - 0,45 µm de poro) utilizando equipos de filtración Nalgene® estériles (de Garcia et al., 2012). Los filtros fueron colocados sobre placas de Petri con medio MYP 10% con antibióticos y medio YPD con antibióticos, descritos anteriormente. Para favorecer el crecimiento de levaduras adaptadas a bajas temperaturas las muestras fueron incubadas a 4°C hasta la aparición de colonias (1 o 2 meses).

#### 2.2.4 AISLAMIENTO Y PRESERVACIÓN DE LEVADURAS

Las placas obtenidas para todas las muestras, fueron observadas periódicamente bajo microscopio estereoscópico OLYMPUS SZX-90 en busca de colonias de levaduras. Se calculó para cada sitio el promedio de recuentos viables en unidades formadoras de colonias por litro (UFC L<sup>-1</sup>) y su desviación estándar. De cada placa, se contaron y catalogaron las colonias según su morfología (tamaño, color, textura), en base a esta información se seleccionaron un número representativo de cada una. Las colonias de levaduras seleccionadas fueron aisladas y purificadas en medio MYP (en g L<sup>-1</sup>: extracto de malta 7; extracto de levadura 0,5; peptona de soja 2,5; agar 15; pH 4.5) y medio YM (en g L<sup>-1</sup>: extracto de malta 3; extracto de levadura 3; peptona de soja 5; glucosa 10; agar 15; pH 4,5).

Todas las levaduras aisladas en este trabajo fueron crio-conservadas a -80 °C en solución de glicerol al 20 % y perlas de vidrio de 5mm de diámetro, e incorporadas a la colección de levaduras del Centro de Referencia en Levaduras y Tecnología Cervecera (CRELTEC, IPATEC).

#### 2.2.5 IDENTIFICACIÓN MOLECULAR

Las levaduras aisladas, purificadas y crioconservadas, se agruparon según sus características morfológicas en medio YM (color, forma y textura), de cada grupo formado se seleccionaron aislados representativos, a las que se les realizó las extracciones de ADN para posterior identificación utilizando las regiones del ARNr (ITS) según Kurtzman & Boekhout (2011).

#### 2.2.6 EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE ADN GENÓMICO PARA PCR

Se transfirió una ansada de biomasa de un cultivo fresco (máx. 72 hs), en medio YM a un tubo eppendorf de 1.5 ml, conteniendo 500 µl de EDTA 5mM, luego se llevó a vórtex por 1 min y se centrifugó a 8000 rpm durante 5 min. Se descartó el sobrenadante y se congeló el pellet a -80°C por 30 min y se descongeló rápidamente en baño seco a 65°C. Luego se agregó una punta de espátula de beads de vidrio (425- 600 µm de Ø), 500 µl de buffer de lisis y 250 µl de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1 v/v) y se rompieron las células durante 20 min en vortex. Se separaron las fases por centrifugación de 10 min a 13000 rpm, se recuperó la fase superior y se transfirió a un tubo nuevo. Para purificar el ADN extraído, se agregaron 2 vol de etanol absoluto frío, se mezcló por inversión y se colocó 20 min a -20°C. Luego se centrifugó 5 min a 13000 rpm, y se descartó el sobrenadante por inversión. El pellet se lavó sin remover con 300 µl de etanol 70 % frío, se centrifugó nuevamente 5 min a 13000 rpm, se descartó el sobrenadante por inversión con cuidado y se dejó secar en estufa a 37°C. El producto final fue resuspendido en 50 µl de agua mili-Q y se conservó a -20 °C hasta su utilización.

### 2.2.7 AMPLIFICACIÓN DE ADN GENÓMICO (PCR)

Una de las regiones que permite la identificación taxonómica a las levaduras (ITS), siendo de las utilizadas para levaduras basidiomicéticas, fue amplificada mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La misma se realizó a partir de 1  $\mu$ l de ADN genómico, utilizando los cebadores ITS1 (5-TCC GTA GGT GCT GCG G-3) e ITS4 (5-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3). Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un volumen de 35  $\mu$ L, utilizando los siguientes reactivos: Buffer Taq polimerasa 3,5  $\mu$ l por muestra (1x concentración final); MgCl<sub>2</sub> 1,75  $\mu$ l por muestra (2,5 mM concentración final); dNTPs 1,75  $\mu$ l por muestra (250  $\mu$ M concentración final); Primer ITS1 0,7  $\mu$ l por muestra (0,2  $\mu$ M concentración final); Primer ITS4 0,7  $\mu$ l por muestra (0,2  $\mu$ M concentración final); Taq Pegasus 0,14  $\mu$ l por muestra (1 U/50  $\mu$ l concentración final).

Los ciclos de la PCR se detallan a continuación:

|              |             |
|--------------|-------------|
| 3 min 94 °C  | } 35 ciclos |
| 30 seg 94 °C |             |
| 30 seg 55 °C |             |
| 45 seg 72 °C |             |
| 10 min 72 °C |             |

### 2.2.8 ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA

Los productos de PCR (5  $\mu$ l de cada reacción) se evaluaron en geles de agarosa al 1% preparados en TAE 1X, con adición del colorante GelGreen desde un stock 40000x. Los pocillos se sembraron con una mezcla 2:1 del ADN y el buffer de siembra 3x (0,12% (p/v) azul de bromofenol; 0,12% (p/v) xylene cyanol; 15% (v/v) glicerol en agua y colorante fluorescente GelRed 3x). La corrida electroforética se realizó a 100 V en buffer TAE 1X. Se sembraron los marcadores de peso molecular, 100 pb ladder y 1 kb ladder, para comparar con los productos de amplificación. Los fragmentos amplificados de ADN fueron visualizados en transiluminador con luz azul (470 nm) Maestrogen LB-16.

### 2.2.9 ANÁLISIS DE SECUENCIAS DE LA REGIÓN ITS

Para la secuenciación de la región ITS fueron utilizados los cebadores ITS1 (5-TCC GTA GGT GCT GCG G-3) e ITS4 (5-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3). Los productos de amplificación fueron secuenciados en MACROGEN INC. Seúl, Korea. Las secuencias nucleotídicas obtenidas fueron revisadas y curadas manualmente utilizando el programa MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) versión 7.0 (Kumar, et al., 2016), y luego

se compararon usando la herramienta computacional BLAST, con las secuencias equivalentes disponibles en bases de datos públicas (GenBank) accesibles en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast.cgi>

Las relaciones filogenéticas de los aislamientos de interés, fueron determinadas utilizando el programa MEGA versión 7.0, utilizando la información de las secuencias ITS. El árbol filogenético fue construido utilizando el algoritmo *neighbor joining* (NJ) el soporte estadístico se obtuvo realizando análisis de distancias luego de 1000 repeticiones (*bootstrap*). El modelo Kimura de dos parámetros fue utilizado para estimar las distancias evolutivas entre las especies estudiadas (Kimura *et al.*, 2004).

#### 2.2.10 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Los valores de recuentos en placa obtenidos para todos los puntos de muestreo fueron informados como el valor medio de 3 réplicas obtenidas, y la desviación estándar fue determinada en cada una de ellas. El análisis comparativo de los datos obtenidos para cada sitio de muestreo, se realizó por medio de un test t de probabilidad (*Test t de Student*) y en caso de no cumplir la normalidad de los datos se utilizó el test de Mann–Whitney–Wilcoxon. Para los análisis de diversidad de las muestras se utilizó el índice de Shannon-Wiener que fue comparado para cada sitio/sustrato por medio del test de t de Hutcheson, y el índice de Jaccard para comparar la distancia entre las comunidades. Los índices fueron calculados con el programa R de libre acceso.

### 2.3 RESULTADOS

En los 3 sitios de muestreo analizados se colectaron un total de 136 muestras/submuestras, obteniéndose 90 submuestras de suelo, 13 muestras de nieve, 15 muestras de hielo y 18 de agua.

Los recuentos de levaduras para las muestras de suelo variaron de  $4,4 \times 10$  a  $1 \times 10^3$  UFC por gramo de suelo, para las muestras de nieve los valores variaron de  $8,73 \times 10^2$  a  $3,1 \times 10^3$  UFC L<sup>-1</sup>, para el hielo fueron de  $1,7 \times 10$  a  $3,4 \times 10^3$  UFC L<sup>-1</sup> y para las muestras de agua variaron de  $6,6 \times 10$  a  $5,9 \times 10^3$  UFC L<sup>-1</sup>, los resultados detallados para cada muestra se detallan en el Anexo con las tablas 2.2 y 2.3.

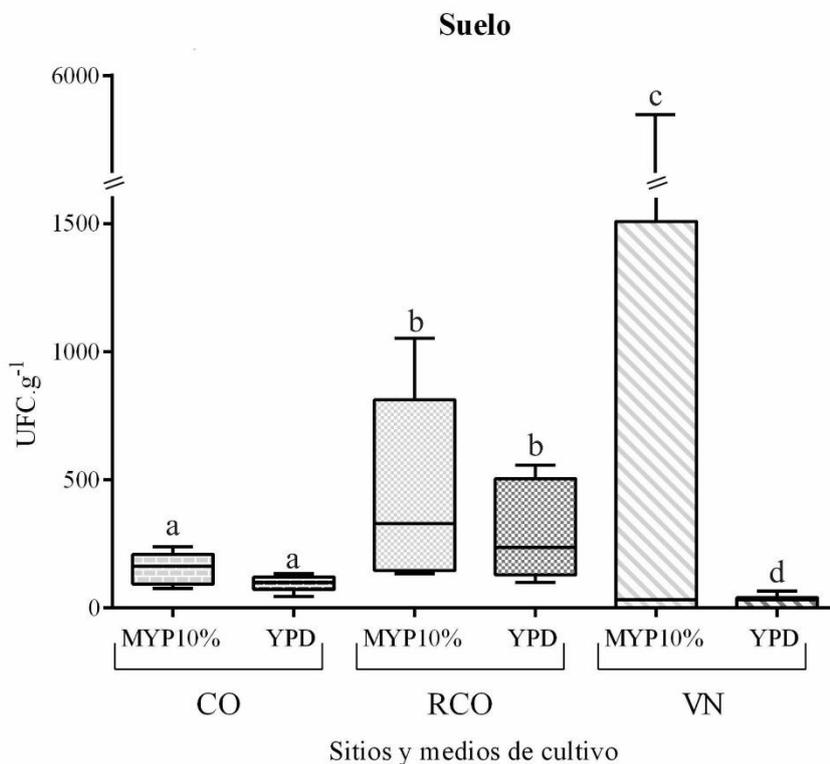
#### 2.3.1 RECUENTO Y AISLAMIENTO DE LEVADURAS

Todas las muestras fueron sembradas en 2 medios de cultivo con concentraciones nutricionales diferentes. Al comparar los resultados de recuento (UFC) obtenidos dentro de cada tipo de

sustrato y sitio no se encontraron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) en las condiciones de cultivo (Anexo 1, Tabla suplementaria 2.1 y 2.2). No se observaron diferencias significativas al comparar los recuentos abundancia (UFC  $g^{-1}$ ) obtenidos en el suelo asociado al glaciar Castaño Overa (CO) y el suelo del río Castaño Overa (RCO) ( $p > 0,05$ ), pero sí se observaron diferencias entre las muestras provenientes de los sitios CO y RCO y las muestras de suelo provenientes del glaciar Ventisquero Negro, poseyendo estas últimas los menores y mayores recuentos, presentando mucha variabilidad en el número de UFC de cada réplica (Figura 2.3). Para las muestras de hielo y nieve de los glaciares Castaño Overa y Ventisquero Negro, se encontraron diferencias significativas entre los distintos sitios de muestreo ( $p < 0,01$ ), con el glaciar Castaño Overa presentando mayor abundancia de UFC  $L^{-1}$  (Figura 2.4). Además, se observaron diferencias significativas para las muestras de agua del glaciar Ventisquero Negro (VN) y el Río Castaño Overa (RCO), con mayor abundancia de recuentos en el río Castaño Overa ( $p < 0,01$ ) (Figura 2.5). Al comparar las placas, se observó diferencias cualitativas en el crecimiento de hongos filamentosos, donde estos presentaron un crecimiento mayor (en número y volumen de la colonia) en el medio YPD llegando a ocupar toda la placa en algunos casos, mientras que en MYP 10% el crecimiento de estos hongos se vio restringido en número y tamaño (Figura 2.6).

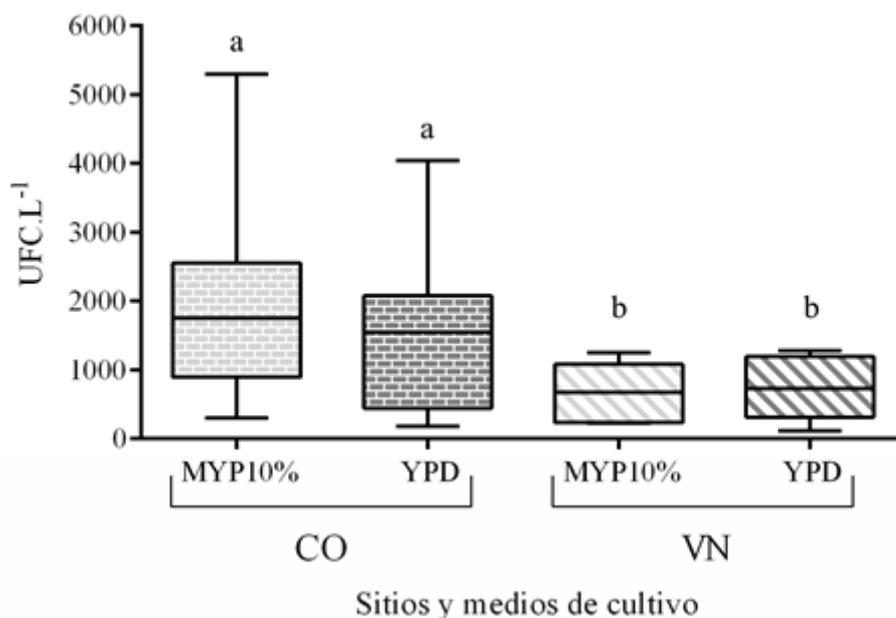
**Figura 2.3: Cantidad UFC de levaduras en el suelo de los sitios de muestreo glaciar Castaño Overa, río Castaño Overa y glaciar Ventisquero Negro**

UFC.g<sup>-1</sup>, Unidades formadoras de colonias por gramo, recuentos obtenidos a 4°C luego de 30 días de incubación. Media: valor medio del recuento de 30 submuestras por sitio. CO: Castaño Overa, RCO: Río Castaño Overa, VN: glaciar Ventisquero Negro. MYP 10%: Cultivo en MYP10%, YPD: Cultivo en YPD. Las letras marcan las diferencias significativas p<0,05



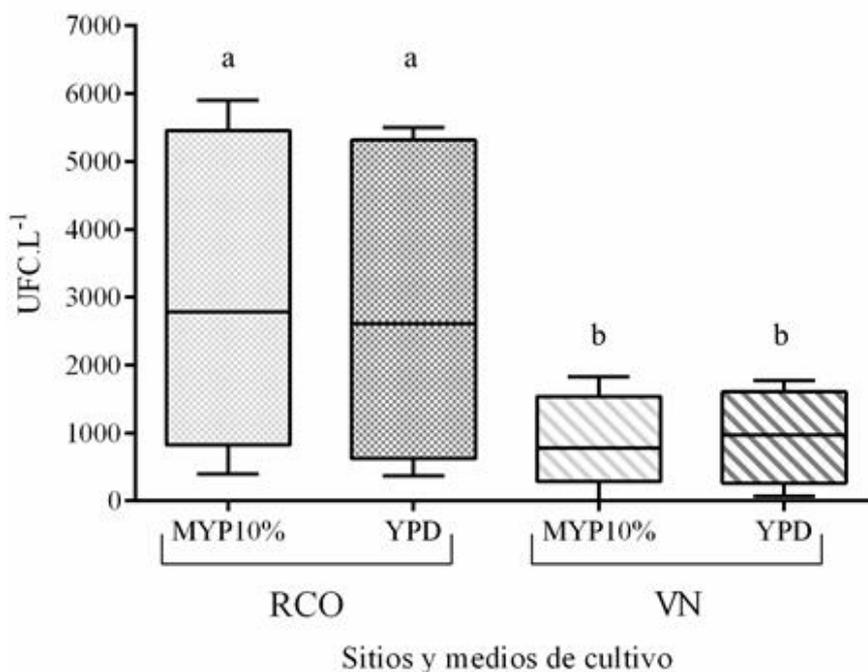
**Figura 2.4: Cantidad UFC de levaduras en el hielo y la nieve de los sitios de muestreo, glaciar Castaño Overa y glaciar Ventisquero Negro**

UFC.L<sup>-1</sup>, Unidades formadoras de colonias por litro, recuentos obtenidos a 4°C luego de 30 días de incubación. CO: Castaño Overa, VN: glaciar Ventisquero Negro. MYP 10%: Cultivo en MYP 10%, YPD: Cultivo en YPD. Las letras marcan las diferencias significativas p<0,05.



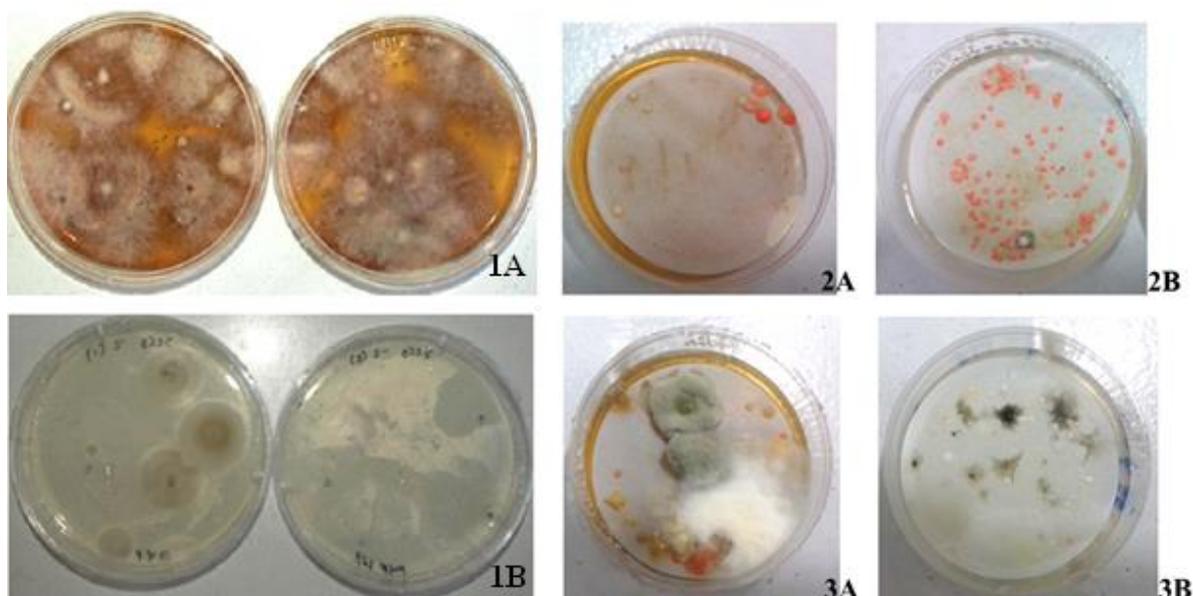
**Figura 2.5: Cantidad UFC de levaduras en el agua de los sitios de muestreo, río Castaño Overa y glaciar Ventisquero Negro**

UFC.L<sup>-1</sup>, Unidades formadoras de colonias por litro, recuentos obtenidos luego de 30 días de incubación a 4°C. Media: valor medio del recuento de 9 submuestras por sitio. RCO: Río Castaño Overa, VN: glaciar Ventisquero Negro. MYP 10%: Cultivo en MYP 10%, YPD: Cultivo en YPD. Las letras marcan las diferencias significativas p<0,05.



**Figura 2.6: Placas de aislamientos con los dos medios de cultivo utilizados y el mismo tiempo de cultivo (30 días) a 4°C**

A: cultivo YPD; B: Cultivo MYP 10%; 1: Suelo; 2 Hielo/nieve; 3: Agua.



Se obtuvieron un total de 441 aislamientos de levaduras, provenientes de suelo, hielo, nieve y/o agua asociados a los glaciares Castaño Overa, Ventisquero Negro y del río Castaño Overa (Tabla 2.2). Los aislamientos obtenidos fueron agrupados según la morfología de la colonia (color, borde, presencia de micelio y/o pseudomicelio, etc.). Las levaduras de color crema/beige fueron las más abundantes para todos los sustratos estudiados, seguidas por las colonias pigmentadas naranjas, rosas y rojas. El porcentaje de levaduras pigmentadas, tanto carotenogénicas, como las de color negras y verde oscuro, fue mayor para las muestras de nieve/ hielo (de 25 a 34%) en comparación con el resto de los sustratos (de 9 a 27,5%).

Utilizando las características morfológicas se procedió a realizar agrupamientos, para cada sitio y sustrato, que permitieron concentrar los esfuerzos de identificación molecular a levaduras representativas de dichos grupos. Los grupos morfológicos que se conformaron para cada sitio/sustrato fueron de 10 a 27, siendo mayoritarios para las muestras de nieve del glaciar Castaño Overa, seguida por el suelo del río Castaño Overa. Se seleccionaron un total de 106 levaduras, que fueron secuenciadas según lo detallado en Materiales y Métodos (Tabla 2.2) (Anexo 1, Tabla suplementaria 2.3).

**Tabla 2.2: Número de levaduras aisladas según la morfología, sustrato y sitio de muestreo**  
Morf.: Morfología de la colonia basada en su color.

| Lugar                             |                  | G. Castaño Overa |             | R. Castaño Overa |      | G. Ventisquero Negro |       |      |
|-----------------------------------|------------------|------------------|-------------|------------------|------|----------------------|-------|------|
|                                   |                  | Suelo            | Nieve/Hielo | Suelo            | Agua | Suelo                | Hielo | Agua |
| <b>Morf.</b>                      | Blancas          | 15               | 16          | 20               | 2    | 8                    | 1     | 6    |
|                                   | Crema/Naturales  | 60               | 77          | 67               | 10   | 21                   | 18    | 17   |
|                                   | Rosas/Naranjas   | 8                | 30          | 11               | 3    | 11                   | 9     | 7    |
|                                   | Marrones/Oscuras | 0                | 17          | 5                | 1    | 0                    | 1     | 0    |
| <b>Total levaduras aisladas</b>   |                  | 83               | 140         | 103              | 16   | 40                   | 29    | 30   |
| <b>Grupos morfológicos</b>        |                  | 20               | 27/11       | 23               | 14   | 10                   | 13    | 14   |
| <b>Aislamientos identificados</b> |                  | 14               | 29/14       | 13               | 12   | 5                    | 7     | 12   |
| <b>n° de especies/taxones</b>     |                  | 8                | 21/10       | 7                | 12   | 4                    | 6     | 5    |

De las 106 levaduras identificadas a nivel molecular, 32 levaduras correspondieron a aislados de suelo, que representaron 15 especies/géneros diferentes, además de tres aislados de levaduras que sólo pudieron ser identificadas hasta nivel de clase. 50 levaduras correspondieron a aislados de hielo y nieve, de los que se obtuvieron 34 especies diferentes. Las 24 levaduras restantes correspondieron a aislados de agua, de los que se obtuvieron 17 especies diferentes. Los taxones obtenidos se distribuyeron entre los phyla Ascomycota y Basidiomycota. Tanto en los aislamientos del suelo, hielo y nieve, como agua de deshielo, las levaduras corresponden en su mayoría al phylum Basidiomycota, obteniéndose alrededor de un 70% del total para las

muestras de suelo y un 81% para los otros sustratos. De las dos clases más abundantes, tanto las identificadas molecularmente como las asociadas por morfología, correspondieron a Tremellomycetes seguido por Saccharomycetes (Tabla 2.3).

**Tabla 2.3: Levaduras aisladas en el marco de este estudio. Se agrupan tanto los aislamientos identificados molecularmente como los asociados a especies o géneros por morfología**

Nº: Número de aislamientos asignados a un determinado grupo taxonómico. \* aislamientos identificados mediante sus características morfológicas.

| Clase                           | Orden               | Grupo taxonómico                     | Sustrato               | Sitio         | Nº |
|---------------------------------|---------------------|--------------------------------------|------------------------|---------------|----|
| Ascomycota                      | Capnodiales         | <i>Cladosporium welwitschiicola</i>  | Nieve                  | CON           | 1  |
|                                 | Coniochaetales      | <i>Coniochaeta polymorpha</i>        | Nieve                  | CON           | 1  |
|                                 | Dothideales         | <i>Aureobasidium pullulans</i>       | Suelo-Hielo-Nieve-Agua | CO-RCO-VN     | 24 |
|                                 |                     | <i>Kabatiella bupleuri</i>           | Hielo-Nieve            | COH-CON       | 4  |
|                                 | Saccharomycetales   | <i>Candida sake</i>                  | Suelo-Hielo-Nieve      | CO-RCO-VN     | 12 |
|                                 |                     | <i>Saccharomyces eubayanus</i>       | Suelo-Hielo-Agua       | COH-RCOS-RCOA | 5  |
|                                 |                     | <i>Wickerhamomyces anomalus</i>      | Suelo                  | COS-RCOS      | 17 |
| Basidiomycota                   | Cystobasidiales     | <i>Cystobasidium laryngis</i>        | Hielo-Nieve-Agua       | CO-RCO-VN     | 5  |
|                                 | Microbotryales      | <i>Curvibasidium rogersii</i>        | Nieve                  | CON           | 3  |
|                                 | Sporidiobolales     | <i>Rhodotorula mucilaginosa</i>      | Suelo-Hielo-Nieve-Agua | CO-RCO-VN     | 22 |
|                                 |                     | <i>Sporobolomyces ruberrimus</i>     | Nieve                  | CON           | 1  |
|                                 | Cystofilobasidiales | <i>Itersonia pannonica</i>           | Agua                   | RCOA          | 1  |
|                                 |                     | <i>Mrakia frígida</i>                | Suelo-Hielo-Nieve      | CO-RCO        | 6  |
|                                 |                     | <i>Mrakia gélida</i>                 | Hielo                  | CON           | 3  |
|                                 |                     | <i>Mrakia hoshinonis</i>             | Hielo                  | CON           | 2  |
|                                 |                     | <i>Tausonia pullulans</i>            | Suelo-Nieve            | CO-RCO        | 9  |
|                                 |                     | <i>Udeniomyces kanasensis</i>        | Hielo-Agua             | CO-VN         | 3  |
|                                 |                     | <i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i> | Suelo                  | RCO-VN        | 12 |
|                                 | Filobasidiales      | <i>Filobasidium magnum</i>           | Suelo-Hielo-Agua       | VN            | 20 |
|                                 |                     | <i>Filobasidium stepposum</i>        | Nieve                  | CON           | 2  |
|                                 |                     | <i>Goffeauzyma gastrica</i>          | Suelo-Nieve-Agua       | CO-RCO        | 6  |
|                                 |                     | <i>Goffeauzyma gilvescens</i>        | Suelo-Hielo-Agua       | CO-RCO        | 5  |
| <i>Naganishia adeliensis</i>    |                     | Suelo-Hielo                          | COH-VNS-VNH            | 15            |    |
| <i>Naganishia albida</i>        |                     | Nieve-Agua                           | CON-RCOA-VNA           | 5             |    |
| <i>Naganishia albidosimilis</i> |                     | Hielo                                | COH                    | 1             |    |
| <i>Naganishia antarctica</i>    | Suelo               | COS                                  | 12                     |               |    |

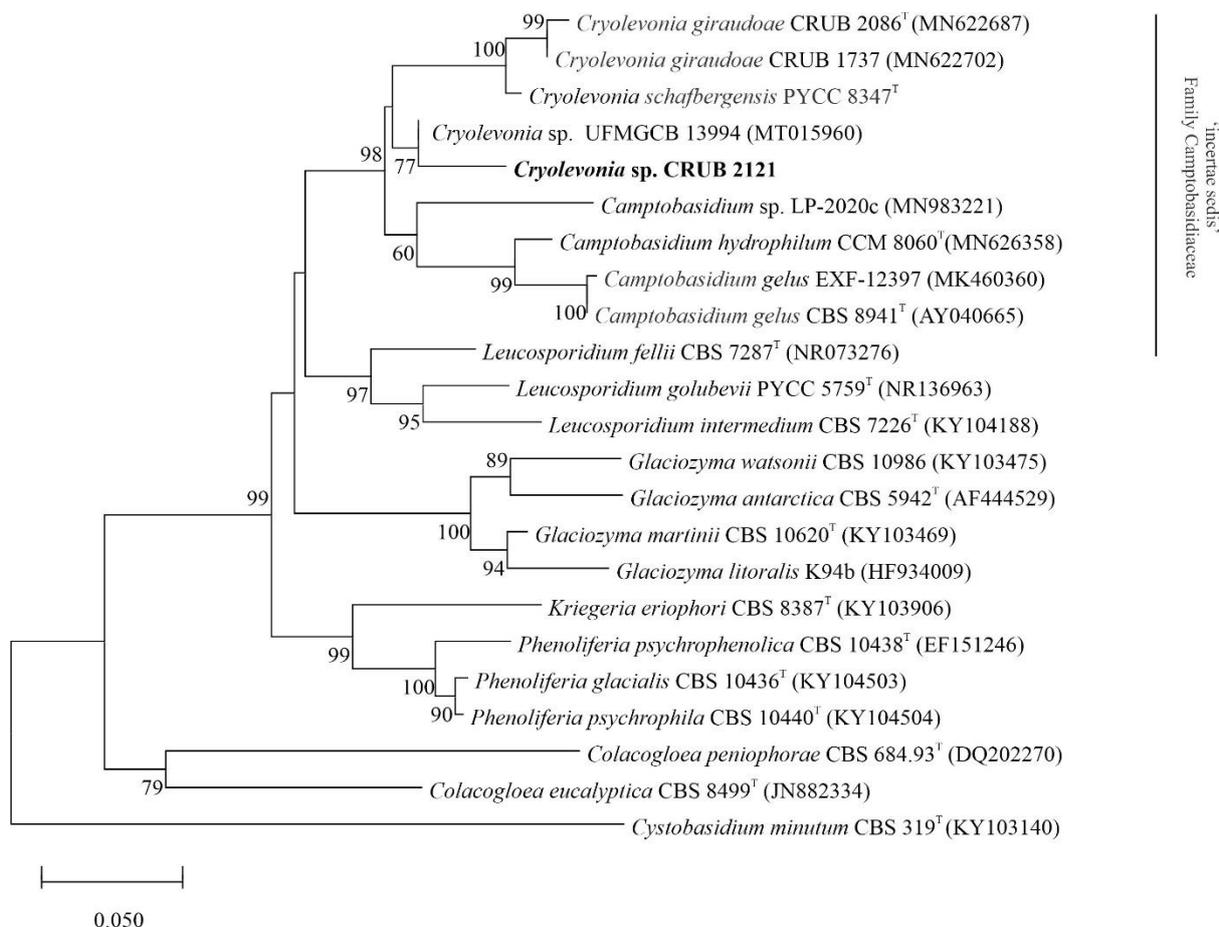
|                  |                                    |                        |                       |    |
|------------------|------------------------------------|------------------------|-----------------------|----|
|                  | <i>Naganishia diffluens</i>        | Suelo                  | RCOS                  | 8  |
|                  | <i>Naganishia friedmannii</i>      | Suelo-Hielo            | COH-RCOS-VNH          | 19 |
|                  | <i>Naganishia liquefaciens</i>     | Hielo-Agua             | COH-RCOA              | 3  |
|                  | <i>Soliccocozyma aeria</i>         | Suelo-Hielo-Agua       | COS-VNS-VNH-VNA       | 36 |
|                  | <i>Soliccocozyma terricola</i>     | Suelo-Hielo-Nieve      | COS-COH-CON-RCOS      | 44 |
| Holtermanniales  | <i>Holtermanniella festucosa</i>   | Suelo                  | RCOS                  | 1  |
|                  | <i>Holtermanniella takashimae</i>  | Suelo                  | RCOS                  | 2  |
|                  | <i>Holtermanniella wattica</i>     | Suelo-Hielo            | RCOS-VNS-VNH          | 7  |
| Tremellales      | <i>Dioszegia statzelliae</i>       | Suelo                  | COS                   | 5  |
|                  | <i>Dioszegia patagonicus</i>       | Hielo-Nieve-Agua       | CON-COH-VNH-VNA       | 14 |
|                  | <i>Fonsecazima tronadorensis</i>   | Suelo-Nieve            | CON-RCOS              | 4  |
|                  | <i>Vishniacozyma tephrensensis</i> | Nieve                  | CON                   | 2  |
|                  | <i>Vishniacozyma victoriae</i>     | Suelo-Hielo-Nieve-Agua | COH-CON-RCOS-RCOA-VNS | 20 |
| Taphrinales      | <i>Protomyces sp.</i>              | Suelo-Hielo            | VNS-VNH               | 2* |
| Trichosporonales | <i>Vanrija albida</i>              | Suelo-Hielo-Agua       | RCOS-RCOA-VNS-VNH-VNA | 30 |

Dentro de los aislamientos identificados mediante métodos moleculares, se encontraron 2 levaduras que en la base de datos no coincidieron con ninguna especie descrita y podrían representar especies nuevas. Estos aislamientos correspondieron a un aislamiento cercano al género *Cryolevonia* spp. y un aislamiento del género *Soliccocozyma* spp.

El dendrograma realizado para la posible especie *Cryolevonia* sp., mostró que el aislamiento, obtenido de suelo del Glaciar Castaño Overa, se ubica junto a otro aislamiento proveniente del sedimento de un lago en Antártida y ambos como grupo hermano de este género, mostrando 41 diferencias nucleotídicas en la región ITS con la especie *Cr. schafbergensis* (Figura 2.7).

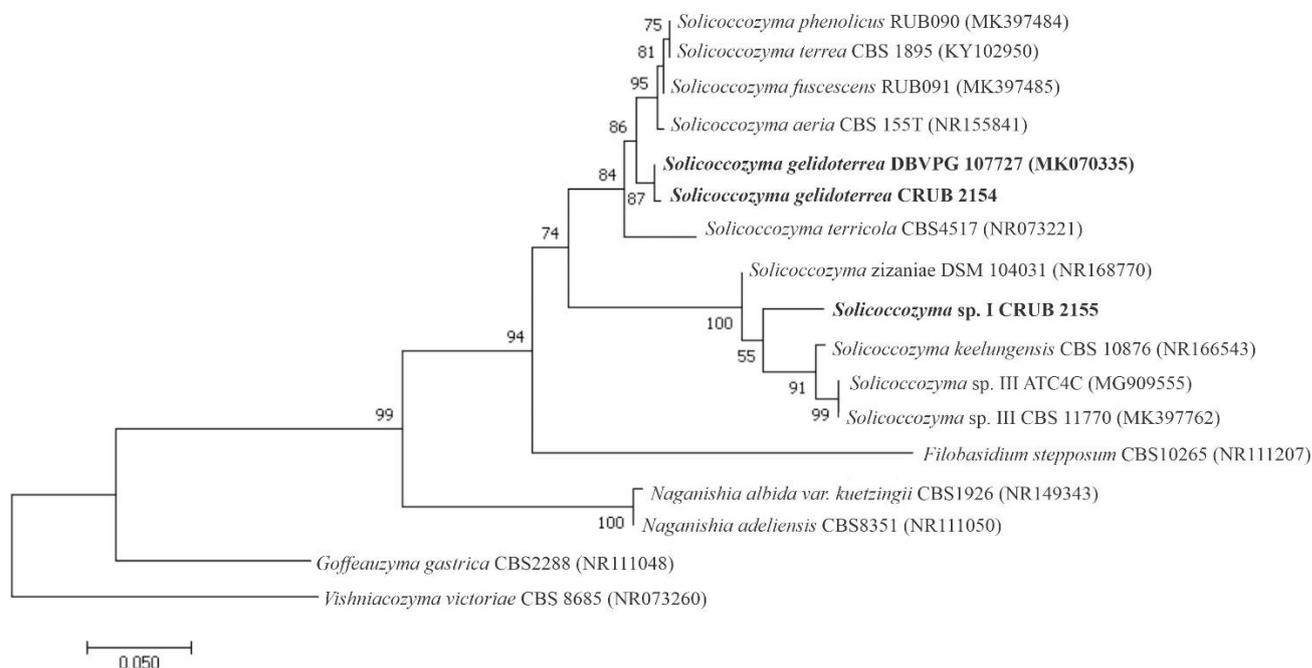
**Figura 2.7: Árbol filogenético que ilustra las relaciones de la especie *Cryolevonia* sp.**

Dendrograma obtenido por medio de *neighbour-joining* (método de distancia K2P) de la región ITS, en comparación con secuencias obtenidas de bases de datos públicas. La escala indica el número de sustituciones acumuladas cada 100 bases nucleotídicas.



Uno de los aislamientos del género *Solicoccozyma*, obtenido de suelo del Glaciar Castaño Overa quedó como grupo hermano de *S. phenolicus*, *S. terrea*, *S. fuscescens* y *S. aeria*, con 22 nucleótidos de diferencia con *S. aeria*, agrupándose con una cepa de *S. gelidoterrea* (con 1 nucleótido de diferencia), una especie recientemente descrita, por lo que fue identificado como tal (Liu et al., 2020). Mientras que *Solicoccozyma* sp. I, aislada de nieve del Glaciar Castaño Overa se posicionó como grupo hermano de *S. keelungensis*, con 31 nucleótidos de diferencia, constituyendo una posible nueva especie (Figura 2.8).

**Figura 2.8: Árbol filogenético que ilustra las relaciones de la especie *Solicoccozyma* sp. I** Dendrograma obtenido por medio de *neighbour-joining* (método de distancia K2P) de la región ITS, en comparación con secuencias obtenidas de bases de datos públicas. La escala indica el número de sustituciones acumuladas cada 100 bases nucleotídicas. *Piskurozyma cylindrica* fue utilizada como raíz del dendrograma.

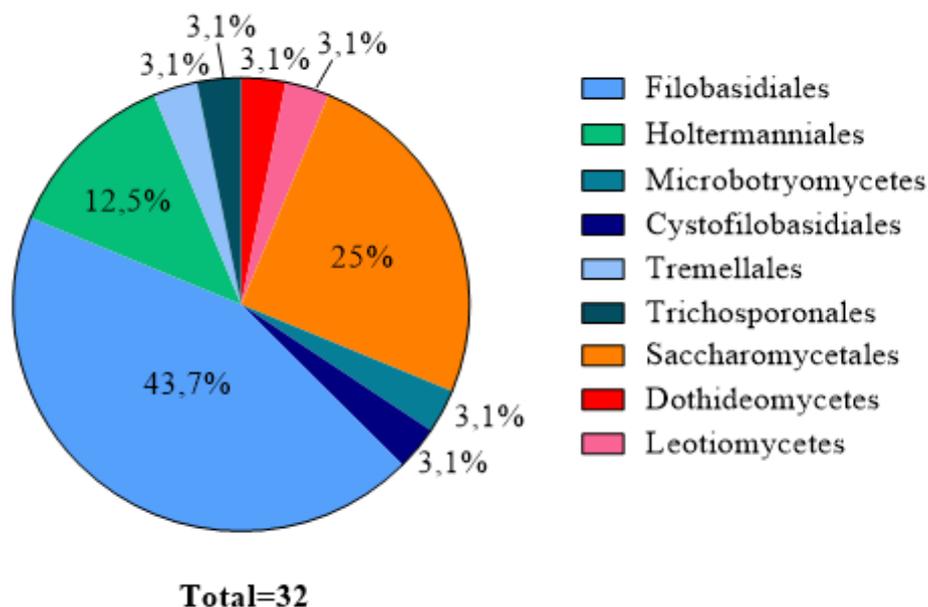


### 2.3.2 BIODIVERSIDAD DE LEVADURAS POR SUSTRATO

Como se mencionó anteriormente de las 106 levaduras identificadas a nivel molecular el 19% correspondió a levaduras ascomicéticas y 81% a levaduras basidiomicéticas. En las muestras de suelo las levaduras identificadas presentaron una mayor proporción de levaduras ascomicéticas (31,5%) en comparación con el resto de los sustratos estudiados, donde representaron el 16% para hielo/nieve y el 8,4% para las muestras de agua. Las levaduras basidiomicéticas representaron el 91,6% de los aislados obtenidos para las muestras de agua, el 84% para hielo/nieve y el 68,5% para las muestras de suelo.

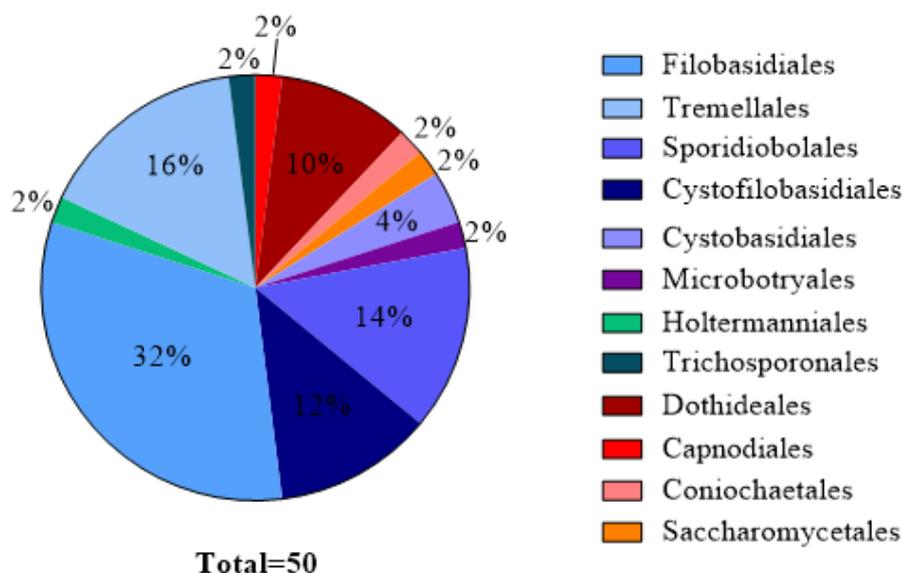
En las muestras de suelo las levaduras ascomicéticas (31,5%) estuvieron representadas por 3 clases, siendo Saccharomycetes la clase más abundante con el 25%, donde la especie *Wickerhamomyces anomalus* fue la más representativa para los sitios asociados al glaciar Castaño Overa y al río Castaño Overa. Las clases Dothideomycetes (3,1%) y Leotiomycetes (3,1%) representaron el 6,2% restante. Por otro lado, la clase Tremellomycetes dentro del phylum Basidiomycota fue la más abundante, representada por los órdenes Filobasidiales (43,7%) y Holtermanniales (12,5%) (Figura 2.9).

**Figura 2.9: Abundancia relativa en porcentaje de órdenes de levaduras presentes en muestras de suelo de CO, RCO y VN**



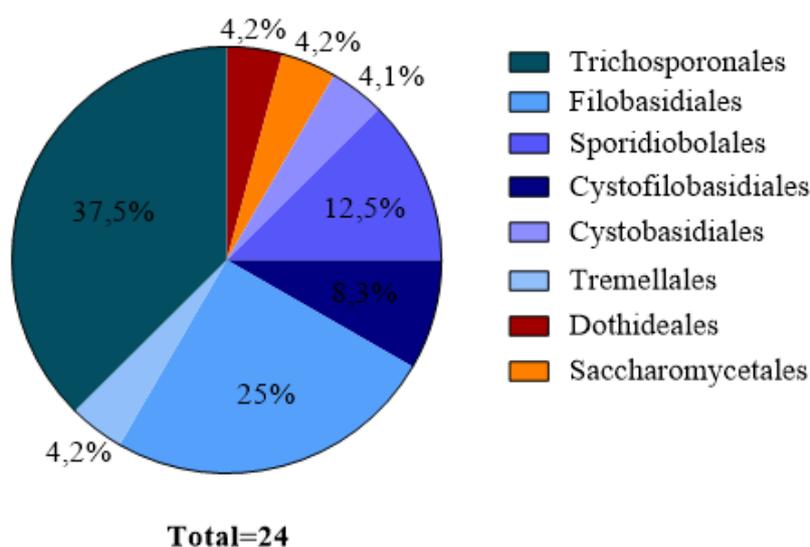
En las levaduras secuenciadas de las muestras de hielo y de nieve de los sitios CO y VN (50), las levaduras ascomicéticas representaron un 16% del total de levaduras identificadas, con los órdenes Dothideales (10%), Capnodiales (2%), Coniochaetales (2%) y Saccharomycetales (2%), donde la especie *Aureobasidium pullulans* fue la mayoritaria. El 84% restante fueron levaduras basidiomicéticas, las más abundantes fueron Filobasidiales (32%), Tremellales (16%) (ambas de la clase Tremellomycetes) y Sporidiobolales (clase Microbotryomycetes) (14%) (Figura 2.10).

**Figura 2.10: Abundancia relativa en porcentaje de ordenes de levaduras presentes en muestras de hielo y nieve de CO y VN**



Las 24 levaduras provenientes de las muestras de agua de VN y RCO mostraron un resultado similar al obtenido para el hielo y nieve, donde el 8,4% del total estuvo representado por levaduras ascomicéticas de los órdenes Dothideales (4,2%) y Saccharomycetales (4,2%). Las levaduras basidiomicéticas fueron las más abundantes con un 84%, repartidas en los órdenes Trichosporonales (37,5%) y Filobasidiales (25%) de la clase Tremellomycetes (Figura 2.11).

**Figura 2.11: Abundancia relativa en porcentaje de ordenes de levaduras presentes en muestras de agua de RCO y VN**



### 2.3.3 BIODIVERSIDAD DE LEVADURAS POR SITIO

#### GLACIAR CASTAÑO OVERA

En las muestras de suelo asociadas al glaciar Castaño Overa se aislaron 83 levaduras, las cuales fueron agrupadas según sus características morfológicas en 20 grupos, de estos grupos se seleccionaron 15 representantes para su identificación molecular. Estas 15 levaduras representaron 8 taxones diferentes, 7 especies y un aislado que fue identificado solo a nivel de clase. Tomando en cuenta los agrupamientos del total de aislamientos, el 61% correspondió a levaduras pertenecientes o con morfología similar al género *Solicoccozyma* (*Solicoccozyma* sp. 34%, *S. aerea* 16%, *S. terricola* 11%), seguida por el género *Naganishia* (12%) y la especie *Wickerhamomyces anomalus* (10%).

De las muestras de hielo se obtuvieron 33 aislamientos con los que se conformaron 11 grupos morfológicos de los que se identificaron molecularmente 14 aislamientos, que correspondieron a 10 especies. Del total de levaduras aisladas en este sustrato, las más abundantes fueron especies dentro del género *Dioszegia* (11%), y las especies *Aureobasidium pullulans*, *Naganishia friedmannii* y *Goffeauzyma gilvescens*, estas últimas 3 con una abundancia relativa de 9% cada una. Por último, de las muestras de nieve se aislaron 107 levaduras, que conformaron 27 grupos morfológicos de las que se seleccionaron 28 aislamientos para su identificación molecular, que representaron 21 especies diferentes. Donde los grupos taxonómicos más representativos de este sustrato fueron *Aureobasidium pullulans* (14%), *Dioszegia* spp. (7%), *Solicoccozyma* spp. (7%) y *Rhodotorula mucilaginosa* (5%).

#### RÍO CASTAÑO OVERA

En el río Castaño Overa se aislaron del suelo un total 103 levaduras con las que se conformaron 23 grupos morfológicos, y se enviaron para su identificación 13 aislamientos que correspondieron a 7 taxones diferentes: 5 especies y dos aislamientos a nivel de clase. Los agrupamientos realizados fueron identificados o asociados con los siguientes géneros mayoritarios: *Naganishia* spp. (23%), *Solicoccozyma* spp. (16%), *Vishniacozyma* spp. (10%), y las especies *Wickerhamomyces anomalus* (9%), *Naganishia friedmannii* (5%). De las muestras de agua se obtuvieron 16 aislamientos, que conformaron 14 grupos morfológicos y representaron 12 especies diferentes, siendo *Goffeauzyma gastrica* la más abundante (21,4%).

*GLACIAR VENTISQUERO NEGRO*

Para las muestras de suelo provenientes del sitio asociado al glaciar Ventisquero Negro, se aislaron 40 levaduras con las que se conformaron un total de 10 grupos morfológicos de los que se identificaron 5 aislamientos a nivel de especie, 4 correspondieron a especies diferentes. Las levaduras más abundantes en el suelo fueron: *Xanthophyllomyces dendrorhous* (23%), *Filobasidium magnum* (20%) y *Naganishia* spp. (14%). En el hielo se aislaron 29 levaduras con las que se conformaron 13 grupos, de los que se identificaron 7 levaduras a nivel de especie, representando 6 especies diferentes. Los agrupamientos estuvieron relacionados con: *Filobasidium magnum* (27%), *Naganishia adeliensis* (14%) y *Rhodotorula mucilaginosa* (10%). En el agua se obtuvieron 30 aislamientos y se conformaron 14 grupos, de los que se identificaron 12 levaduras a nivel de especie, con 5 especies diferentes. Las especies y géneros más relevantes fueron: *Vanrija albida* (64%) y *Rhodotorula mucilaginosa* (17%).

Se calculó el índice de diversidad de Shannon-Wiener para cada sustrato/sitio con el total de levaduras aisladas, además tomando el dato de presencia de cada especie obtenida, se estimó la similaridad de las comunidades de levaduras utilizando el índice de Jaccard. Los datos obtenidos para el índice de Shannon-Wiener mostró que el suelo del río Castaño Overa presentó la mayor diversidad ( $p < 0,01$ ), con respecto al resto de los sitios, mientras que el menor valor lo presentó el agua del glaciar Ventisquero Negro ( $p < 0,05$ ) (Tabla 2.4).

**Tabla 2.4: Índice de diversidad de Shannon-Wiener para cada sitio y sustrato**

Las diferencias significativas fueron calculadas con el test de t de Hutcheson. \*\*:  $p < 0,01$ ; \*:  $p < 0,05$ ; ns: sin diferencia significativa; CO: glaciar Castaño Overa, RCO: río Castaño Overa; VN: glaciar Ventisquero Negro; S: Suelo; N: Nieve; H: Hielo; A: Agua.

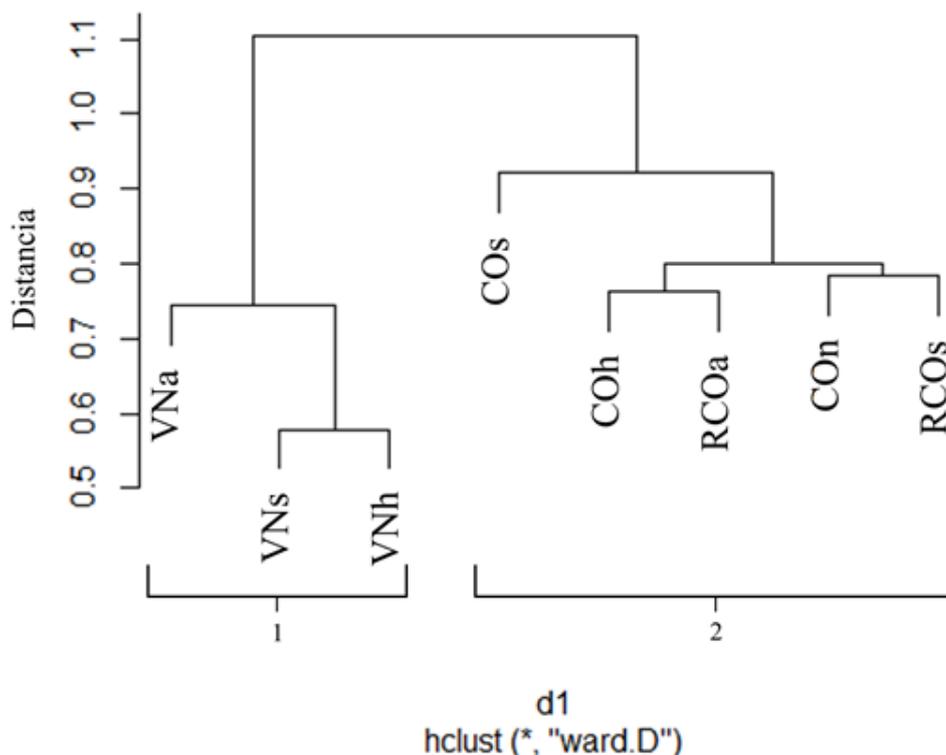
|                             | COS     | CON     | COH   | RCOS    | RCOA    | VNS     | VNH     | VNA     |
|-----------------------------|---------|---------|-------|---------|---------|---------|---------|---------|
| <b>I. de Shannon-Wiener</b> | 2,00986 | 2,38501 | 2,583 | 2,65841 | 2,44102 | 2,17714 | 2,23984 | 1,66049 |
| <b>COS</b>                  |         |         |       |         |         |         |         |         |
| <b>CON</b>                  | *       |         |       |         |         |         |         |         |
| <b>COH</b>                  | **      | ns      |       |         |         |         |         |         |
| <b>RCOS</b>                 | **      | ns      | ns    |         |         |         |         |         |
| <b>RCOA</b>                 | **      | ns      | ns    | *       |         |         |         |         |
| <b>VNS</b>                  | ns      | ns      | **    | **      | *       |         |         |         |
| <b>VNH</b>                  | ns      | ns      | *     | **      | ns      | ns      |         |         |
| <b>VNA</b>                  | *       | **      | **    | **      | **      | **      | **      | **      |

Utilizando el índice de Jaccard se armó una matriz de distancia con la que se realizó un dendrograma que permitió separar dos grupos principales, uno conformado por todas las muestras obtenidas en el glaciar Ventisquero Negro (grupo 1) y otro compuesto por las

muestras provenientes del glaciar Castaño Overa y del río Castaño Overa (grupo 2) (Figura 2.12).

**Figura 2.12: Dendrograma que representa la similitud en la composición de las especies de levaduras aisladas en las muestras de suelo, hielo y nieve glaciar de los diferentes sitios de muestreo del Monte Tronador**

La longitud de los brazos del clúster muestra el nivel de similitud. La agrupación fue basada en la matriz de distancia calculada con el índice de Jaccard. CO: glaciar Castaño Overa, RCO: río Castaño Overa, VN: glaciar Ventisquero Negro. s: Suelo; n: Nieve; h: Hielo; a: Agua.



Dentro del grupo 1, las muestras de agua del glaciar Ventisquero Negro fueron las más distantes a los otros dos sustratos, mientras que las muestras de suelo y las de hielo presentaron mayor similitud y se agruparon. En el grupo 2, las muestras de suelo del glaciar Castaño Overa fueron las más distantes al resto de sustratos y/o sitios. Por otro lado, las muestras de suelo del río Castaño Overa y las muestras de nieve del glaciar Castaño Overa presentaron mayor similitud entre comunidades, de la misma manera que las muestras de hielo del glaciar Castaño Overa y de agua del río Castaño Overa.

## 2.4 DISCUSIÓN

En nuestro laboratorio, desde hace más de 20 años se realizan estudios de la biodiversidad y biotecnología de levaduras de ambientes fríos del Parque Nacional Nahuel Huapi, siendo los glaciares y ambientes relacionados al Monte Tronador el principal sitio de estudio. El objetivo

principal de este capítulo fue estudiar la diversidad de levaduras cultivables de diferentes sustratos asociados al sistema glaciar del Monte Tronador, comparar los resultados obtenidos con los trabajos previos, analizando las comunidades de levaduras aisladas de cada sustrato en el tiempo (de Garcia et. al, 2007; Libkind et al., 2008a; Brandão et al., 2010; de Garcia, et al. 2012a y b; Mestre et al., 2009, 2014; Muñoz et al., 2013; Brandão et al., 2017; de Garcia et al., 2020).

Los recuentos de levaduras, obtenidos en este capítulo, mostraron variabilidad entre las réplicas para los diferentes sitios de muestreo y sustratos, algo esperable en sistemas altamente dinámicos como los glaciares de montaña. Ya que las comunidades microbianas se encuentran primariamente asociadas a sedimentos en los ecosistemas glaciares y la variación observada en los recuentos puede deberse al contenido no homogéneo de partículas en las muestras (Ren et al., 2019).

Los medios de cultivo más utilizados para el aislamiento de levaduras en ambientes naturales son YPD y MYP, donde YPD es más rico en nutrientes y es el más utilizado para el estudio de levaduras asociadas a ambientes terrestres (Kurtzman et al., 2011, Connell et al., 2008); mientras que el medio MYP está más asociado a trabajos donde el sustrato es oligotrófico (Libkind et al, 2003, 2008; de Garcia et al., 2012; Brandão et al, 2011). En nuestro trabajo se planteó el uso de estos 2 medios de cultivo, MYP con modificaciones (MYP 10%) e YPD para estudiar si existían diferencias en el aislamiento de levaduras con ambos medios y en los diferentes sustratos. Los recuentos (UFC) registrados fueron similares en ambos sustratos, este resultado indicaría que, para el aislamiento de levaduras adaptadas a este ambiente extremo, puede utilizarse tanto uno como el otro, siendo comparable a lo reportado por de Garcia et al. (2012a) con medios de cultivos similares. Sin embargo, se observó para todos los sustratos, un crecimiento menor, tanto en número como en el tamaño de las colonias de hongos filamentosos, en las placas con medio MYP 10% en contraposición con las de YPD. Las levaduras aisladas de ambientes fríos generalmente presentan tasas de crecimiento menores a los hongos filamentosos del mismo ambiente, por lo que el uso de MYP 10% permitiría evitar o reducir la contaminación de las placas con hongos filamentosos, así como la pérdida de dichas placas y/o a la pérdida de levaduras.

Los valores de recuentos de levaduras obtenidos para el suelo fueron similares a los sedimentos supra y sub glaciar de los Alpes y Apeninos ( $10^2$  a  $10^3$  UFC.g<sup>-1</sup>) (Turchetti et al., 2014), sedimento del glaciar Siachen, Pakistán ( $10^2$  UFC.g<sup>-1</sup>) (Hassan et al., 2017), y suelo de la Antártida ( $10^2$  UFC.g<sup>-1</sup>) (Gomes et al., 2018) e inferior a suelos asociados a los bosques patagónicos de *Nothofagus pumilio* y *Nothofagus antártica* ( $9 \times 10^2$  a  $19 \times 10^4$  UFC.g<sup>-1</sup>) (de

Garcia et al 2014; Mestre et al., 2014). Comparando los diferentes sitios de muestreo, el suelo asociado al glaciar Castaño Overa y el río Castaño Overa presentó similitudes de los valores de UFC.g<sup>-1</sup>, sin embargo, el glaciar Ventisquero Negro presentó mucha variabilidad entre las réplicas, con recuentos muy bajos o incluso cero y una sola placa con recuento de 5,5x10<sup>3</sup> UFC.g<sup>-1</sup>. Esto puede deberse a que el suelo correspondiente al Ventisquero Negro, presentaba condiciones de humedad significativamente menores al resto de los suelos y este resultado se condice con las características físico-químicas de la muestra, así como con los datos de metagenómica, que se discutirán en el capítulo 4. En este trabajo los resultados de recuentos y aislamiento de suelos resultan novedosos, ya que no existen registros de levaduras en suelo desnudos de morenas glaciares para la Patagonia Argentina.

Los recuentos de UFC en las muestras de nieve, hielo y agua variaron dentro del rango reportado en dichos sustratos para el mismo ambiente en glaciares, ríos y lagos de Patagonia Norte (Nieve: 10 a 10<sup>3</sup> UFC.L<sup>-1</sup>, Hielo: 10 a 10<sup>3</sup> UFC.L<sup>-1</sup>, Agua: 10<sup>2</sup> a 10<sup>3</sup> UFC.L<sup>-1</sup>) (de Garcia et al., 2014; Libkind, et al., 2017) y para el hielo en otros glaciares de montaña como los Alpes y Apeninos (Turchetti et al., 2014) y del Ártico (5 x10<sup>3</sup> UFC.L<sup>-1</sup>) (Perini et al., 2019). Sin embargo, los sitios mostraron diferencias significativas con respecto a los recuentos en cada sustrato. La nieve, el hielo del glaciar Castaño Overa y el agua del río Castaño Overa presentaron mayor cantidad de UFC que el hielo y el agua del glaciar Ventisquero Negro. Los datos obtenidos para el hielo del Ventisquero Negro constituyen el primer reporte de levaduras cultivables, para este tipo particular de hielo glaciar.

Con los resultados obtenidos al estudiar la diversidad de cada sustrato utilizando el índice de Shannon-Wiener, pudimos observar que las comunidades presentes en los sustratos de hielo y agua del Ventisquero Negro, fueron menos diversas que los mismos sustratos en los otros dos sitios. Asimismo, al analizar las distancias entre las comunidades, todo el sistema asociado al Ventisquero Negro se separa del resto de sustratos y sitios. Las diferencias entre las muestras de un mismo sitios podría ser atribuida a las características físicoquímicas particulares asociadas al glaciar Ventisquero Negro (Worni et al., 2012), dado que es un glaciar de reconstitución (Ruiz et al., 2017; Ruiz & Trombotto, 2012), por lo que recibe nieve, hielo, sedimentos y nutrientes de los glaciares y suelo de las zonas superiores (Modenutti et al., 2018), y la dinámica del agua y hielo asociados a este glaciar, plantean escenarios diferentes a los de cualquier glaciar o río del mismo sistema.

Como se mencionó anteriormente, en este capítulo se plantea el estudio de la biodiversidad de levaduras cultivables utilizando para ello la identificación basada en secuenciación de la región ITS de aislamientos representativos de grupos creados en base a características morfológicas

de colonia. Para los resultados obtenidos, se observó que la mayor cantidad de grupos correspondieron a las muestras de nieve del glaciar Castaño Overa seguidos por el agua del río Castaño Overa. Las muestras de suelo mostraron siempre una menor riqueza con respecto a las especies identificadas, que coincidieron con más de un grupo morfológico. Esto puede deberse a la sobrerepresentación de levaduras color crema/claras sin producción de micelio, pseudomicelio u otras estructuras morfológicas distintivas. El agrupamiento inicial de los aislamientos por su morfología de colonia, permitió obtener una primera imagen de la riqueza de levaduras en cada sustrato.

Dentro de las levaduras aisladas, los únicos grupos representados fueron los phyla Ascomycota y Basidiomycota. Las levaduras del phylum Basidiomycota presentaron la mayoría de los aislamientos para todos los sitios y sustratos, y estos taxones fueron registrados en hielo, agua y suelo en ambientes patagónicos fríos (de Garcia et al, 2014; Mestre et al., 2014; Brandão et al., 2017). Este resultado puede explicarse por el hecho que las levaduras basidiomicéticas tienen una plasticidad genotípica mayor a la observada en levaduras ascomicéticas, esto les permitiría sobrevivir y adaptarse de mejor manera a la exposición prolongada a temperaturas y condiciones sub-óptimas (Morgan-Kiss et al., 2006).

Las especies más abundantes en las muestras extraídas de diferentes sustratos asociados al Monte Tronador pertenecientes al phylum Ascomycota correspondieron a *Aureobasidium pullulans* (Dothideales) y *Wickerhamomyces anomalus* (Saccharomycetales).

*Aureobasidium pullulans* es una levadura extremotolerante, aislada de diferentes sustratos como superficie de plantas (Andrews et al., 2002; Grube et al., 2011), agua del lago subglacial Vostok (D'Elia et al., 2009), suelos desérticos de la Antártida (Coleine et al., 2020), aguas costeras hipersalinas (Gunde-Cimerman et al., 2000; Oren & Gunde-Cimerman, 2012), agua de deshielo y hielo glaciar (Zalar et al., 2008; Branda et al., 2010, Brandão et al., 2011, de Garcia et al., 2012) y filoplano (Muñoz et al., 2013). Esta especie ha sido asociada también a ambientes limitantes del crecimiento microbiano tales como alimentos congelados y/o conservados en sal (Pitt & Hocking, 2009; Nisiotou et al., 2010). Existen 4 variedades diferentes (Zalar et al, 2008), descritas actualmente como nuevas especies, todas con características y perfiles metabólicos distintos, por ejemplo, cepas con crecimiento en medios o sustratos con alta presión osmótica (*A. pullulans*); desarrollo en ambientes oligotróficos y con temperaturas a 37°C (*A. melanogenum*); crecimiento a 4°C en ambientes glaciales (*A. subglaciale*) y aislamientos del desierto del Namib (*A. namibiae*) (Gostincar et al., 2014).

En nuestro trabajo, *Aureobasidium pullulans* fue aislado de manera mayoritaria en las muestras de nieve y hielo del Castaño Overa, estando presente también en suelo y agua del río Castaño

Overa. Los estudios genómicos, llevados a cabo con diferentes cepas de este hongo dimórfico, lo muestran como un verdadero generalista que puede sobrevivir en diversos hábitats sin una especialización sustancial a nivel de genoma (Gostincar et al., 2019). Sin embargo, posee diversas adaptaciones, como por ejemplo la producción de melanina y otros metabolitos, que juegan un importante rol en la supervivencia a condiciones de temperaturas altas o bajas, extremo pH, estrés osmótico y alta radiación UV (Gostincar et al., 2012; El Baidouri, et al., 2021). El hielo glaciar constituye uno de los ambientes, que por sus características puede mantenerse metabólicamente activo (El Baidouri, et al., 2021).

*Wickerhamomyces anomalus* es una especie ampliamente distribuida en la naturaleza, es común en diversos tipos de suelos, materia en descomposición y frutas. Aunque se cree que el hábitat principal de esta especie son las plantas (Kurtzman et al, 2011), también hay reportes de aislamientos en comida salada (Zajc et al., 2017), moluscos de la bahía Lasserre, Antártida (King-Miaow, et al., 2019), suelos de ambientes extremos como la Antártida (Villarreal et al., 2018). Además, posee tolerancia a la desecación, baja disponibilidad de agua, un amplio rango de pH (2 a 12,4) (Buzzini, et al., 2018) y halotolerancia con un máximo registrado de 15% NaCl en el medio de cultivo (Lages et al. 1999; Kurtzman et al. 2011). Las muestras de suelo del cerro Tronador fueron las que tuvieron mayor cantidad de aislamientos de esta especie, en particular el suelo del glaciar y del río del Castaño Overa. Una especie del mismo género y de un clado hermano (*W. patagonicus*) ha sido aislada y posteriormente descrita para agua del mismo glaciar (de Garcia et al., 2010).

Las especies o géneros más abundantes en las muestras extraídas de diferentes sustratos asociados al Monte Tronador pertenecientes al phylum Basidiomycota correspondieron a *Solicoccozyma* spp., *Naganishia* spp. (Filobasidiales), *Vishniacozyma* spp. (Tremellales) y *Rhodotorula mucilaginosa* (Sporidiobolales). Las especies de los géneros *Solicoccozyma* y *Naganishia* pertenecen a una reclasificación, dentro del orden Filobasidiales, del género *Cryptococcus* (Liu et al., 2015). Estos géneros presentan especies cosmopolitas que poseen resistencia a la desecación, con presencia en hábitats caracterizados por la baja actividad de agua y han demostrado diferentes grados de características osmófilas y osmotolerantes (Buzzini et al., 2018). Las muestras de suelo del glaciar Castaño Overa y del río Castaño Overa, mostraron alta abundancia de levaduras del género *Solicoccozyma*, cuyas especies han sido registradas como habitantes de suelos asociados a la rizósfera de diferentes especies de árboles del género *Nothofagus*, así como de suelos de la meseta del Tibet y de la Antártida (Connell et al., 2014; Mestre et al., 2014, 2016; Sannino et al., 2017). Asimismo, han sido aisladas de diferentes sustratos de la Patagonia Argentina, como agua ácida del Río Caviahue (Russo et

al., 2009), y de lagos y lagunas ultraoligotróficas, se ha reportado que especies de estos géneros tienen la capacidad de producir metabolitos de interés como las micosporinas (Moliné et al. 2011; Libkind et al., 2017).

Por otro lado, las levaduras del género *Naganishia* fueron aisladas de todos los sustratos en todos los sitios de muestreo, con la mayor cantidad de aislamientos provenientes del suelo del río Castaño Overa. Las especies dentro del género *Naganishia* se encuentran entre las más resistentes a la radiación UV, sobreviviendo en ambientes extremos y de altura como el desierto de Atacama (Schmidt et al., 2017), desierto Antártico (Connell et al., 2008) y hielo subglacial en Svalbard (Butinar et al., 2007). Dentro del género, se encuentran especies extremófilas, como *N. vishniacii*, que presentan especializaciones tanto para la fotoprotección, el metabolismo de lípidos y la síntesis de trehalosa y de proteínas, que confieren una ventaja para el desarrollo a bajas temperaturas (Nizovoy et al., 2021). Ambos géneros, *Solicoccozyma* y *Naganishia*, son objeto de estudio para la producción de lípidos microbianos, algo que permitiría la utilización de sub-productos de diferentes industrias para la producción de lípidos y biocombustibles de 2da generación (Papanikolaou & Aggelis, 2011b; Selvakumar & Sivashanmugam, 2018).

El género *Vishniacozyma* también fue aislado de todos los sitios y sustratos estudiados, con mayor cantidad de aislamientos provenientes del suelo del río Castaño Overa, de hielo y nieve del glaciar Castaño Overa. La especie mayormente reportada en este trabajo, *Vishniacozyma victoriae*, ha sido frecuentemente aislada de diferentes sustratos de la Antártida y del Ártico (Vaz et al., 2011; Santiago et al., 2015) así como de otros ambientes extremos como el Glaciar Calderone en Italia hielo glacial y suelo del Ártico (Butinar et al., 2011), en los Alpes italianos del suelo y agua de deshielo (França et al., 2016); en Patagonia de hielo glacial, agua de deshielo y suelo (Brandão et al., 2011; de Garcia et al., 2014).

La especie representativa del orden Sporidiobolales fue *Rhodotorula mucilaginosa*. Esta levadura estuvo presente en todos los sitios y sustratos, pero fue aislada con mayor frecuencia de hielo y nieve del glaciar Castaño Overa. Esta especie ha sido aislada de ambientes muy diversos incluyendo ríos ácidos de la Patagonia (Russo et al., 2008), aguas residuales de un parque industrial (Lahav et al., 2002) ríos y lagos de altura de la Patagonia (Libkind et al., 2004, 2006; Brandão et al., 2011), hielo glacial de montaña y nieve de la Antártica (Villarreal et al., 2018). Tiene la capacidad de crecer a una alta densidad celular y puede utilizar una amplia gama de fuentes de carbono y nitrógeno (Park et al., 2018). Es una levadura pigmentada, con potencialidad biotecnológica importante para la industria de los alimentos y procesos de bioconversión (Moliné et al., 2010; Kot et al., 2019).

Se identificaron 2 posibles nuevas especies, asociadas al género *Solicoccozyma* (Filobasidiales) y al género recientemente descrito *Cryolevonia* (Camptobasidiaceae) (de Garcia et al., 2020; Pontes et al., 2020). En base a este resultado y a los estudios previos del mismo ambiente (de Garcia et al., 2014), se espera que, dentro de los aislamientos que aún no han sido secuenciados, se encuentren más cepas correspondientes a estas posibles especies nuevas y a otras aún no descritas. Si bien la herramienta de agrupamiento por morfología, facilita el procesamiento y la estimación de diversidad, al seleccionar representantes de grupos, puede subestimar la riqueza específica al ceñirse preferencialmente a especies ya conocidas. Todas las especies representativas en los aislamientos de este trabajo son aparentemente ubicuas, geográficamente distribuidas y con adaptaciones fisiológicas y metabólicas que incrementan la protección contra los efectos de daño por baja temperatura, baja disponibilidad de agua y baja concentración de nutrientes. El estudio de la biodiversidad de levaduras cultivables, se complementa con estudios de metagenómica y nuevas tecnologías para el estudio de la biodiversidad microbiana en el ambiente, lo que nos permite un análisis global de los microorganismos presentes en estos ambientes extremos, delimitando los grupos funcionales que se encuentran presentes en el ambiente que por las limitaciones de los medios de cultivo o las condiciones de laboratorio utilizados no pueden ser aislados.

Fuera de la gran herramienta que propone la metagenómica para el estudio de comunidades microbianas en el ambiente, el estudio de las levaduras cultivables nos provee de herramientas para el estudio tanto de la biología o ciclos de vida y estrategias fisiológicas de estos microorganismos para habitar los ambientes extremos, a las células como modelos de estudio para análisis genómicos y además para la aplicación biotecnológica de estas levaduras, ya sea en la producción de metabolitos de interés o la célula como factoría para la obtención de un producto.

## 2.5 CONCLUSIONES PARCIALES

- El medio de cultivo MYP 10% es adecuado para el aislamiento de levaduras extremotolerantes provenientes de ambientes fríos ultraoligotróficos.
- El uso de las características morfológicas de colonias de levaduras permite agilizar el proceso de comparación entre sustratos y sitios, permitiendo procesar una gran cantidad de muestras.
- El glaciar Ventisquero Negro presenta diferencias en las comunidades de levaduras respecto al glaciar Castaño Overa y río Castaño Overa.

- Las levaduras aisladas de los ambientes glaciares del Monte Tronador correspondieron en su mayoría al phylum Basidiomycota.
- Las especies identificadas más abundantes correspondieron a *Aurobasidium pullulans*, *Goffeauzyma gilvescens*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Solicoccozyma terricola*, *Vanrija albida*, *Vishniacozyma victoriae* y *Wickerhamomyces anomalus*.
- Se detectaron posibles especies nuevas pertenecientes a los géneros *Cryolevonia* y *Solicoccozyma* de los clados Camptobasidiaceae y Filobasidiales, respectivamente.

## **CAPÍTULO III**

### **BIODIVERSIDAD DE LEVADURAS Y HONGOS DE GLACIARES DEL MONTE TRONADOR UTILIZANDO MÉTODOS MOLECULARES LIBRE DE CULTIVO**

### 3.1 INTRODUCCIÓN

En los últimos años se ha intensificado el uso de la secuenciación masiva de amplicones para el estudio de la ecología microbiana, permitiendo evaluar la estructura de las comunidades y sus cambios en el tiempo y espacio (Gołębiewski & Tretyn, 2020; González et al., 2012). La popularidad de estas herramientas proviene de la capacidad de estudiar tanto los microorganismos cultivables, como los que, hasta el momento, no han podido cultivarse (Browne et al., 2016). Dentro de las plataformas más utilizadas en los últimos años para los estudios de comunidades microbianas, y que han dado los mejores resultados, se encuentran la Pirosecuenciación 454 (Roche) e Illumina. La plataforma de Pirosecuenciación 454 (Roche), fue una de las primeras en ser utilizada en trabajos de metagenómica fúngica formando parte preeminente de la mayoría de los estudios que se llevaron a cabo entre el año 2008 hasta el 2015. A partir de ese año, fue quedando relegada por nueva tecnología hasta que fue discontinuada en el año 2016 (Tedersoo & Nilsson, 2016). Por otro lado, la plataforma Illumina es la más extendida dentro de las tecnologías de secuenciación de segunda generación, comenzando a utilizarse en el 2013 para estudios de comunidades fúngicas y en la actualidad la plataforma sigue actualizándose permitiendo su utilización (Schmidt, et al 2013; Shen et al., 2020).

Ambas herramientas generan un gran número de segmentos cortos de ADN. La pirosecuenciación permite obtener secuencias más largas (600 pb) que la plataforma Illumina (150 - 300pb), aunque ésta última al principio ofrecía secuencias de una dirección relativamente cortas (*single-end*), luego permitió la posibilidad de secuenciar los dos extremos de un fragmento de ADN y combinarlos (*paired-end*) para extender el largo de la secuenciación (MiSeq 2 x 300pb) (Tedersoo & Nilsson, 2016), logrando obtener los códigos de barras (*barcodes*) de los hongos más utilizados. Estos *barcodes* corresponden a las regiones que comprenden el ITS (*Internal Transcribed Spacer*, espacios intergénicos ITS1 e ITS2 y que incluye el gen 5,8S rARN) y del dominio D1D2 del gen 26s rARN. Los resultados obtenidos con las plataformas mencionadas pueden traducirse en *Operational Taxonomic Units* (OTUs) o en *Amplicon Sequence Variant* (ASVs). Los OTUs se construyen mediante un agrupamiento de las secuencias que son suficientemente similares entre sí (97% de similaridad). Por otro lado, los ASVs se infieren mediante un proceso de *novo*, en el que las secuencias biológicas se discriminan de los errores de base, teniendo en cuenta que las secuencias biológicas tienen más probabilidades de observarse repetidamente que las secuencias que contienen errores, esto le

permite poder comparar un set de datos de diferentes estudios o diferentes muestras (Callahan et al., 2016).

En Patagonia, los estudios metagenómicos más extendidos, para los ambientes fríos, se han realizado sobre comunidades bacterianas. Estos estudios abarcan tanto la Patagonia argentina como la chilena, estudiando diferentes sitios y sustratos, como son el Fiordo Comau (Ugalde et al., 2013; Undabarrena et al., 2016), el Mar Argentino en Península Valdés (Loviso et al., 2015), Bahía Ushuaia, Caleta Potter y la Península Antártica (Espínola et al., 2017). Los estudios metagenómicos exclusivos para comunidades de hongos abarcan desde los asociados a la rizósfera de especies nativas de los bosques patagónicos (Carrón et al., 2020; Mestre & Fontenla., 2021), hasta las comunidades de hongos de agua de deshielo glaciar en la Patagonia chilena (Gutiérrez, et al., 2015). En este capítulo utilizamos ambas herramientas de secuenciación masiva de amplicones (Pirosecuenciación 454 e Illumina) para estudiar la diversidad fúngica en muestras de suelo desnudo, hielo glaciar, nieve y agua de deshielo de glaciares del Monte Tronador de la Patagonia Andina Argentina.

## **3.2 MATERIALES Y MÉTODOS**

### **3.2.1 RECOLECCIÓN DE MUESTRAS Y DISEÑO EXPERIMENTAL**

La recolección de muestras y el diseño experimental se realizó como se detalla en materiales y métodos del Capítulo II (Página 18).

### **3.2.2 EXTRACCIÓN TOTAL DE ADN**

La extracción total de ADN de cada muestra fue realizada con kits comerciales de acuerdo a las indicaciones del fabricante, se utilizó el kit MOBIO *PowerMax*® para las muestras de suelo y el kit MOBIO *PowerWater*® para las muestras de hielo, nieve y agua.

Antes de proceder a la extracción de ADN, se juntaron y homogeneizaron las 5 submuestras obtenidas para cada muestra de suelo. Se utilizó 1 gramo de este pool para realizar la extracción. Todas las muestras de hielo y nieve se fundieron a 4°C. Del agua obtenida de cada muestra de hielo y nieve, así como de las muestras de agua, se filtraron 100 mL con filtros de 0,45µm y el filtrado obtenido se utilizó para la extracción de ADN. Las muestras de hielo del Ventisquero Negro se juntaron de a pares: muestra 1 con 2 (VNH1\*), 3 con 4 (VNH2\*) y 5 con 6 (VNH3\*) cada una se homogeneizó y se procesó. Para el caso de las muestras de agua del glaciar Ventisquero Negro y río Castaño Overa las 3 pseudorélicas de cada muestra se juntaron y se homogeneizaron antes de la filtración.

### 3.2.3 AMPLIFICACIÓN DE ADN

Se amplificó la región ITS (*Internal Transcribed Spacer*) del ADN ribosomal de todas las muestras obtenidas con los primers ITS1F (F) 5-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3 e ITS4(R) 5- TCCTCCGCTTATTGATATGC-3. Para la secuenciación masiva de amplicones se utilizaron 2 plataformas la Pirosecuenciación 454 de Roche y la plataforma Illumina MiSeq Paired-end.

La secuenciación masiva de amplicones de las muestras del glaciar Castaño Overa (Suelo Desnudo, Hielo y Nieve; año 2015) se realizó utilizando la plataforma 454 de Roche. Esta plataforma quedó discontinuada al año siguiente y por lo tanto dejó de estar disponible para su utilización. Por lo que se utilizó la plataforma Illumina MiSeq Paired-end para la secuenciación masiva de amplicones de todas las muestras del glaciar Ventisquero Negro y río Castaño Overa (Suelo desnudo, Hielo, Agua; año 2016).

### 3.2.4 SECUENCIACIÓN POR PIROSECUENCIACIÓN ROCHE 454

Primeramente, se realizó la amplificación por PCR usando *HotStarTaq Plus Master Mix Kit* (QIAGEN, Valencia, CA) bajo las siguientes condiciones: 94°C por 3 min, seguido por 28 ciclos a 94°C por 30 segundos, 53°C por 40 segundos y 72°C por 1 min, luego una elongación final a 72°C por 5 min. Luego, todos los productos de amplificación de las diferentes muestras fueron mezclados en igual concentración y purificados usando perlas *Agencourt AMPure* (Agencourt Bioscience Corporation, MA, USA). Finalmente, las muestras fueron secuenciadas utilizando el equipo y reagentes *Roche 454 FLX Titanium*, según las recomendaciones del fabricante. Todo este procesamiento fue llevado a cabo en colaboración con el laboratorio *Molecular Research LP, Shallowater* en Estados Unidos (MR DNA, *Shallowater*, USA).

### 3.2.5 SECUENCIACIÓN POR ILLUMINA MISEQ

Para la secuenciación por medio de la plataforma *Illumina Miseq paired-end* (300pb), en primer lugar, se realizó la fusión de los primers ITS1 (5-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3) e ITS4 (5-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3), con el barcode de cada muestra. Luego se realizó una amplificación realizando una PCR usando las siguientes condiciones: activación a 95°C por 10 min, seguido por 35 ciclos a 94°C por 30 segundos, 55°C por 1 min y 72°C por un min, con una elongación final a 72°C por 5 min. Para determinar el éxito de la amplificación y la intensidad de las bandas se comprobaron los productos de PCR en gel de agarosa al 2%, las muestras fueron mezcladas en proporciones iguales y purificadas. Luego se preparó la librería según los protocolos de la plataforma *Illumina*. Finalmente, las muestras fueron secuenciadas

utilizando el equipo y reagentes de *Illumina Miseq paired-end*, según las recomendaciones del fabricante. Todo este procesamiento fue llevado a cabo por *Macrogen Inc.* (Seúl, República de Corea).

### 3.2.6 PROCESAMIENTO DE DATOS

Los datos obtenidos por medio de pirosecuenciación 454 de *Roche*, fueron procesados utilizando el análisis *pipeline* de los laboratorios MR, DNA ([www.mrdnalab.com](http://www.mrdnalab.com), MR DNA, Shallowater, TX), con la plataforma *Qiime1 (Quantitative Insights Into Microbial Ecology)* (Caporaso et al., 2010). Con el paquete de datos se procedió a retirar los *barcodes* y *primers* utilizados (*demultiplexing*), luego se retiraron las secuencias cortas (<200pb), secuencias con bases ambiguas y secuencias con homopolímeros que excedieran las 6 pb. Luego de este proceso se definieron las unidades taxonómicas operacionales (*OTU*, por sus siglas en inglés) con un 97% de similaridad, se removieron las secuencias únicas (*singleton*) y las secuencias quiméricas (Dowd et al., 2008a, 2008b; Edgar, 2010; Capone et al., 2011; Eren et al., 2011).

Los datos obtenidos por medio de la plataforma *Illumina*, fueron procesados usando el protocolo *Qiime2* (<https://qiime2.org>). A las secuencias crudas se le retiraron los *barcodes* y luego se combinaron las secuencias *paired-end*, se filtraron por calidad y cantidad de bases (>150pb, *Quality Score*  $\geq$  20) (*denoising*), se eliminaron las secuencias quiméricas y se conformaron los ASV (*Amplicon Sequence Variant*) utilizando para ello el método de agrupamiento DADA2 (*Divisive Amplicon Denoising Algorithm 2*) (Callahan et al., 2016). El análisis en OTUs o ASV fue seleccionado de acuerdo al método de secuenciación masiva como es descrito en Xue et al. (2018), y al largo de las secuencias obtenidas, según las recomendaciones de Tedersoo et al. (2022).

Una vez obtenidos los resultados se procedió a la asignación taxonómica de los OTUs/ASVs, utilizando el algoritmo BLASTn contra la base de datos dinámica para la región ITS de UNITE (Abarenkov et al., 2010). Para consultar la taxonomía se utilizaron las publicaciones de Kirk (2008); Liu et al. (2015); Mclaughlin & Spatafora (2014, 2015); Wang et al. (2015) y la base de datos MycoBank (<http://www.mycobank.org>).

### 3.2.7 ANÁLISIS FILOGENÉTICOS

Se seleccionaron los OTUs de la clase Microbotryomycetes, que presentaron una abundancia de más del 80% del total de OTUs, para compararlos con secuencias relacionadas provenientes de bases de datos públicas (GenBank). Las relaciones filogenéticas entre las especies identificadas fueron determinadas utilizando el programa MEGA7: Molecular Evolutionary

Genetics Analysis version 7.0 (Kumar et al., 2016). El árbol filogenético fue construido utilizando el algoritmo *neighbor joining* (NJ), el soporte estadístico se obtuvo realizando análisis de distancias luego de 1000 repeticiones (*bootstrap*). El modelo Kimura de dos parámetros fue utilizado para estimar las distancias evolutivas entre las especies estudiadas (Kimura et al., 2004).

### 3.2.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Se calcularon los índices de diversidad *Alfa* (Chao1 y Shannon) y *Beta*, también se analizaron las diferencias en la composición de OTUs/ASVs dentro y entre sustratos para cada sitio utilizando el test de ANOSIM. Para evaluar las diferencias entre las secuencias obtenidas para cada sitio de muestreo, se realizaron análisis de la varianza (ANOVA). Para estimar la similaridad entre las muestras para cada sitio, se llevaron a cabo análisis de clúster jerárquicos (hierarchical cluster analysis) basado en la abundancia de OTUs/ASVs utilizando el índice de disimilaridad de Bray-Curtis. Se utilizó el mismo análisis para estimar la similaridad entre todas las muestras, utilizando esta vez la abundancia de secuencias rarefaccionadas con el índice de Bray-Curtis. Todos estos análisis fueron realizados utilizando el paquete Vegan en R (Oksanen et al., 2019).

## 3.3 RESULTADOS

### 3.3.1 DATOS DE SECUENCIACIÓN

En este trabajo fueron obtenidas 32 muestras de 3 sitios diferentes del Monte Tronador, incluyendo 3 tipos de sustratos diferentes, suelo, hielo/nieve y agua de deshielo, todas fueron enviadas para su secuenciación masiva con pirosecuenciación 454 de Roche e *Illumina MiSeq paired-end* para el estudio de la diversidad fúngica. Del total de muestras, 28 resultaron en resultados positivos y 4 (COS6, VNS5, VNA3, RCOA3) no lograron ser secuenciadas ya sea por baja calidad del ADN obtenido o por pérdida de las muestras por la empresa contratada.

En base a la secuenciación masiva de las 28 muestras estudiadas se obtuvieron un total de 3389059 secuencias crudas, estas secuencias fueron filtradas y se trabajó con un total de 2179989, las muestras amplificadas por pirosecuenciación 454 (glaciar Castaño Overa), oscilaron entre 225 y 553 pb, mientras que para las muestras procesadas por Illumina (río Castaño Overa y glaciar Ventisquero Negro), las longitudes oscilaron entre 232 y 413 pb. Las secuencias que presentaron una longitud mayor a 200 pb permitieron obtener los OTUs/ASVs para cada muestra. Las muestras de hielo/agua presentaron la mayor cantidad de secuencias

por OTUs/AVSs obtenido, mientras que las muestras de suelo presentaron la menor cantidad de secuencias para todos los sitios ( $p < 0,05$ ) (Tabla 3.1).

**Tabla 3.1: Datos de secuenciación masiva de muestras del glaciar Castaño Overa (CO), Ventisquero Negro (VN) y río Castaño Overa (RCO)**

Secuencias filtradas: total de secuencias que pasaron los parámetros de calidad; Secuencias promedio: promedio de secuencias de todas las muestras según cada sustrato.

|  | Pirosecuenciación 454 |                       | Illumina MiSeq |                |                |                   |                 |
|--|-----------------------|-----------------------|----------------|----------------|----------------|-------------------|-----------------|
|  | Suelo (COS)           | Hielo/Nieve (COH/CON) | Suelo (RCOS)   | Agua (RCOA)    | Suelo (VNS)    | Hielo (VNH)       | Agua (VNA)      |
| <b>Secuencias crudas</b>                   | 69269                 | 106826                | 726588         | 387018         | 1000180        | 580349            | 518829          |
| <b>Secuencias filtradas</b>                | 59791                 | 92463                 | 559847         | 291874         | 444258         | 280958            | 450798          |
| <b>Secuencias promedio</b>                 | 11842 ± 2498          | 184916 ± 3827         | 93307 ± 32404  | 145937 ± 85789 | 8885,6 ± 35056 | 111245,66 ± 83659 | 225399 ± 157888 |
| <b>n° de OTUs/ASVs</b>                     | 261,4 ± 64            | 211 ± 35,7            | 196,8 ± 94,87  | 138,5 ± 115,2  | 67,8 ± 14,18   | 51,5 ± 0,70       | 58,33 ± 18,50   |
| <b>Porcentaje OTUs/ASVs más abundantes</b> | 6,7                   | 10,3                  | 78,38          | 32,99          | 53,14          | 43,32             | 76,24           |

### 3.3.2 DIVERSIDAD Y ESTRUCTURA DE LAS COMUNIDADES FÚNGICAS

Una vez obtenidos los OTUs/ASVs para cada sitio se calcularon los índices de diversidad *alfa* para cada muestra (Tabla 3.2). El índice de Simpson (D), estima la diversidad y cuan equitativos son los OTUs/ASVs dentro de cada muestra, los resultados obtenidos para este índice fueron homogéneos para las muestras del glaciar Castaño Overa con valores cercanos al 0,9 (cuanto más cercano a 1 más homogénea es la muestra); mientras que para las muestras del Ventisquero Negro y del río Castaño Overa se obtuvieron valores variables. En este sentido las muestras de suelo mostraron valores extremos, los más altos y más bajos, y las muestras de agua y/o hielo tuvieron valores intermedios, para ambos sitios.

**Tabla 3.2: Índices de diversidad de cada muestra para cada sitio de muestreo**

OTUs/ASVs Obs: n° de OTUs/ASVs observados.

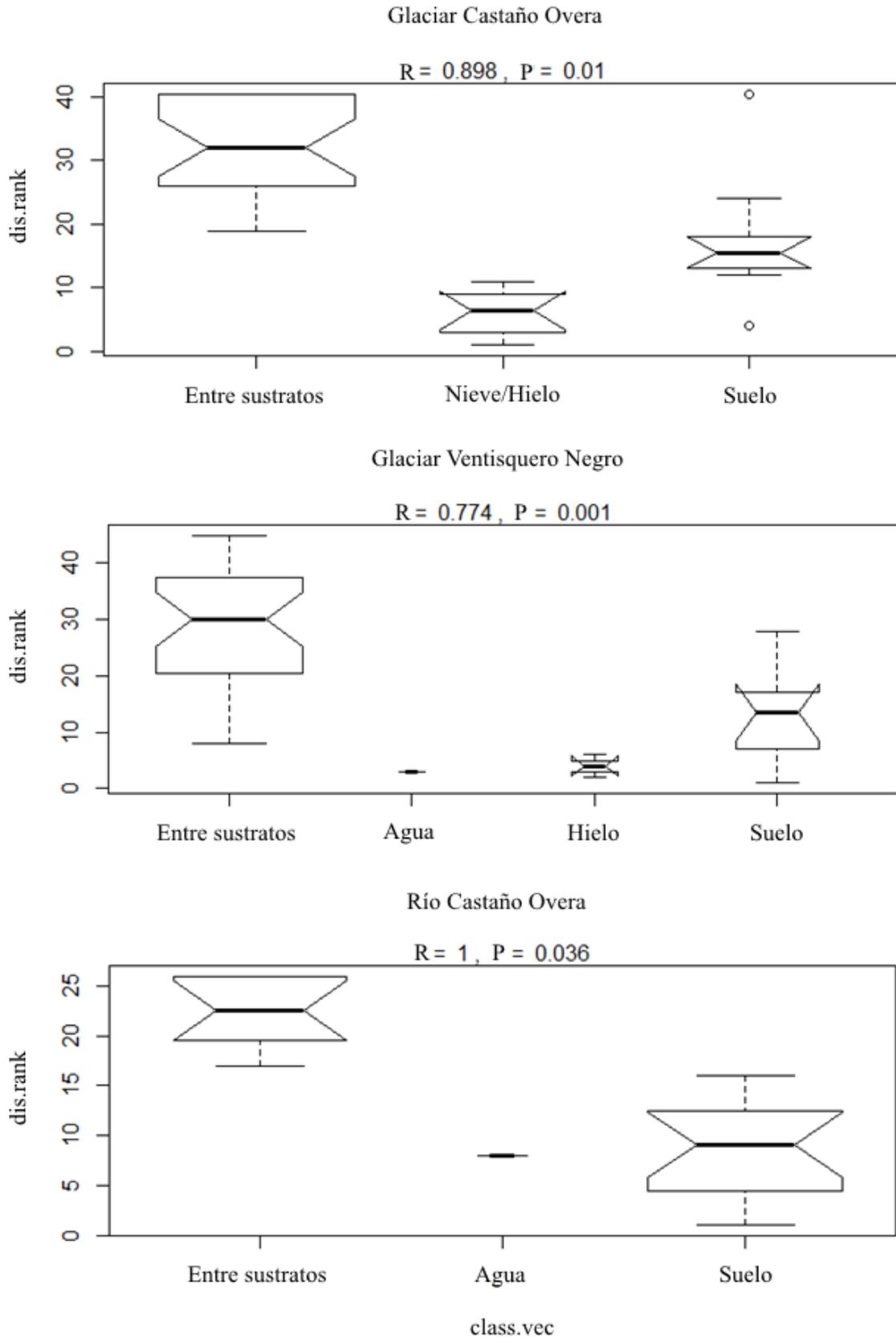
| Índices de Diversidad   | COS    |        |        |        |        | CON    |        |       | COH    |        |  |
|-------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|-------|--------|--------|--|
|                         | 1      | 2      | 3      | 4      | 5      | 1      | 2      | 3     | 2      | 3      |  |
| <b>Simpsons's (1-D)</b> | 0,902  | 0,974  | 0,946  | 0,945  | 0,934  | 0,948  | 0,935  | 0,947 | 0,949  | 0,95   |  |
| <b>Shannon (H)</b>      | 3,535  | 4,352  | 3,889  | 3,682  | 3,58   | 3,744  | 3,454  | 3,63  | 3,808  | 3,664  |  |
| <b>OTUs Obs.</b>        | 346    | 271    | 263    | 165    | 263    | 194    | 243    | 169   | 197    | 254    |  |
| <b>Chao1</b>            | 381,25 | 289,13 | 318,12 | 171,11 | 285,14 | 200,18 | 295,11 | 176   | 209,75 | 271,18 |  |
|                         | RCOS   |        |        |        |        |        | RCOA   |       |        |        |  |
|                         | 1      | 2      | 3      | 4      | 5      | 6      | 1      | 2     |        |        |  |
| <b>Simpsons's (1-D)</b> |        | 0,972  | 0,016  | 0,044  | 0,041  | 0,074  | 0,965  | 0,273 | 0,926  |        |  |
| <b>Shannon (H)</b>      |        | 4,454  | 0,068  | 0,205  | 0,191  | 0,319  | 4,407  | 0,954 | 3,426  |        |  |
| <b>ASVs Obs.</b>        |        | 172    | 26     | 123    | 128    | 170    | 360    | 57    | 218    |        |  |
| <b>Chao1</b>            |        | 172    | 26,2   | 128,69 | 133,04 | 186,08 | 362,33 | 57    | 218    |        |  |
|                         | VNS    |        |        |        |        | VNA    |        | VNH   |        |        |  |
|                         | 1      | 2      | 3      | 4      | 6      | 1      | 2      | 1     | 2      | 3      |  |
| <b>Simpsons's (1-D)</b> | 0,97   | 0,94   | 0,023  | 0,034  | 0,928  | 0,383  | 0,422  | 0,793 | 0,724  | 0,899  |  |
| <b>Shannon (H)</b>      | 3,775  | 3,364  | 0,101  | 0,14   | 3,547  | 1,115  | 1,283  | 2,392 | 2,293  | 2,82   |  |
| <b>ASVs Obs.</b>        | 67     | 57     | 49     | 71     | 81     | 51     | 51     | 68    | 69     | 37     |  |
| <b>Chao1</b>            | 67     | 57     | 51,5   | 84,6   | 81     | 52     | 51,5   | 68    | 69     | 37     |  |

El índice de Chao1 se utiliza para estimar el número de especies en una comunidad, para todas las muestras dicho valor fue similar a los OTUs/ASVs obtenidos, mostrando que la riqueza fue bien representada por ambas tecnologías. El índice de Shannon (H) estima cuán diversa es cada muestra, los resultados obtenidos para este índice fueron similares a los obtenidos para el índice de Simpson. Las muestras del glaciar Castaño Overa mostraron valores más homogéneos entre cada muestra (de 3,45 a 4,35), mientras que los resultados obtenidos para las muestras de glaciar Ventisquero Negro y del río Castaño Overa variaron entre 0,1 a 3,77 y 0,06 a 4,45 respectivamente, los valores más bajos se correspondieron a las muestras de suelo para ambos sitios.

Además, se analizaron las diferencias en la composición de OTUs/ASVs dentro y entre sustratos para cada sitio, utilizando el test de Análisis de Similaridades (ANOSIM). Las muestras de nieve y hielo del glaciar Castaño Overa, no mostraron diferencias entre sí por lo que fueron analizadas en conjunto ( $R=0,1$ ;  $p>0,05$ ). Los resultados obtenidos mostraron la misma tendencia para los tres sitios, donde las diferencias de las comunidades fúngicas entre los sustratos fueron mayores a las diferencias encontradas dentro de cada sustrato (CO:  $R=0,898$ ; VN:  $R=0,77$ ; RCO:  $R=1$ ;  $p<0,05$ ) (Fig. 3.1).

**Figura 3.1: Boxplot resultado del test ANOSIM realizado sobre los OTUs/ASVs de cada sustrato**

Las distancias se calcularon utilizando la matriz de distancia de Bray-Curtis ( $p < 0,05$ ).

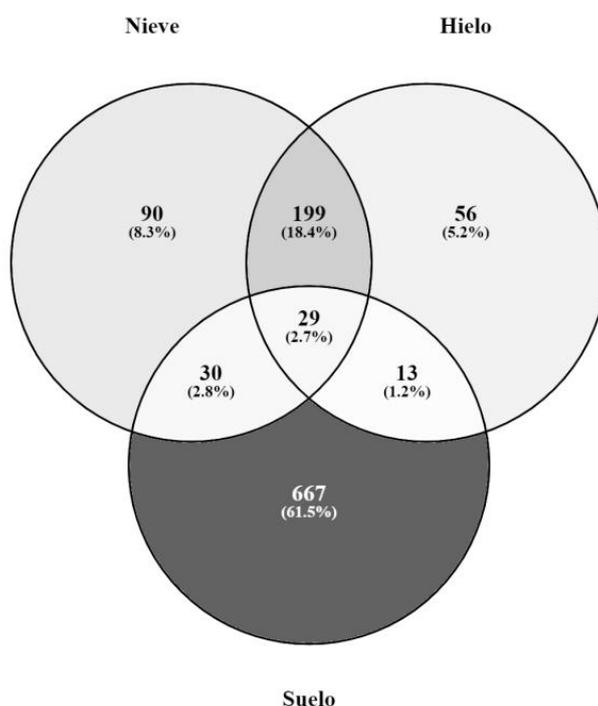


## 3.3.3 ESTRUCTURA DE CADA SITIO DE MUESTREO

*GLACIAR CASTAÑO OVERA*

Para las muestras obtenidas en el glaciar Castaño Overa (suelo desnudo, hielo, nieve) se obtuvieron 1081 OTUs en total, que pudieron ser clasificados en 8 phyla, 24 clases, 44 ordenes y 163 familias de hongos; 4% de esos OTUs no pudieron ser clasificados dentro de ningún taxón. A un esfuerzo de muestreo común (9296 secuencias) la riqueza del suelo fue mayor que la riqueza obtenida para las muestras de hielo y nieve. Aún así, el mayor número de secuencias se obtuvo de las muestras de hielo y nieve. Al analizar los OTUs compartidos entre el suelo, el hielo y la nieve, se observó que estos no superan el 2,7% del total, este porcentaje estuvo representado por 14 clases (Figura 3.2). Los OTUs únicos sobre el total de OTUs para cada sustrato fueron: 90% para el suelo, 18,8% para el hielo y 25,9% para la nieve.

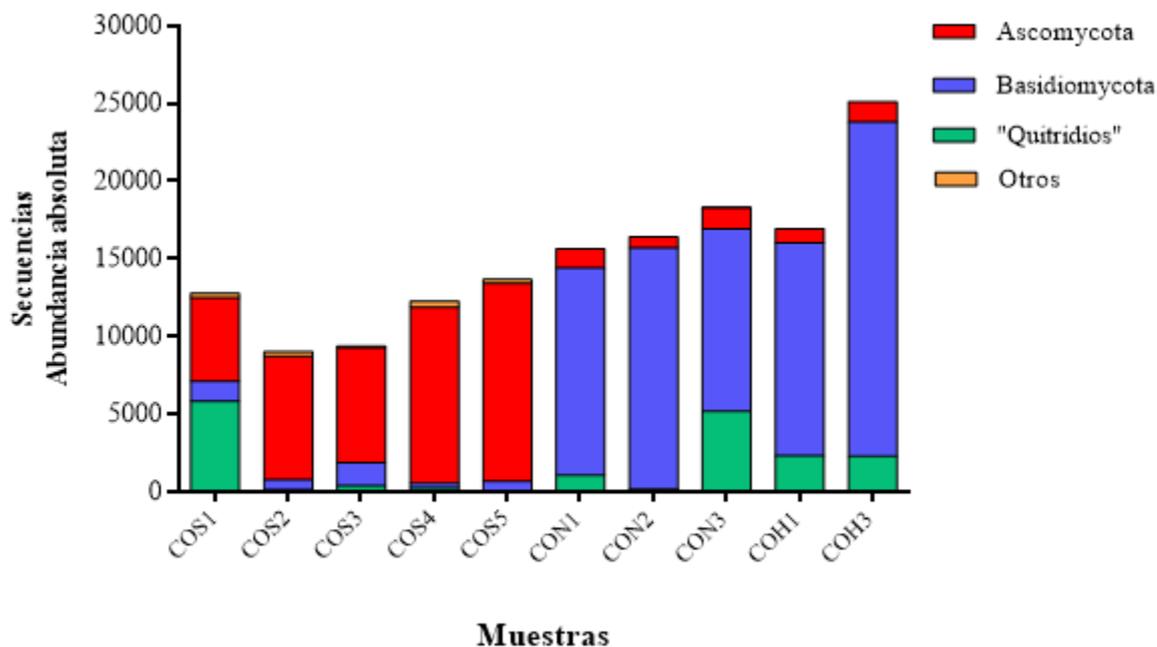
**Figura 3.2: Diagrama de venn de los OTUs de cada sustrato del glaciar Castaño Overa**  
Los números representan el número de OTUs para cada grupo y subgrupo dentro de cada sustrato, los valores entre paréntesis es el porcentaje sobre el total de OTUs obtenidos.



El taxón Dikarya fue el más abundante para todos los sustratos, tanto en el número de secuencias (87,14%) como en el de OTUs (918 de 1081). La abundancia de los grupos filogenéticos obtenidos, comparando los sustratos, mostró que el phylum Ascomycota dominó

en las muestras de suelo, mientras que el phylum Basidiomycota fue el más frecuente en las muestras de hielo y nieve (Figura 3.3).

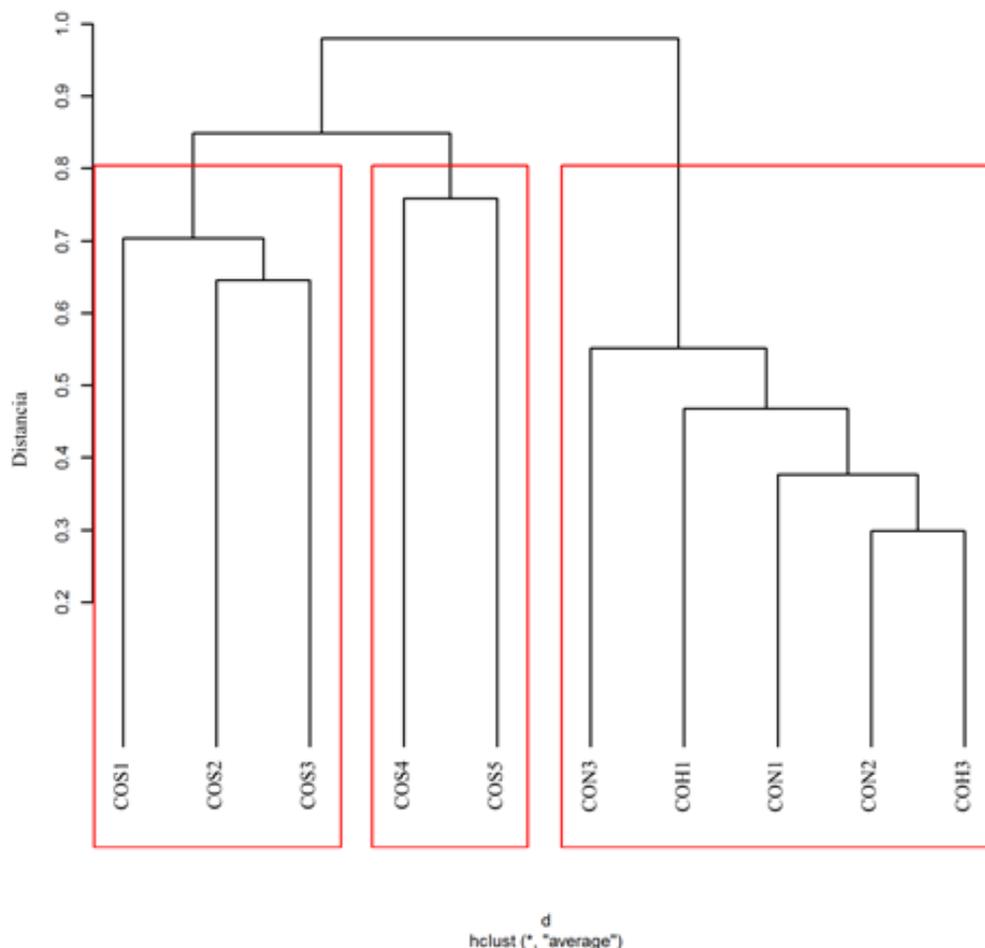
**Figura 3.3: Abundancia absoluta de las secuencias obtenidas para las muestras del glaciar Castaño Overa**



Las muestras fueron agrupadas utilizando los OTUs obtenidos, mediante el índice de disimilaridad de Bray-Curtis, los resultados permitieron obtener tres grupos principales: dos conformadas por muestras de suelo, un grupo (grupo 1) con las muestras COS1, COS2 y COS3 (Ladera noreste a 187 mts del refugio Otto Meiling), el segundo grupo (grupo 2) compuesto con las muestras de suelo restantes COS4 y COS5 (ladera sudoeste); y el tercer grupo (grupo 3) compuesto por todas las muestras de hielo y nieve (Figura 3.4).

**Figura. 3.4. Dendrograma que representa la similitud en la composición de OTUs fúngicos en las muestras de suelo, hielo y nieve del glaciar Castaño Overa**

La similitud entre clusters esta dada por la longitud de los brazos. La agrupación fue basada en la matriz de distancia de Bray-Curtis.



Al analizar las muestras de suelo se lograron identificar 23 clases, de las cuales, 15 estuvieron presentes en todas las muestras; dentro de estas, Leotiomycetes (Ascomycota) fue la clase mayoritaria (abundancias relativas de 11 al 42%), seguida por Sordariomycetes (5,3 al 39%), Dothideomycetes (1,8 al 19%) y Eurotiomycetes (5 al 18,5%). La muestra de suelo 1 (COS1, Tabla 2.1) mostró la mayor proporción de Chytridiomycetes, donde el 45% de los OTUs obtenidos para esta muestra estuvieron relacionados a esta clase.

En las muestras de hielo y nieve, fueron identificadas 13 clases en total; siendo Microbotryomycetes el grupo predominante, esta clase fue la más abundante y estuvo presente en todas las muestras, variando entre un 63 a un 94%, seguido por la clase Monoblepharidomycetes que estuvo presente en las 5 muestras y su abundancia varió entre 0,5 al 26% (Figura 3.2). De las 13 clases identificadas 9 estuvieron presentes en todas las muestras de hielo, y 3 estuvieron presentes en una sola muestra (Malasseziomycetes, Arthoniomycetes,

Glomeromycetes). La clase Malasseziomycetes fue encontrada solamente en la muestra 1 (COH1) en una proporción del 0,01%, Arthoniomycetes sólo estuvo presente en la muestra 2 (COH2) en una proporción del 0,02% y Glomeromycetes en la muestra 3 (COH3) con una proporción del 0,12%.

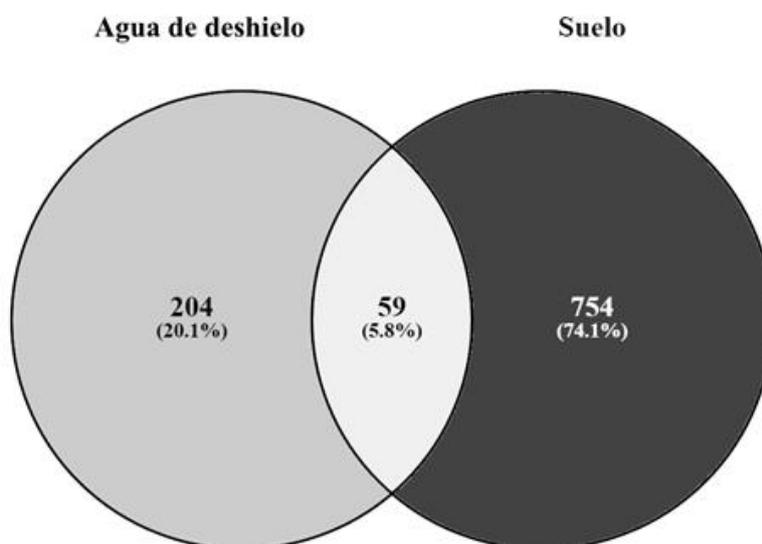
Los órdenes de ascomycetes más abundantes tanto en suelo como hielo/nieve, fueron Helotiales y Capnodiales, respectivamente; mientras Sebaciniales y Leucosporidiales fueron los órdenes de basidiomycetes más abundantes. También se encontraron miembros de Chytridiomycetes y Monoblepharidomycetes, con una alta proporción de Spizellomycetales en suelo y Monoblepharidales en hielo y nieve. Los OTUs identificados a nivel de especie (con un ID >97%) fueron un total 202 de 1081 OTUs, las especies identificadas más relevantes para cada muestra se detallan en la Tabla 3.4.

### *RÍO CASTAÑO OVERA*

En las muestras asociadas al río Castaño Overa se obtuvieron 1017 ASVs fúngicos en total, que fueron clasificados dentro de 7 phyla, 29 clases, 79 órdenes y 132 familias de hongos, 1,15% de esos ASVs no pudieron ser clasificados dentro de ningún taxón inferior a Reino. Las muestras de suelo y agua compartieron 59 ASVs (5,8%) (Fig 3.5).

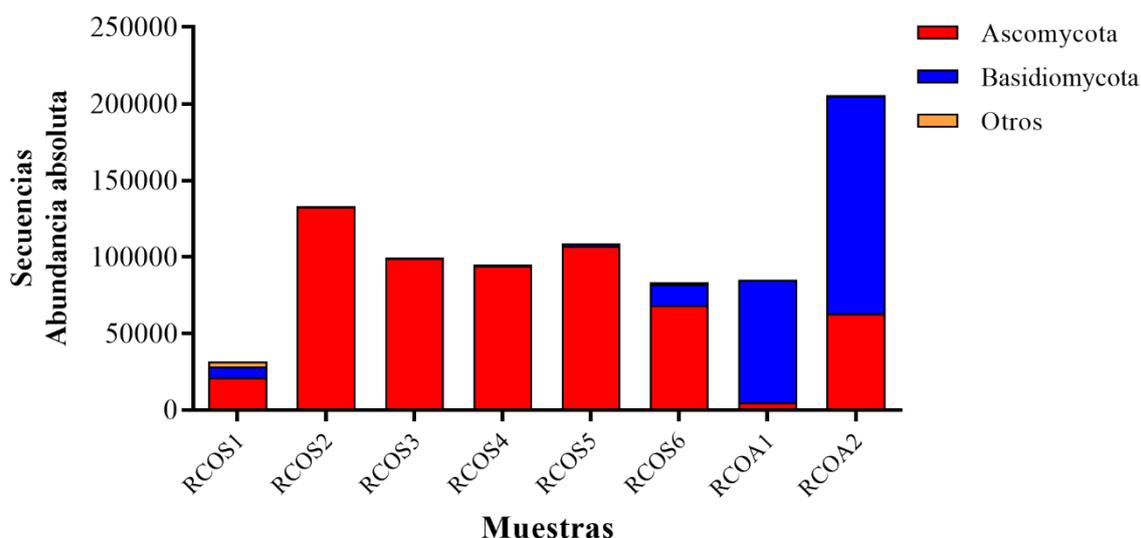
#### **Figura 3.5: Diagrama de venn de los ASVs de cada sustrato del río Castaño Overa**

Los números corresponden a valores de ASVs para cada sustrato y el valor compartido entre sustratos; los valores entre paréntesis representan el porcentaje sobre el total de ASVs obtenidos.



A un esfuerzo de muestreo común (85275 secuencias) la riqueza del suelo fue mayor que la riqueza obtenida en las muestras de agua. Aun así, una muestra de agua (RCOA2) mostró el mayor número de secuencias (24,2% del total de secuencias). El taxón Dikarya fue el más abundante para todos los sustratos, tanto en el número de secuencias (98,2%) como en el de ASVs (906 de 1017). Las secuencias pertenecientes al phylum Ascomycota dominaron en el suelo mientras que Basidiomycota fue más frecuente en el agua (Figura 3.6). Los ASVs únicos sobre el total de ASVs para cada sustrato fueron: 93,9% para el suelo y 77% para el agua.

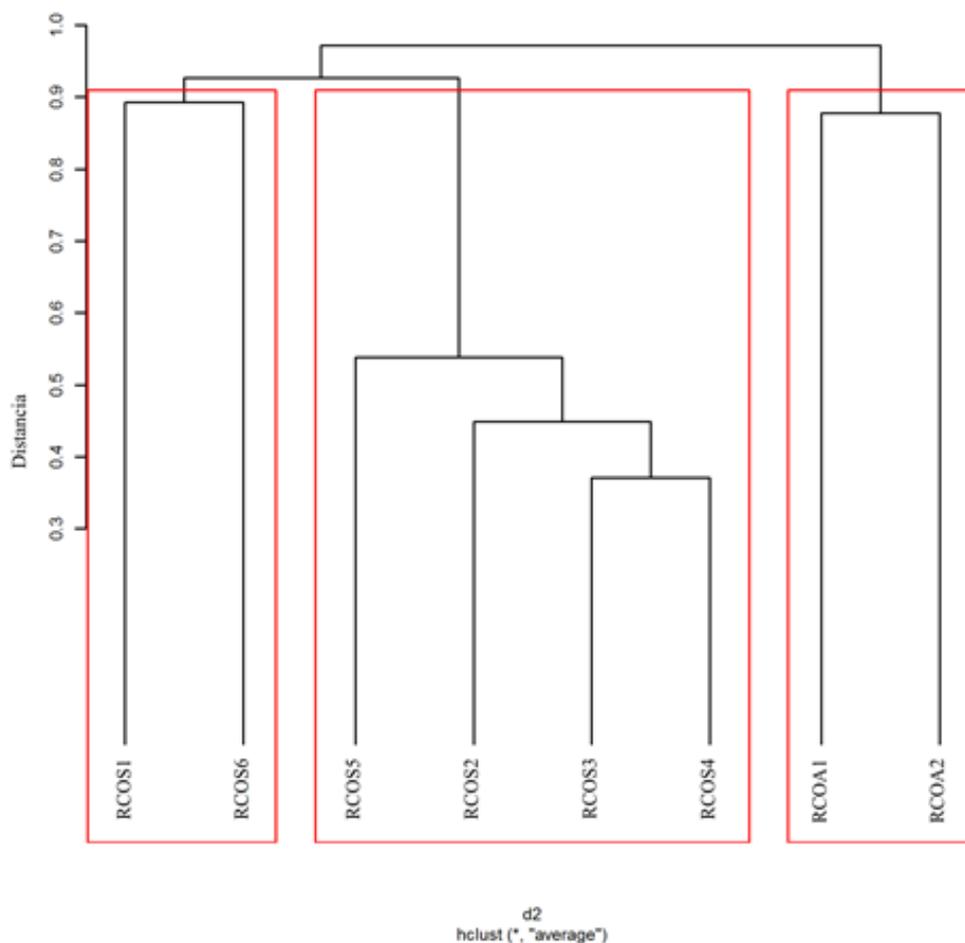
**Figura 3.6: Abundancia absolutas de las secuencias obtenidas para las muestras del Río de deshielo de Castaño Overa (RCO)**



Al analizar las muestras utilizando el índice de disimilaridad de Bray-Curtis a partir de los ASVs obtenidos, se observaron tres principales grupos: dos conformado por muestras de suelo (grupo 1 y 2) y el tercero conformado únicamente por las muestras de agua (grupo 3). Los grupos formados por las muestras de suelo estuvieron conformados uno con 2 muestras, la primera muestra obtenida en la zona alta del río Castaño Overa (RCOS1) y la muestra número 6 obtenida en la parte baja del río (RCOS6), el segundo grupo conformado por las muestras de suelo restantes RCOS2, RCOS3, RCOS4, RCOS5 (Figura 3.7).

**Figura. 3.7: Dendrograma que representa la similitud en la composición de ASVs fúngicos en las muestras de suelo y agua de deshielo del río Castaño Overa**

La similitud entre clusters esta dada por la longitud de los brazos. La agrupación fue basada en la matriz de distancia de Bray-Curtis.



De las muestras de suelo se identificaron 35 grupos: uno a nivel de reino fungi (0,002 a 10,8% abundancia relativa), 5 grupos que llegaron a nivel de phylum; Ascomycota (5 muestras, de 0,02 a 10,88%), Basidiomycota (5 muestras, de 0,028 a 0,67%), Chytridiomycota (4 muestras, de 0,003 a 4,67%), Mucoromycota (1 muestra, con 0,035% de las secuencias) y Rozellomycota (5 muestras, de 0,003 a 0,15% de las secuencias) y 29 grupos que se identificaron por lo menos a nivel de clase. Sordariomycetes fue la clase mayoritaria (abundancias relativas del 13,7 al 99,5%) seguida por Leotiomycetes (0,27 al 29,7%) y Dothideomycetes (0,29 al 23%). En cuatro (RCOS2, RCOS3, RCOS4 y RCOS5) de las 6 muestras de suelo obtenidas se observó una marcada dominancia por parte del orden Hypocreales, donde la abundancia relativa de este grupo varió de 99,5% al 96,6% de las secuencias.

En las muestras de agua se lograron identificar 19 grupos taxonómicos, 4 grupos a los que se llegó a nivel de phylum Ascomycota (muestra RCOA2, 0,44%), Basidiomycota (muestra RCOA2, 0,26%) y Rozellomycota (muestra RCOA2, 0,02%) y un cuarto grupo a nivel de reino fungi (0,12 y 0,46%), los restantes grupos taxonómicos (15) fueron identificados al menos hasta el nivel de clase. Las clases predominantes fueron Microbotryomycetes (89,8 a 63,7%) y Leotiomyces (3,5 a 15%).

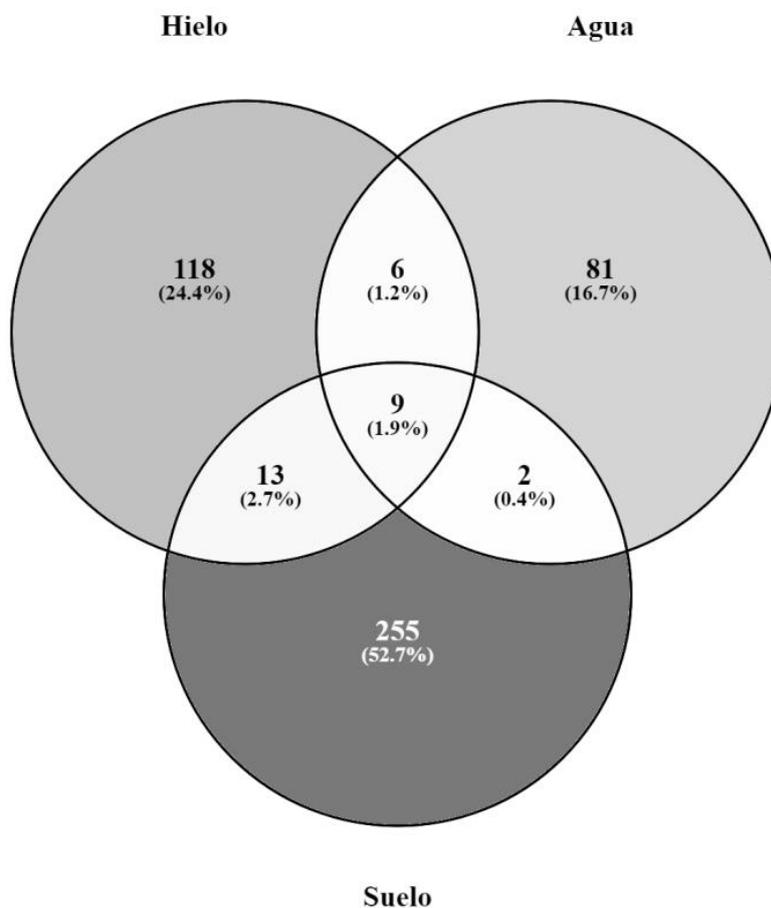
Los órdenes ascomycetes más abundantes para cada sustrato, fueron Hypocreales para suelo y Helotiales para el agua, los órdenes de basidiomycetes más abundantes para suelo fueron Tremellales, y para agua fueron Kriegeriales y Leucosporidiales. Sin embargo, en las muestras de agua, el grupo predominante fue identificado sólo hasta el nivel de clase, la que correspondió a la clase Microbotryomycetes. Los ASVs identificados a nivel de especie, con un ID >97%, fueron 416 de un total de 1017, las especies identificadas más relevantes para cada muestra se detallan en la Tabla 3.4.

#### *GLACIAR VENTISQUERO NEGRO*

Para las muestras pertenecientes al sistema asociado al glaciar Ventisquero Negro, se obtuvieron 484 ASVs fúngicos en total, que fueron clasificados dentro de 4 phyla, 18 clases, 49 ordenes y 90 familias de hongos, 4,49% de esos ASVs no pudieron ser clasificados dentro de ningún taxón por debajo de la categoría reino. Los ASVs compartidos entre sustratos (suelo, hielo y agua) fueron 9 (1,9%). El suelo y el hielo compartieron 13 ASVs, mientras que el hielo y el agua compartieron solo 6 (Figura 3.8). Los ASVs únicos, sobre el total de ASVs, para cada sustrato fueron: 91% para el suelo, 80,8% para el hielo y 82% para el agua.

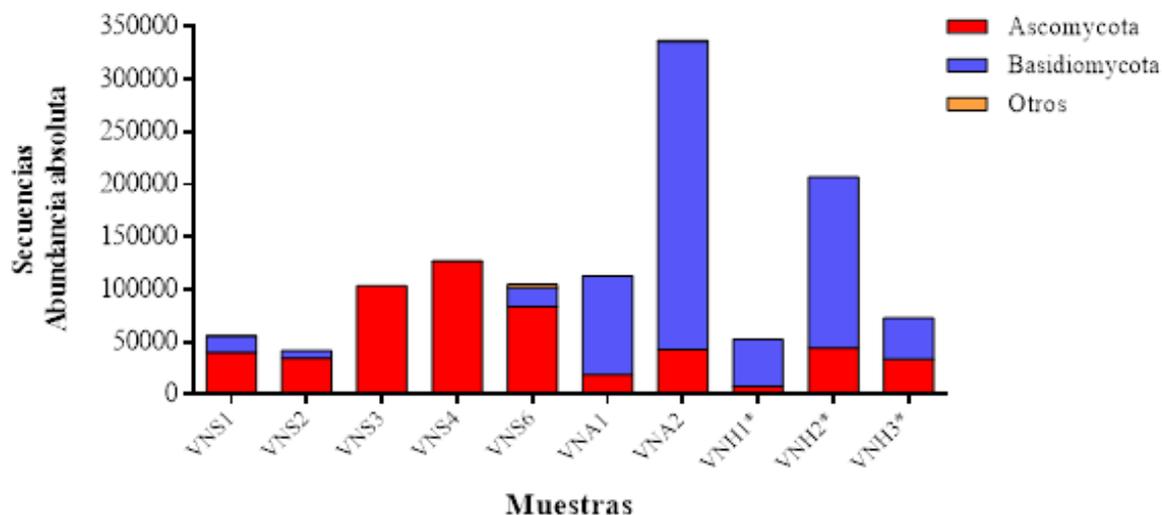
**Figura 3.8: Diagrama de venn de los ASVs de cada sustrato del glaciar Ventisquero Negro**

Los números corresponden a valores de ASVs para cada sustrato y los valores compartidos entre sustratos; los valores entre paréntesis representan el porcentaje sobre el total de ASVs obtenidos.



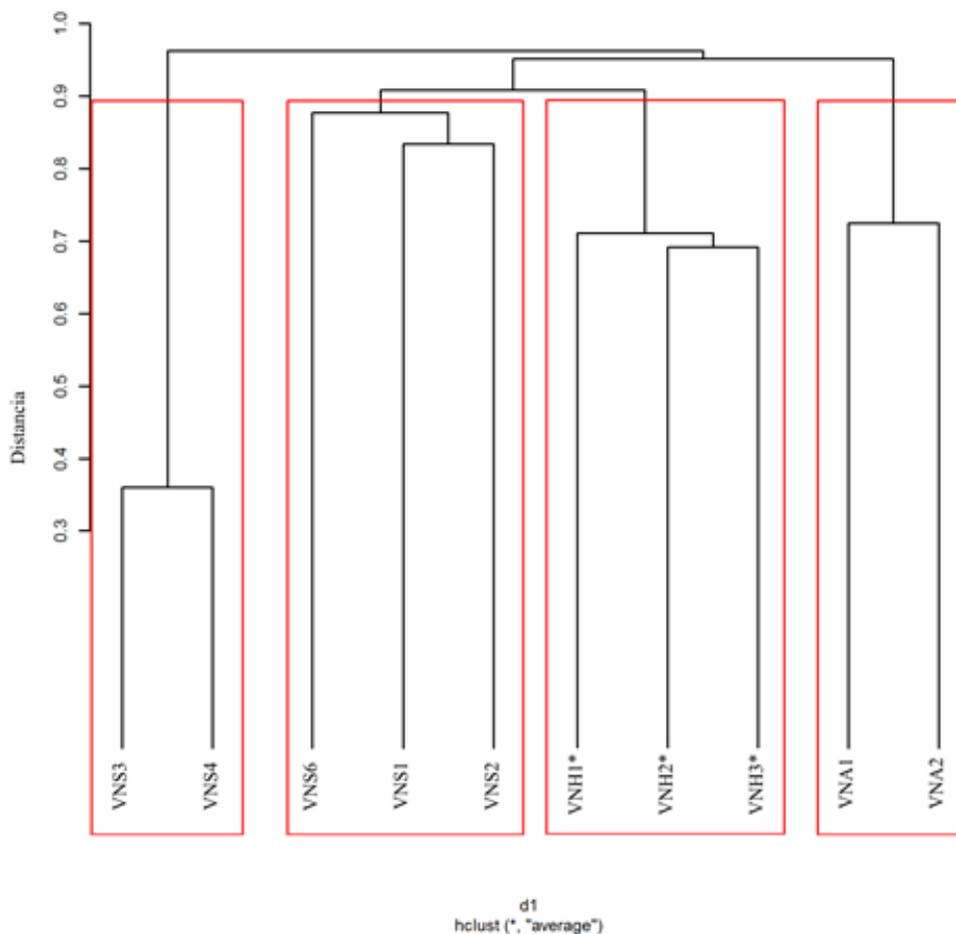
A un esfuerzo de muestreo común (43831 secuencias) la riqueza del suelo fue mayor que las muestras de hielo y agua. Aún así, una muestra de hielo y otra de agua mostraron el mayor número de secuencias. El taxón *Dikarya* fue el más abundante para todos los sustratos, tanto en el número de secuencias (99,5%) como en el de ASVs (455 de 484). Comparando los taxones obtenidos, las secuencias pertenecientes al phylum Ascomycota dominaron en el suelo, mientras que las secuencias del phylum Basidiomycota fueron más frecuente en el hielo y el agua (Figura 3.9).

**Figura 3.9: Abundancia absoluta de las secuencias obtenidas para las muestras del glaciar Ventisquero Negro (VN)**



Al analizar las muestras utilizando el índice de disimilaridad de Bray-Curtis a partir de los ASVs obtenidos, se obtuvieron cuatro grupos: dos grupos conformados por muestras de suelo (grupo 1 y 2), y los dos restantes se conformaron por todas las muestras de hielo (VNH1\*, VNH2\* y VNH3\*) y otro por todas las muestras de agua (grupo 3 y 4 respectivamente). Los grupos con las muestras de suelo fueron, el grupo 1 con dominancia de Sordariomycetes formado por la muestra de suelo más cercana al glaciar (VNS3) y la muestra más alejada al glaciar (VNS4), y el grupo 2 conformado por las muestras restantes de suelo (VNS1, VNS2, VNS6) (Figura 3.10).

**Figura. 3.10: Dendrograma que representa la similitud en la composición de ASVs fúngicos en las muestras de suelo, hielo y agua de deshielo del glaciar Ventisquero Negro**  
La similitud entre clusters esta dada por la longitud de los brazos. La agrupación fue basada en la matriz de distancia de Bray-Curtis.



En las muestras de suelo se identificaron 13 grandes grupos taxonómicos, uno que llegó a la categoría Fungi (2,09%), dos grupos que llegaron a nivel de *phylum*, Ascomycota (2,41%) y Chytridiomycota (0,10%), y los 10 grupos restantes pudieron ser identificados a nivel de clase o menor nivel taxonómico. La clase Sordariomycetes fue la mayoritaria (abundancias relativas del 16 al 99,4%) seguida por Dothideomycetes (abundancias relativas de 0,1 al 38,5%), Leotiomycetes (abundancias relativas de 0,08 al 28,3%) y Agaricomycetes (abundancias relativas de 0,09 al 18%). De todas las muestras de suelo, las muestras VNS3 y VNS4 presentaron una marcada dominancia por parte de la especie *Purpureocillium lilacinum* (Hypocreales, Sordariomycetes), con 1,44 y 2,06% de los ASVs de cada muestra y un total de secuencias del 99,3 y 99,1% respectivamente.

En las muestras de hielo se lograron identificar 11 grupos taxonómicos, uno a nivel de reino Fungi (abundancias relativas del 0,02 al 1,6%) y otro a nivel de *phylum* Ascomycota (0,39 y

0,49%), los otros 9 grupos fueron identificados al menos a nivel de clase. En todas las muestras de hielo las clases predominantes fueron Tremellomycetes (abundancias relativas del 40 a 65%) y Microbotryomycetes (abundancias relativas de 11,5 a 24%). En las muestras de hielo VNH1\* y VNH3\* se encontraron secuencias de hongos pertenecientes a Sordariomycetes (1,5% y 13,8% respectivamente) representada por el 7,24 al 13,5% de ASVs.

Para las muestras de agua se lograron identificar 16 grupos, uno a nivel de reino Fungi (0,6% de las secuencias), 3 grupos a nivel de phylum Ascomycota (0,27 y 5,23% de las secuencias), Basidiomycota (0,001% de las secuencias) y Chytridiomycota (0,21 y 0,38% de las secuencias) representaron el 11,2% de ASVs obtenidos y 11 grupos que pudieron ser identificados a nivel de clases o menor taxón.

En las muestras de agua (VNA1 y VNA2) la clase Microbotryomycetes fue la más abundante (80 y 84,4% de las secuencias obtenidas) con 9.8 y 35.29% de los ASVs respectivamente, seguida por Leotiomycetes (9,4 y 3,6% de las secuencias obtenidas) con 26 ASVs en total. La muestra VNA2 fue la que agrupó el mayor porcentaje de secuencias del phylum Ascomycota sin identificar (5,2%). Los órdenes ascomycetes más abundantes para cada sustrato, fueron Hypocreales para suelo y Helotiales para el hielo y el agua, mientras que Agaricales, Filobasidiales y Leucosporidiales fueron los órdenes de basidiomycetes más abundantes para los 3 sustratos respectivamente. En las muestras de agua, el grupo predominante logró ser identificado sólo hasta el nivel de clase perteneciendo a Microbotryomycetes. Los ASVs identificados a nivel de especie, fueron 104 del total de 484, las especies identificadas más relevantes para cada muestra se detallan en la Tabla 3.4

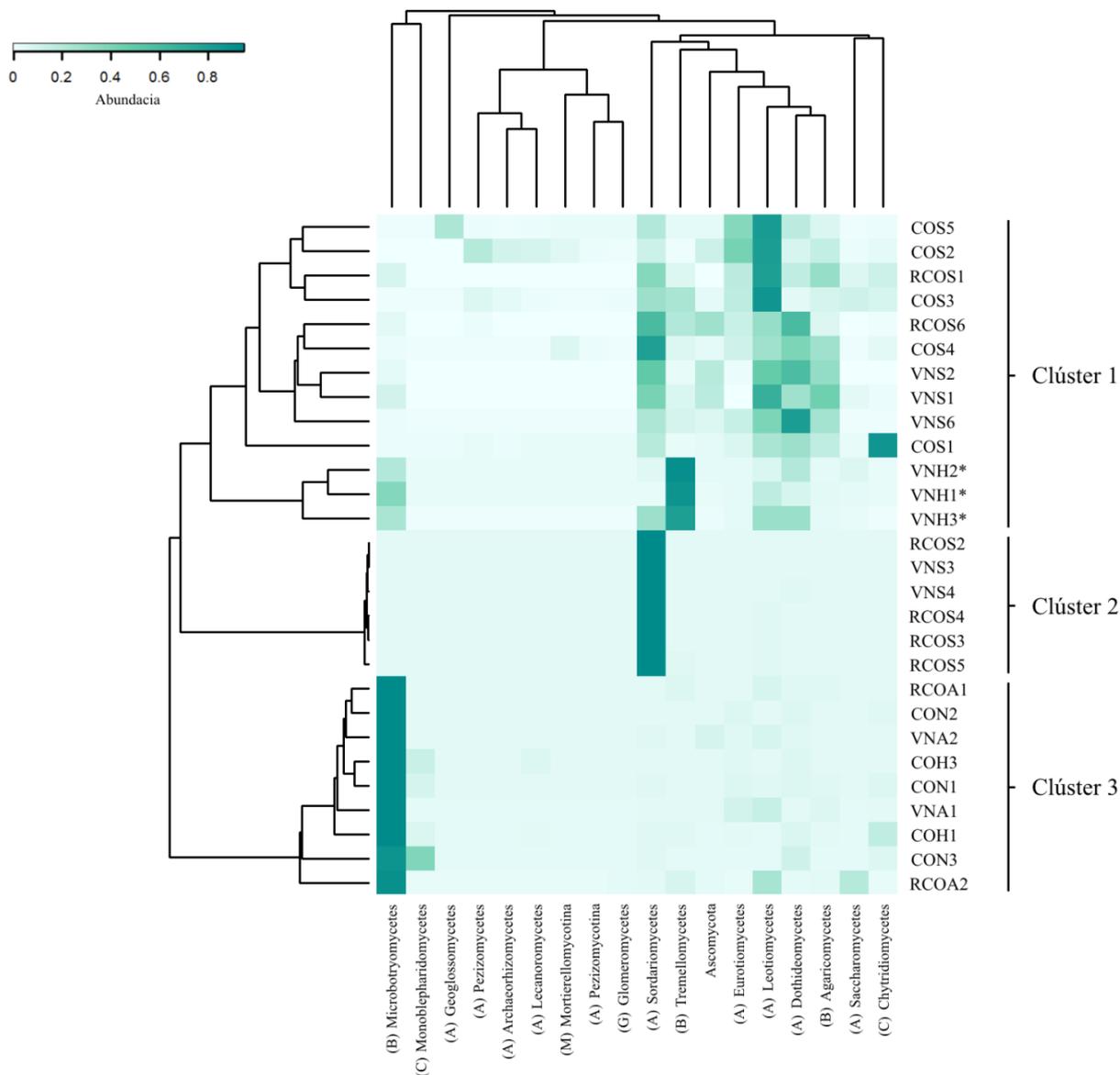
#### *3.3.4 SISTEMA DE ESTUDIO DEL MONTE TRONADOR*

Los análisis basados en la matriz de distancia de Bray-Curtis mostraron una agrupación diferencial de órdenes para todos los sitios de muestreo y sustratos. Todas las muestras de suelo que presentaron un  $H > 3$ , se agrupan en un mismo clúster junto con las muestras de hielo del Ventisquero Negro, este clúster lo denominamos cluster 1 y se vio dominado por secuencias de las clases Leotiomycetes y Dothideomycetes y Sordariomycetes, en el caso del hielo del Ventisquero Negro la clase dominante fue Tremellomycetes (Basidiomycota). Las muestras de suelo que presentaron baja diversidad se agruparon juntas (cluster 2), se puede observar claramente que estas muestras están dominadas por secuencias de la clase Sordariomycetes. Como se observa para el cluster 1 y 2 todas las muestras de suelo presentaron dominancia del phylum Ascomycetes. Finalmente, todas las muestras de agua del Ventisquero Negro y del Río

del Castaño Overa, y las muestras de nieve y hielo del Castaño Overa se agruparon en el cluster 3 dominado por la clase Microbotryomycetes (phylum Basidiomycota) (Figura 3.11).

**Figura 3.11: Heatmap de las clases más representativas presentes en todos los sitios de muestreo**

La agrupación fue basada en la matriz de distancia de Bray-Curtis. Las letras entre paréntesis indican el phylum al que pertenece la clase; A: Ascomycota, B: Basidiomycota, C: Chytridiomycota, G: Glomeromycota, M: Mucoromycota.



Los órdenes y géneros más abundantes y representativos para todas las muestras, se pueden observar en la Tabla 3.3. Las abundancias relativas de cada taxón, varían entre los sitios de muestreo, pero tienden a mostrar a los mismos órdenes entre los más abundantes. De la misma manera los géneros suelen repetirse en los diferentes sitios.

**Tabla 3.3: Órdenes más abundantes para todos los sitios y los géneros más representativos**

\* Representan secuencias no identificadas a nivel de género

- Representa la ausencia de secuencias del taxón

Los géneros que están presentes en más de un sitio de muestreo están señalados con negrita

| Phyllum                     | Orden             | Secuencias (%) |      |      | Géneros más abundantes por sitio                    |  |   |
|-----------------------------|-------------------|----------------|------|------|---|--|---|
|                             |                   | CO             | RCO  | VN   | CO  | RCO  | VN  |
| <b>Monoblepharidomycota</b> | Monoblepharidales | 5,5            | 0    | 0    | <i>Hyaloraphidium</i> ,<br><i>Gonapodya</i>         | -  | -   |
| <b>Chytridiomycota</b>      | Rhizophydiales    | 1,91           | 0,1  | 0    | <b><i>Rhizophydium</i></b>                          | <b><i>Rhizophydium</i></b>   | -   |
| <b>Ascomycota</b>           | Helotiales        | 10,2           | 6,6  | 6,7  | <i>Claussenomyces</i> ,<br><i>Rhizoscyphus</i>      | <b><i>Cadophora</i></b> ,<br><i>Tetracladium</i>                                 | <b><i>Cadophora</i></b> ,<br><i>Gyoerffyyella</i>                                   |
|                             | Hypocreales       | 4,54           | 53,1 | 20,4 | <b><i>Fusarium</i></b> ,<br><b><i>Giberella</i></b> | <b><i>Fusarium</i></b> ,<br><b><i>Purpureocillium</i></b> ,<br><i>Neonectria</i> | <b><i>Gibberella</i></b> ,<br><i>Ilyonectria</i> ,<br><b><i>Purpureocillium</i></b> |
|                             | Sordariales       | 0,92           | 0,04 | 0,95 | <i>Podospora</i> ,<br><i>Trichocladium</i>          | <i>Humicola</i>  | <i>Ramophialophora</i> ,<br><i>Zopfiella</i>  |
|                             | Chaetothyriales   | 2,12           | 0,1  | 0,9  | <i>Capronia</i> ,<br><i>Phialophora</i>             | <i>Cladophialophora</i>  | <i>Exophiala</i>  |
|                             | Eurotiales        | 2,06           | 0,5  | 0,5  | <b><i>Penicillium</i></b>                           | <b><i>Penicillium</i></b>  | <b><i>Penicillium</i></b> ,<br><i>Talaromyces</i>                                   |
|                             | Venturiales       | 2,2            | 0,8  | 0,1  | <i>Protoventuria</i> ,<br><b><i>Venturia</i></b>    | <i>Fusicladium</i> ,<br><b><i>Venturia</i></b>                                   | <b><i>Venturia</i></b>  |
|                             | Dothideales       | 0,1            | 0,1  | 0,6  | <b><i>Hormonema</i></b>                             | <i>Kabatiella</i>  | <i>Aureobasidium</i> ,<br><b><i>Hormonema</i></b>                                   |
|                             | Pleosporales      | 2,4            | 1,3  | 6,4  | <i>Massarina</i> ,<br><i>Preussia</i>               | <b><i>Alternaria</i></b> ,<br><i>Plenodomus</i>                                  | <b><i>Alternaria</i></b> ,<br><i>Epicoccum</i>                                      |
|                             | Saccharomycetales | 0,5            | 3,2  | 0,5  | <b><i>Candida</i></b>                               | <b><i>Candida</i></b> ,<br><i>Geotrichum</i>                                     | <i>Dipodascus</i> ,<br><i>Debaryomyces</i>  |
| <b>Basidiomycota</b>        | Microbotromycetes | 37,6           | 14,2 | 27,7 | *   | *  | *   |
|                             | Leucosporidiales  | 10,6           | 3,8  | 2,8  | <b><i>Leucosporidium</i></b>                        | <b><i>Leucosporidium</i></b>   | <b><i>Leucosporidium</i></b>  |
|                             | Sporidiobolales   | 0,1            | 1,6  | 2,5  | <b><i>Rhodotorula</i></b> ,<br><i>Sampaiozyma</i>   | <i>Rhodosporidiobolus</i> ,<br><b><i>Rhodotorula</i></b>                         | <b><i>Rhodotorula</i></b>   |
|                             | Kriegeriales      | 1,4            | 4,1  | 0,2  | <i>Kriegeria</i>                                    | <b><i>Phenoliferia</i></b>   | <b><i>Phenoliferia</i></b>  |
|                             | Filobasidiales    | 0,1            | 1,1  | 13,7 | <b><i>Naganishia</i></b> ,<br><i>Solicoccozyma</i>  | <b><i>Naganishia</i></b> ,<br><i>Piskurozyma</i>                                 | <b><i>Naganishia</i></b>  |
|                             | Agaricales        | 0,75           | 0,4  | 1,2  | <i>Flammula</i> ,<br><b><i>Inocybe</i></b>          | <b><i>Cortinarius</i></b> ,<br><b><i>Inocybe</i></b>                             | <i>Coprinellus</i> ,<br><b><i>Cortinarius</i></b>                                   |

La abundancia de OTUS/ASVs identificados a nivel de especies variaron de muestra en muestra (Figura 3.4), aun así, hubo especies compartidas dentro de cada sustrato. Para el suelo del Castaño Overa, las especies más frecuentes fueron *Claussenomyces* sp. y *Rhizoscyphus ericae*, en el hielo y la nieve las especies más frecuentes fueron *Leucosporidium fragarium* y *Leucosporidium intermedium*. Para el suelo del río Castaño Overa la especie que mostró ser la más abundante y dominó en la mayoría de las muestras (4 de 6) fue *Purpureocillium lilacinum*, por otro lado, en el suelo circundante al glaciar Ventisquero Negro, además de *P. lilacinum*, las especies *Gyoerffyyella* sp. y *Mycosphaerella tassiana*, fueron las más frecuentes. En el hielo proveniente de este glaciar, las especies *Rhodotorula mucilaginosa*, *Naganishia friedmannii*, *Naganishia albida* y *Cutaneotrichosporon moniliforme* estuvieron presentes en más de una

muestra, mientras que en el agua la especie *Exophiala xenobiotica* estuvo presente en las dos muestras analizadas.

**Tabla 3.4: Especies más abundantes para cada sitio y sustrato**

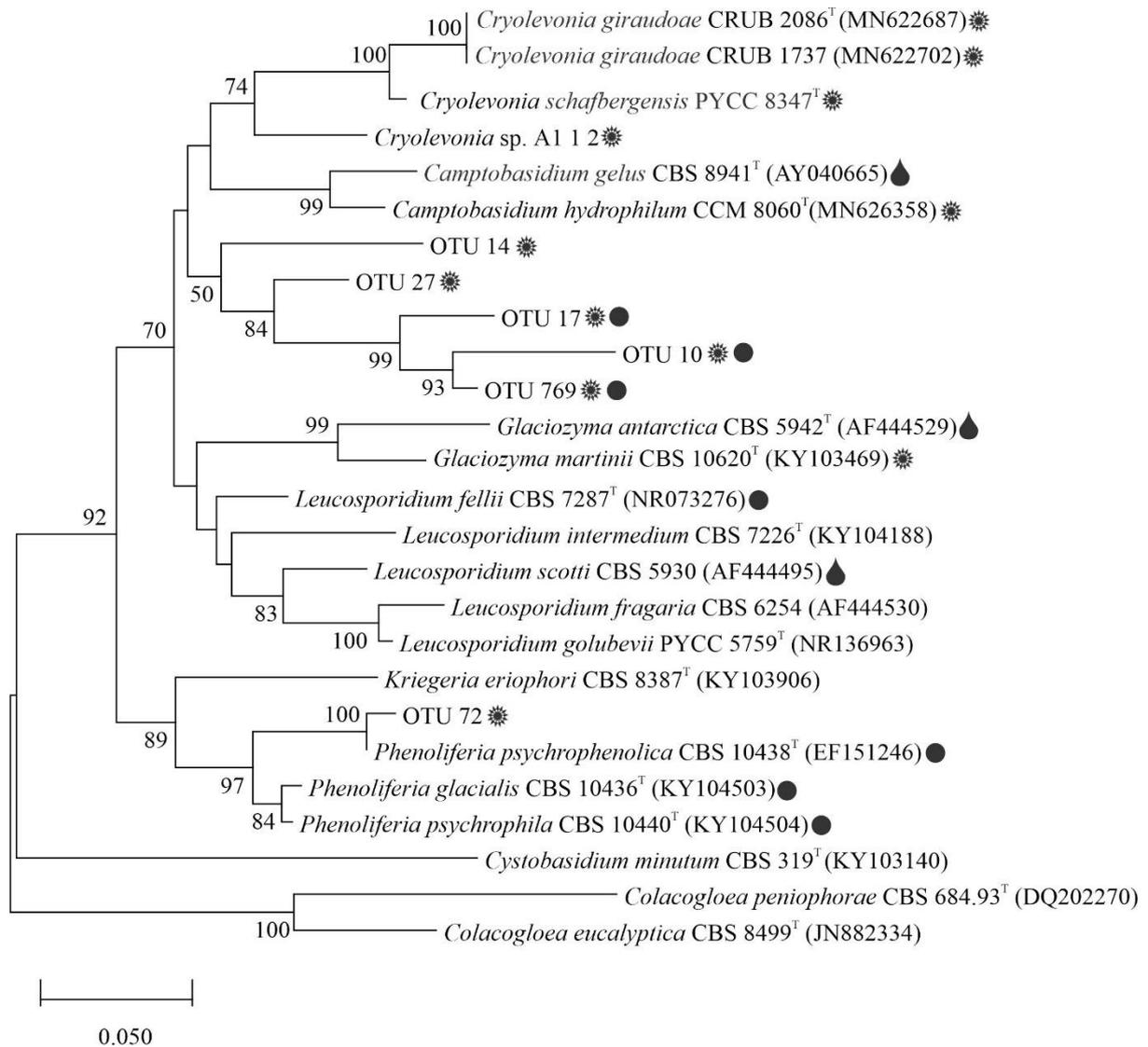
| Zona                  | Sustrato      | Muestra                          | Reads                             | Especies                          |                                 |
|-----------------------|---------------|----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|---------------------------------|
| Glaciar Castaño Overa | Suelo desnudo | COS1                             | 3289                              | <i>Powellomyces</i> sp.           |                                 |
|                       |               |                                  | 1818                              | <i>Rhizophydium haynaldii</i>     |                                 |
|                       |               |                                  | 1461                              | <i>Venturia hystrioides</i>       |                                 |
|                       |               |                                  | 869                               | <i>Cordyceps bassiana</i>         |                                 |
|                       |               |                                  | 1237                              | <i>Capronia</i> sp.               |                                 |
|                       |               | COS2                             | 1019                              | <i>Claussenomyces</i> sp.         |                                 |
|                       |               |                                  | 631                               | <i>Phialocephala helvetica</i>    |                                 |
|                       |               |                                  | 2320                              | <i>Claussenomyces</i> sp.         |                                 |
|                       |               | COS3                             | 1037                              | <i>Rhizoscyphus ericae</i>        |                                 |
|                       |               |                                  | 609                               | <i>Sporendocladia foliicola</i>   |                                 |
|                       |               | COS4                             | 2211                              | <i>Fusarium avenaceum</i>         |                                 |
|                       |               |                                  | 1857                              | <i>Gibberella</i> sp.             |                                 |
|                       |               |                                  | 1488                              | <i>Protoventuria alpina</i>       |                                 |
|                       |               | COS5                             | 1327                              | <i>Efibulobasidium albescens</i>  |                                 |
|                       |               |                                  | 2967                              | <i>Claussenomyces</i> sp.         |                                 |
|                       | 2026          |                                  | <i>Penicillium lividum</i>        |                                   |                                 |
|                       | 1975          |                                  | <i>Rhizoscyphus ericae</i>        |                                   |                                 |
|                       | 1025          |                                  | <i>Geoglossum fallax</i>          |                                   |                                 |
|                       | Hielo         | COH1                             | 10367                             | Microbotryomycetes                |                                 |
|                       |               |                                  | 1629                              | <i>Leucosporidium fragarium</i>   |                                 |
|                       |               | COH3                             | 506                               | <i>Leucosporidium intermedium</i> |                                 |
|                       |               |                                  | 17423                             | Microbotryomycetes                |                                 |
|                       |               |                                  | 2125                              | <i>Hyaloraphidium curvatum</i>    |                                 |
|                       |               | Nieve                            | CON1                              | 2086                              | <i>Leucosporidium fragarium</i> |
|                       |               |                                  |                                   | 8443                              | Microbotryomycetes              |
| CON2                  |               |                                  | 1913                              | <i>Leucosporidium intermedium</i> |                                 |
|                       |               |                                  | 1786                              | <i>Leucosporidium fragarium</i>   |                                 |
|                       |               |                                  | 1673                              | <i>Rhizophlyctis rosea</i>        |                                 |
| CON3                  | 10317         |                                  | Microbotryomycetes                |                                   |                                 |
|                       | 1616          |                                  | <i>Leucosporidium fragarium</i>   |                                   |                                 |
|                       | 1005          |                                  | <i>Leucosporidium intermedium</i> |                                   |                                 |
|                       | 8313          | Microbotryomycetes               |                                   |                                   |                                 |
|                       | 4435          | <i>Hyaloraphidium curvatum</i>   |                                   |                                   |                                 |
| Río Castaño Overa     | Suelo desnudo | RCOS1                            | 935                               | <i>Leucosporidium intermedium</i> |                                 |
|                       |               |                                  | 930                               | <i>Leucosporidium muscorum</i>    |                                 |
|                       |               |                                  | 2424                              | <i>Purpureocillium lilacinum</i>  |                                 |
|                       |               | RCOS2                            | 924                               | <i>Leptodontidium trabinellum</i> |                                 |
|                       |               |                                  | 676                               | <i>Rhodotorula mucilaginoso</i>   |                                 |
|                       | RCOS3         | 621                              | <i>Tomentella</i> sp.             |                                   |                                 |
|                       |               | 132313                           | <i>Purpureocillium lilacinum</i>  |                                   |                                 |
|                       |               | 37                               | <i>Candida parapsilopsis</i>      |                                   |                                 |
|                       | RCOS4         | 21                               | <i>Hypholoma australe</i>         |                                   |                                 |
|                       |               | 97813                            | <i>Purpureocillium lilacinum</i>  |                                   |                                 |
| RCOS5                 | 41            | <i>Pseudocamarosporium</i> sp.   |                                   |                                   |                                 |
|                       | 93215         | <i>Purpureocillium lilacinum</i> |                                   |                                   |                                 |
|                       |               |                                  | 105585                            | <i>Purpureocillium lilacinum</i>  |                                 |

|       |               |        |   |   |
|-------|---------------|--------|---|---|
| Agua  | RCOS6         | 917    | <i>Vishniacozyma victoriae</i>          |   |
|       |               | 266    | <i>Cladosporidium</i> sp.               |   |
|       |               | 9027   | <i>Purpureocillium lilacinum</i>        |   |
|       |               | 5225   | <i>Venturia</i> sp.                     |   |
|       |               | 2793   | <i>Penicillium</i> sp.                  |   |
|       |               | 2467   | <i>Truncatella</i> sp.                  |   |
|       | RCOA1         | 1280   | <i>Naganishia globosa</i>               |   |
|       |               | 724    | <i>Plenodomus</i> sp.                   |   |
|       |               | 610    | <i>Bisporella citrina</i>               |   |
|       | RCOA2         | 509    | <i>Vishniacozyma tephrensensis</i>      |   |
|       |               | 34317  | <i>Phenoliferia glacialis</i>           |   |
|       |               | 22045  | <i>Candida mesenterica</i>              |   |
|       |               | 16100  | <i>Leucosporidium creatinivorum</i>     |   |
|       | Suelo desnudo | VNS1   | 14183                                   | <i>Cadophora melinii</i>                |
|       |               |        | 4121                                    | <i>Gyoerffyella</i> sp.                 |
|       |               |        | 3932                                    | <i>Purpureocillium lilacinum</i>        |
|       |               | VNS2   | 3580                                    | <i>Mycosphaerella tassiana</i>          |
|       |               |        | 6253                                    | <i>Ramophialophora</i> sp.              |
|       |               |        | 6043                                    | <i>Hormonema</i> sp.                    |
| 2685  |               |        | <i>Heterosphaeria patella</i>           |   |
| VNS3  |               | 983    | <i>Purpureocillium lilacinum</i>        |   |
|       |               | 102736 | <i>Purpureocillium lilacinum</i>        |   |
| VNS4  |               | 202    | <i>Thelebolus globosus</i>              |   |
|       |               | 125934 | <i>Purpureocillium lilacinum</i>        |   |
| VNS6  |               | 584    | <i>Mycosphaerella tassiana</i>          |   |
|       |               | 27420  | <i>Alternaria alternata</i>             |   |
|       |               | 6820   | <i>Gyoerffyella</i> sp.                 |   |
|       |               | 4634   | <i>Cutaneotrichosporon moniliiforme</i> |   |
| Hielo |               | VNH1*  | 4055                                    | <i>Purpureocillium lilacinum</i>        |
|       |               |        | 22193                                   | <i>Naganishia friedmannii</i>           |
|       |               |        | 7142                                    | <i>Rhodotorula mucilaginosa</i>         |
|       |               | VNH2*  | 5612                                    | <i>Rhodotorula graminis</i>             |
|       |               |        | 4107                                    | <i>Vishniacozyma victoriae</i>          |
|       |               |        | 3063                                    | <i>Cutaneotrichosporon moniliiforme</i> |
|       |               |        | 105358                                  | <i>Naganishia friedmannii</i>           |
|       |               | VNH3*  | 16540                                   | <i>Naganishia albida</i>                |
|       |               |        | 9901                                    | <i>Rhodotorula mucilaginosa</i>         |
|       |               |        | 7376                                    | <i>Cutaneotrichosporon moniliiforme</i> |
|       |               |        | 1966                                    | <i>Naganishia friedmannii</i>           |
| 9015  |               |        | <i>Naganishia albida</i>                |   |
| Agua  |               | VNA1   | 8105                                    | <i>Ilyonectria destructans</i>          |
|       | 4150          |        | <i>Rhodotorula mucilaginosa</i>         |   |
|       | 1296          |        | <i>Leucosporidium golubevii</i>         |   |
|       | VNA2          | 2080   | <i>Mycosphaerella tassiana</i>          |   |
|       |               | 7854   | <i>Cadophora melinii</i>                |   |
|       |               | 4883   | <i>Exophiala xenobiotica</i>            |   |
| Agua  | VNA1          | 1723   | <i>Ustilentyloma graminis</i>           |   |
|       |               | 12880  | <i>Leucosporidium intermedium</i>       |   |
|       | VNA2          | 4505   | <i>Meira nashicola</i>                  |   |
|       |               | 3129   | <i>Exophiala xenobiotica</i>            |   |

Debido al gran porcentaje (63 a 94% según la muestra) y prevalencia de secuencias sin identificar de la clase Microbotryomycetes, se seleccionaron secuencias de OTUs provenientes del set de secuencias del glaciar Castaño Overa, para verificar si esos OTUs se encontraban relacionados a otros grupos de levaduras conocidos. Para esto se construyó un árbol filogenético que muestra la ubicación de los OTUs más abundantes seleccionados en Microbotryomycetes (Figura 4.8). Uno de los OTUs analizados (OTU 72) se vio relacionado con *Phenolipheria psychrophenolica*, una especie adaptada al frío que pertenece a un ecoclado psicrófilo (Gadanhó & Sampaio, 2009). Otro grupo de OTUs (17, 10, 769, 27, 23 y 28, 14) se agruparon como 2 clados dentro la familia Camptobasidiaceae junto a *Cryolevonia giraudoe*, levaduras psicrófilas aisladas de hielo glacial del glaciar Castaño Overa y hielo marino de la Antártida (de Garcia et al., 2020). En base a estos resultados consideraremos como levaduras u hongos dimórficos a las secuencias obtenidas de los datos metagenómicos, que no fueron identificadas a nivel especie dentro de la clase Microbotryomycetes.

**Figura 4.8: Ubicación filogenética de los OTUs de la clase Microbotryomycetes**

Árbol filogenético obtenido por medio de neighbour-joining (método de distancia K2P) de la región ITS, en comparación con secuencias obtenidas de bases de datos públicas. La figura muestra los sustratos de los cuales se obtuvieron secuencias o aislamientos. Copo de nieve: Hielo glaciar; Círculo: suelo o sedimentos; Gota de agua: Agua. Barra, número de sustituciones acumuladas por 100 nucleótidos.



**3.4 DISCUSIÓN**

Este trabajo representa el primer análisis metagenómico de comunidades fúngicas en suelo oligotrófico desnudo, nieve, hielo y agua de deshielo del sistema glaciar del Monte Tronador (Patagonia, Argentina). Las secuencias obtenidas para la construcción de OTUs/AVSs fueron comparables a las obtenidas por otros trabajos de metagenómica en ambientes similares y estos valores rondaron los 2 millones de secuencias (Tederso et al, 2014, Gutiérrez, et al., 2015,

Rime et al., 2016). Los OTUs/ASVs obtenidos variaron de 484 (VN) a 1017 (RCO)/1081 (CO), algo comparable a los valores máximos obtenidos para hongos en ambientes fríos similares, donde se obtuvieron valores en el rango de 900 a 2500 en suelos de la Tundra Ártica (Tedersoo et al, 2014), 298 OTUs en agua de deshielo del glaciar Jorge Montt de la Patagonia Chilena (Gutiérrez, et al., 2015) y 1611 OTUs de hongos para suelo desnudo relacionados al glaciar Damma en los Alpes Suizos (Rime et al., 2016).

Nuestros resultados mostraron que los grupos fúngicos compartidos entre los sustratos dentro de cada sitio fue minoritaria y que cada sustrato mostró diferencias entre sí con respecto a los OTUs/ASVs más representativos, sugiriendo que existe un intercambio limitado de las diferentes comunidades fúngicas, especialmente entre el suelo y los demás sustratos. Rime et al. (2016), encontró un patrón similar entre suelos bajo glaciares recientemente expuestos y el hábitat supra y subglacial, mostrando una menor capacidad de dispersión de los hongos con respecto a las bacterias del mismo ambiente. La frecuencia del OTU/ASV más abundante por sitio y sustrato varió entre el muestreo realizado en el glaciar Castaño Overa (CO), con respecto a los resultados obtenidos para el río Castaño Overa (RCO) y Ventisquero Negro (VN), esta diferencia podría explicarse, por un lado, por la altura sobre el nivel del mar donde se encuentran los puntos de muestreo. Las muestras del Castaño Overa (1872 m snm) se encuentran todas sobre las altas cumbres que se extienden por encima del límite superior del bosque (treeline o timberline), mientras que el resto de las muestras se encuentran por debajo de este límite.

Otro factor que podría aportar a estas diferencias en el suelo y hielo, son las características fisicoquímicas de cada muestra, donde la humedad total del suelo en los sitios RCO y VN fue significativamente menor (datos que se discuten en el capítulo 4), afectando tal vez la presencia de esporas y/o hifas de ciertos hongos en particular; mientras que en el caso de las muestras de hielo, las obtenidas en el glaciar de montaña Castaño Overa son completamente límpidas en contraposición con las encontradas en el glaciar de valle Ventisquero Negro, que se encuentra cubiertas de detritos (Ruiz et al., 2017). Además de estas diferencias, debe tenerse en cuenta el proceso de secuenciación, ya que en todas las muestras secuenciadas por *Illumina* (RCO y VN), la cobertura fue mayor. Aunque las plataformas y sus métodos de delinear taxones poseen diferencias (Chiarello et al., 2022), existen estudios comparativos de comunidades de hongos que sugieren que ambas tecnologías reportan comunidades similares (Glassman & Martiny, 2018; Porter & Hajibabaei, 2020).

Otra diferencia que se puede vislumbrar es la riqueza de OTUs vs riqueza de ASVs, esto puede deberse a la forma en que se construye cada una de las unidades de clasificación, siendo las

ASVs consideradas más precisas para la determinación taxonómica y al presentar menos variantes, la riqueza será comparativamente menor (Callahan et al., 2017). De todas maneras, este hecho fue tenido en cuenta y compensado con la elección de los índices seleccionados (Bray-curtis, Simpson, Chao1, que utilizan datos rarefaccionados y consideran la presencia de valores con un único elemento o *singletons*), para realizar el análisis de nuestros resultados, algo que podría disminuir la discrepancia entre las métricas de diversidad basadas en OTU y ASV (Chiarello et al., 2022).

Al estudiar la diversidad de los sitios de muestreo con 2 índices diferentes, el índice de Simpson (1-D) y el índice de Shannon, pudimos observar que para ambos las comunidades presentes en hielo, nieve y agua de los 3 sitios (CO, VN y RCO) presentan una equitatividad media a alta. Lo contrario se observa cuando se estudia la diversidad en las muestras de suelo de los sitios glaciar Ventisquero Negro y río Castaño Overa. Esto podría explicarse por el hecho que algunas de las muestras de suelo poseen una alta abundancia pertenecientes en su mayoría a un solo ASV, correspondiente a la especie *Purpureocillium lilacinum* y por lo tanto no se observa información significativa del aporte de otros grupos taxonómicos en estas muestras. Las diferencias en la composición de las comunidades de cada sustrato resultaron altamente significativas de acuerdo al análisis ANOSIM. Este análisis mostró además que la variabilidad dentro de las muestras de suelo resultó siempre mayor al resto de muestras. Cuando se compara la riqueza promedio de OTUs/ASVs de cada sustrato, se pudo observar que en el suelo fue mayor que la de los otros sustratos para los 3 muestreos. Este resultado que muestra una mayor diversidad en el suelo desnudo, podría explicarse, en parte, por el aporte de hongos que están asociados con plantas o líquenes presentes en el mismo y además a los descomponedores de vida libre (Sterflinger et al., 2012; Rime et al., 2016) asociados a la materia orgánica vegetal. Cuando comparamos las comunidades fúngicas presentes para cada sitio (dendrograma) y para todos los sitios en total (heatmap) pudimos observar que el suelo conformó dos grupos diferentes. Las diferencias entre las muestras de un mismo sitio podrían ser atribuidas a las características fisicoquímicas del suelo, que posee una mayor heterogeneidad en la composición y en la distribución de humedad y nutrientes, incluso a cortas distancias en comparación con otros tipos de sustratos (Soina & Vorobyova, 2006), y por lo tanto mayor variabilidad en la composición de las comunidades microbianas. Por otro lado, la información obtenida por medio de la matriz de distancia de Bray-Curtis, nos permitió ver la agrupación de grupos fúngicos que podría estar asociada a la altura sobre el nivel del mar de los sitios de muestreo, ya que la mayoría de las muestras por encima del timberline del suelo del Castaño Overa (1872 m snm) se semejan a las muestras de suelo del nacimiento del río Castaño Overa

(1087 m snm), mientras que las muestras del Ventisquero Negro y la base del río Castaño Overa se asocian entre sí. Además, pudimos observar un grupo externo a estas muestras mostrando mayor distancia, como es el caso del Castaño Overa, este está representado por una muestra de suelo (COS1), donde la distancia estuvo dada por la abundancia relativa de quitridios presente en la misma, que correspondió al 45,6% de las secuencias, valores cercanos a los ya reportados en suelos de zonas de altura (Freeman et al., 2009). Finalmente, como se mencionó anteriormente, existe un grupo de muestras de suelo con mayor distancia al resto, que poseen dominancia de *Purpureocillium lilacinum*, siendo esta especie mayoritaria en las muestras de RCO y VN.

Cuando analizamos el hielo del Ventisquero Negro, observamos que este presentaba un perfil de composición fúngica más cercano a las muestras de suelo que a las muestras de hielo del Castaño Overa, el agua del río Castaño Overa y el agua de deshielo del Ventisquero Negro. Como se mencionó previamente, este glaciar presenta características particulares respecto al resto de los glaciares que conforman el Monte Tronador, ya que recibe aporte de sedimentos y fragmentos rocosos, que le conceden características fisicoquímicas diferentes a los otros glaciares estudiados (Worni et al., 2012), afectando con ello a la microbiota asociada a este sistema.

El glaciar Castaño Overa presentó la mayor diversidad taxonómica de OTUs en general, con respecto al río Castaño Overa y al glaciar Ventisquero Negro. Para los tres sitios el solapamiento de OTUs/ASVs entre sustratos fue menor al 3%, mostrando consistencia en cuanto a los grupos taxonómicos preponderantes. Nuestros resultados muestran que los hongos ascomicéticos dominan en los suelos del sistema glaciar del Monte Tronador, algo similar a lo reportado para suelos de otros ambientes fríos (Arenz & Blanchette, 2011; Connell et al., 2006; 2008; Cox, et al., 2016; Dresch et al., 2019), mientras que el agua y el hielo están dominados por hongos basidiomicéticos. Datos similares fueron encontrados en estudios de levaduras cultivables en el Monte Tronador y agua del Parque Nacional Nahuel Huapi (Brandão et al., 2011; de Garcia et al., 2014), así como en otros ambientes fríos del mundo (Branda et al., 2010; Cantrell et al., 2011).

De los hongos zoospóricos, los pertenecientes a Chytridiomycota fueron más abundantes en el sitio de muestreo asociado al glaciar Castaño Overa, y estuvieron presentes tanto en suelo como en hielo y nieve. Hay pocos aislamientos de estos hongos zoospóricos en ambientes extremos, pero en los últimos años los análisis de ADN ambiental han permitido vislumbrar parte de la ecología de este tipo de hongos. Este grupo ha sido encontrado en suelos antárticos (Bridge & Newsham, 2009) y un clado de quitridios (Snow Chytrids 1), relacionado a Lobulomycetales,

ha sido descrito para nieve en sitios de altura (>3000 m snm) de Colorado, Suiza, Francia y Nepal (Naff et al., 2013). La presencia de quitridios ha sido reportada, además, para agua de deshielo y sedimentos de un fiordo en la Patagonia chilena (Gutiérrez et al., 2015). Los órdenes Spizellomycetales y Rhizophydiales fueron los más comunes en el suelo, siendo el género más representativo *Powellomyces* sp., este género incluye quitridios de vida libre asociado al suelo (Langcore et al., 1995). En condiciones de laboratorio algunos aislamientos pertenecientes a especies de estos órdenes, han demostrado poseer tolerancia a los ciclos de congelamiento y descongelamiento (Gleason et al., 2008, 2010). Se puede considerar que la influencia del glaciar y del agua de deshielo provee condiciones favorables para la dispersión y desarrollo de los quitridios en el suelo, similar a lo ocurrido en otros ambientes de altura tales como Colorado y Nepal (Freeman et al., 2009), donde las secuencias pertenecientes a este taxón fueron dominantes.

Otro grupo de hongos quitridios, pertenecientes al orden Monoblepharidales, fue el grupo más representativo en las muestras de hielo y nieve del glaciar Castaño Overa. Este orden es descrito generalmente como un grupo hermano de la clase Chytridiomycetes dentro del phylum Chytridiomycota (Hibbett et al., 2007; Dee et al., 2015). Sin embargo, algunos autores ubican al orden como un phylum separado, Monoblepharidiomycota, que contiene dos clases, Monoblepharidomycetes y Hyaloraphidiomycetes (Powell & Letcher, 2014). En este trabajo, se consideró al orden Monoblepharidales como un grupo dentro de los Chytridiomycota. Este taxón es considerado mayormente saprobio, con pocos representantes parásitos (Powell & Letcher, 2014; Karpov et al., 2017). También ha sido aislado de agua, suelo, estuarios y ambientes marinos (Longcore and Simmons, 2001; Gleason et al., 2008). Se reporta así, por primera vez en este trabajo, la existencia de hongos quitridios en ambientes glaciarios de la Patagonia Argentina, siendo su presencia significativa en las muestras del glaciar Castaño Overa. Estos resultados sientan las bases para estudios futuros, para su aislamiento, descripción y su rol en ambientes extremos.

Al analizar los OTUs/ASVs más abundantes pudimos observar que para todos los suelos estudiados, los hongos filamentosos del phylum Ascomycota fueron mayoritarios. Las especies/géneros más abundantes para el suelo circundante al glaciar Castaño Overa pertenecieron a la clase Leotiomycetes, siendo mayoritarios *Claussenomyces* sp., *Rhizoscyphus ericae* y *Phialocephala helvetica*, estos grupos están asociadas con la descomposición de madera y/o a la rizósfera de las plantas (micorrizas ericoides, endófitos) (Arenz et al., 2014). *Rhizoscyphus ericae* es una especie de micorriza ericoidal registrada por primera vez en las cotas más altas del cerro Tronador por Bruzone et al. (2017), algo que concuerda con los OTUS

obtenidos de las muestras de suelo tomadas a más de 1600 m snm asociadas a este glaciar. Para el suelo asociado al río Castaño Overa y al glaciar Ventisquero Negro la especie más abundante fue *Purpureocillium lilacinum* (clase Sordariomycetes), esta es una especie cosmopolita descrita como patógeno de nemátodos (Madariaga-Mazón et al., 2013; LaMondia & Timper, 2016), que ha sido aislada y/o secuenciadas de otros ambientes extremos, como suelo y agua de la Antártida (Gonçalves et al., 2012, 2017) agua ácida de Río Tinto en España (Oggerin et al., 2013), y en bosques templados de la Patagonia (Tedersoo et al., 2014). Además, para el glaciar Ventisquero Negro se registraron otras dos especies como mayoritarias *Gyoerffyyella* sp. (Leotiomycetes) y *Mycosphaerella tassiana* (Dothideomycetes), estos son Hyphomycetes acuáticos/endófitos y patógenos de plantas, respectivamente.

Dentro de las levaduras identificadas en el suelo se destacan *Rhodotorula mucilaginosa*, *Candida parapsilopsis* y *Vishniacozyma victoriae*, especies ubicuas asociadas a diferentes sustratos, incluyendo el suelo (Yurkov, 2018). En ambientes naturales de la Patagonia se demostró también su presencia en una gran diversidad de sustratos diferentes (Libkind et al., 2008c) *Rh. mucilaginosa* es una levadura pigmentada, con potencialidad biotecnológica por su capacidad para producir grandes cantidades de carotenoides, proteínas y lípidos, siendo particularmente importante para la industria de los alimentos, procesos de bioconversión, y las industrias de bioenergía (Libkind et al., 2004; 2006; Aksu et al., 2005; Moliné et al., 2010; Kot et al., 2019). Tiene la capacidad de crecer a una alta densidad celular y puede utilizar una amplia gama de fuentes de carbono y nitrógeno (Park et al., 2018). *Candida parapsilopsis*, es una levadura históricamente asociada al humano como patógeno oportunista (Kurtzman et al., 2011), pero en los últimos años se la ha aislado en ambientes extremos tanto en la Antártida como en el Ártico en diversos sustratos como nieve, hielo, agua de deshielo, materia orgánica y permafrost (Butinar et al., 2011, Buzzini et al., 2017). En Patagonia existe solo un antecedente de aislamiento de esta especie en el arroyo Valcheta (D. Libkind, comunicación personal). *Vishniacozyma victoriae* tiene una alta prevalencia en ambientes extremos de la Antártida y el Ártico. Fue descrita por primera vez en la Antártida (Santiago et al., 2015) y posteriormente fue aislada en diversos sustratos como suelo, sedimentos, agua dulce, la rizósfera de plantas antárticas (Godinho et al., 2013) y líquenes (Santiago et al., 2015). En el Ártico fue aislada de hielo glacial y suelo (Butinar et al., 2011), en los Alpes italianos del suelo y agua de deshielo (França et al., 2016). En Patagonia fue encontrada en hielo glacial, agua de deshielo y suelo (de García et al., 2014), pero también en ríos volcánicos (Russo et al., 2008) y filósfera (Muñoz, 2010). Esta especie muestra una amplia distribución, que no está restringida a una región o hábitat en particular. Por lo general, posee capacidades fisiológicas amplias y utiliza diversas

fuentes de carbono (politrófica). Debido a la capacidad de vivir en diversos hábitats y condiciones, dichas levaduras se denominan en la literatura cosmopolita, oportunista o generalista (Yurkov & Pozo, 2017).

El phylum Basidiomycota dominó en las muestras asociadas al agua en todos sus estados, algo que va en consonancia con los estudios previos de hongos y levaduras cultivables de la Patagonia Argentina y otros ambientes fríos (Margesin, et al., 2007; Russo et al., 2008; Thomas-Hall et al., 2009; Mestre et al., 2011; Uetake et al., 2011; Vaz et al., 2011; Brown et al., 2015; Martínez et al., 2016). Este sustrato posee secuencias relacionadas a especies psicrófilas y psicotolerantes, como *P. psychrophenolica*, *Leucosporidium* spp., *Rhodotorula* spp. (dentro de Sporidiobolales) y *Naganishia* spp., todas las especies pertenecen a géneros basidiomicéticos de levaduras aislados en trabajos previos de glaciares alpinos y andinos (Branda et al., 2010; de Garcia et al., 2012).

La clase Microbotryomycetes fue la más abundante para las muestras de hielo, nieve y agua. Esta clase es la segunda más grande dentro de la subdivisión Pucciniomycotina, con más de 200 especies descritas, muchas de las cuales corresponden a levaduras y hongo dimórficos (Wang et al., 2015). Este grupo taxonómico abarca una gran variedad de hongos psicrófilos tales como las levaduras del género *Phenoliferia* spp. en Sporidiobolales (Margesin et al., 2007), *Leucosporidium* spp. en Leucosporidiales (de García et al., 2015), y *Glaciozyma* spp. (Turchetti et al., 2011), *Camptobasidium hydrophilum* y *Cryolevonia* en la familia Camptobasidiaceae (Pontes et al., 2020; de Garcia et al., 2020). La clase Microbotryomycetes ya posee registros donde su presencia es mayoritaria en crioconita en glaciares de Svalbard, en porcentajes que van de 36,8 al 40,7% (Perini et al., 2019). Esta clase, junto con los géneros *Naganishia*, *Solicoccozyma* y *Piskurozyma*, pertenecientes a Tremellomycetes, son los grupos predominantes en el hielo/nieve/agua de los ambientes fríos patagónicos (de Garcia et al., 2007, 2012, 2020).

Cuando analizamos el hielo, nieve y el agua de deshielo los grupos mayoritarios de las especies identificadas correspondieron a levaduras de las clases Microbotryomycetes y Tremellomycetes. Los OTUs sin identificar correspondientes a la clase Microbotryomycetes en las muestras de nieve y hielo del glaciar Castaño Overa podrían considerarse posibles levaduras debido a que se encuentra filogenéticamente cercanos a otras especies de levaduras de ambientes fríos: *Cryolevonia* spp. (de Garcia et al., 2020; Pontes et al., 2020) y *Phenolipharia glacialis*. Las especies mayoritarias identificadas en el hielo fueron *Leucosporidium fragarium*, *Leucosporidium intermedium* (CO) y *Naganishia friedmannii* (VN) y en el agua de deshielo del Ventisquero Negro y del río Castaño Overa correspondieron

a *Phenoliferia glacialis*, *Candida mesenterica*, *Naganishia globosa* y *Leucosporidium intermedium*. Estas especies han sido aisladas con frecuencia en diversos ambientes con bajas temperaturas tanto en Patagonia (de Garcia et al., 2014) como en zonas de la Antártida (de Menezes et al., 2019). Las especies del género *Leucosporidium* están descritas como psicrotolerantes, con integrantes capaces degradar compuestos fenólicos, de producir enzimas activas a baja temperatura y proteínas anticongelantes (Lee et al., 2012; Park et al., 2012; de Garcia, et al., 2014; de Garcia et al., 2015). *Leucosporidium intermedium* y *L. fragarium* poseen una amplia gama de enzimas extracelulares, proteasa, esterasa, pectinasa, pectatoliasa y CMC-celulasa (de Garcia et al., 2012; Baeza et al., 2017) que les provee potencialidad para la bioremediación de ambientes fríos (Kurtzman et al., 2015). *Naganishia friedmanii* es una levadura aislada por primera vez de la Antártida (Vishniac, 1985) característica de las comunidades criptoendolíticas, con capacidad para utilizar celobiosa como fuente de carbono, con un perfil psicrotolerante y halotolerante (Buzzini et al., 2018), además de una alta resistencia a la radiación UV en zonas de altura mayores a 6000 m snm y baja disponibilidad de agua. Aislada de diferentes sustratos como agua de la Laguna Ilón, Patagonia, Argentina, (Libkind et al., 2009), filoplano de plantas nativas de la Patagonia (Muñoz et al., 2010) y tefra de volcanes en la región de Atacama (Schmidt et al., 2017). *Ph. glacialis* es una especie con perfil psicrófilo típica de ambientes fríos, descrita para suelo, nieve, hielo y agua de mar en ambientes polares y subpolares (Buzzini et al., 2017), en sedimentos sub y supraglaciares, así como agua de deshielo de glaciares de montaña (Turchetti et al., 2008; de Garcia et al., 2014; Sannino et al., 2017). Junto con *Ph. psychrophenolica* y *Ph. psychrophila* conforman un ecoclado psicrófilo dentro del orden Kriegeriales (Microbotryomycetes), siendo común para todas las especies la capacidad para asimilar fenol (Wang et al., 2015). Esta levadura presenta características biotecnológicas relevantes como la producción de lípidos, biodiesel de tercera generación, enzimas extracelulares y proteínas anticongelantes (Viñarta et al., 2016; Viñarta et al., 2020; Tsuji & Kudoh, 2020). Las especies del género *Candida* suelen ser parte de las levaduras ascomicéticas más abundantes en ambientes fríos, especialmente en otros ambientes glaciales como el glaciar Calderone en Italia (Branda et al. 2010), glaciares de las montañas Tianshan en China (Luo et al., 2019) y lagos oligotróficos de origen glaciario (Brandão et al., 2011). En estudios previos en hielo de glaciares patagónicos (Castaño Overa, Frías y Perito Moreno) se aisló a *Candida mesenterica* (de Garcia et al., 2014), una de las especies más representativas de género, junto con *Candida sake*.

Los hongos filamentosos más abundantes en el hielo, nieve y agua de deshielo correspondieron a *Hyaloraphidium curvatum* (CO), *Cadophora melinii* (VN) y *Exophiala xenobiotica* (VN). *H.*

*curvatum* es un hongo filamentoso poco estudiado que originalmente había sido clasificado como una especie de alga decolorada, pero que luego fue ubicado dentro de la clase Monoblepharidomycetes (Ustinova et al., 2000; Naranjo-Ortiz & Gabaldón, 2019). Tiene un tipo de vida libre y planctónico y ha sido aislado tanto en agua dulce, como agua de mar de ambientes fríos polares (Hassett et al., 2017). Por otro lado, *Cadophora melinii* ha sido aislada de lesiones en plantas (Linnakoski et al., 2018) y madera en descomposición en Ardley Island (Antártida) (Albores et al., 2018). *Exophiala xenobiotica* estuvo presente en el agua de deshielo del Ventisquero Negro, esta especie es un hongo dimórfico o levadura negra que fue aislada por primera vez en ambientes cercanos a la vía ferroviaria de Hilversum, Países Bajos, con presencia de xenobióticos aromáticos (De Hoog et al., 2006) y se la considera patógena oportunista que causa infecciones cutáneas y subcutáneas (Hoog et al., 2009), aunque también se la ha aislado de muestras de agua dulce de la Antártida (Vaz, et al., 2011), de agua corriente y subterránea de Eslovenia (Babič, et al., 2016) y de glaciares de los Montes Apeninos (Branda, et al., 2010).

La morfología de los hongos puede dar indicios sobre las características de un ambiente. La aparición evolutiva de las hifas en los hongos se asocia con la colonización de hábitats terrestres, así como a las simbiosis micorrícicas con las plantas y es la morfología alargada de las hifas un rasgo adecuado para la búsqueda de los minerales y nutrientes en el suelo (Pringle & Taylor, 2002; Harris, 2011). Por otro lado, las levaduras ocurren de manera relativamente frecuente en el árbol fúngico de la vida y para diversos taxones, lo que sugiere que no es probable que haya un desencadenante común, debido a que las levaduras prosperan en una amplia diversidad de nichos ecológicos. Sin embargo, los nichos ocupados por algunas levaduras proporcionan pistas sobre los tipos de ambientes que podrían favorecer su desarrollo. Por ejemplo, las levaduras que se encuentran en hábitats extremos como salinas, desiertos polares y superficies rocosas (Gostincar et al. 2009). Debido al estrés asociado con estos hábitats, las levaduras exhiben numerosas adaptaciones como la presencia de genes para la producción de metabolitos secundarios y se cree que la morfología unicelular mantiene relaciones óptimas de superficie/volumen para tolerar condiciones de desecación y/o congelamiento (Harris, 2011). Los hongos filamentosos, en particular los de “vida libre”, están asociados a la estrategia de descomponedores, mientras que las levaduras utilizan la estrategia de tolerancia al estrés (Treseder & Lennon, 2015), patrón que podemos relacionar en este trabajo a la presencia diferencial de hongos y levaduras en los diferentes sustratos estudiados. Los resultados obtenidos a través de los métodos libre de cultivo nos proveyeron una mayor información sobre la diversidad de hongos presentes con respecto a la información

previa de hongos cultivables en estos ambientes glaciario. Además, gracias a esta herramienta, se detectó una mayor diversidad (diversidad alfa y beta) en comparación con estudios previos de levaduras y/u hongos filamentosos cultivables en suelo del Parque Nacional Nahuel Huapi (Mestre et al., 2011; Velázquez et al., 2016), hielo y agua de deshielo del Monte Tronador (de Garcia et al., 2007, 2012) y suelo de la Antártida (Godinho et al., 2015). La diversidad de hongos en el suelo, hielo, nieve y agua de deshielo asociado a dos glaciares del Monte Tronador es mayor de lo que se tenía registro con anterioridad. Los patrones de distribución de las diferentes clases fueron comunes a otros estudios de hongos que habitan diversos ambientes fríos. En este trabajo se obtuvo el primer registro del grupo Chytridiomycota en sistemas asociados a glaciares en la Patagonia Argentina, grupo que representó una alta abundancia relativa en el glaciar Castaño Overa. Son necesarios estudios adicionales para comprender el papel ecológico de los quítridos dentro de estos y otros ambientes extremos. Para los sustratos provenientes de los glaciares, el grupo predominante consistió en especies previamente no descritas relacionadas con levaduras psicrófilas de la clase Microbotryomycetes. El estudio de levaduras pertenecientes a este grupo taxonómico es importante desde varios aspectos, tanto el taxonómico (de Garcia et al., 2020) como su aplicación biotecnológica, dado que estas levaduras tienen la capacidad de producir proteínas anticongelantes y enzimas activas a bajas temperaturas entre otras (Firdaus-Raih et al., 2018; Parvizpour et al., 2014). Los esfuerzos futuros deberán centrarse en desarrollar nuevas estrategias de aislamiento y posterior caracterización genética y fisiológica con el fin de establecer mejor su taxonomía, nivel de especialización en condiciones extremas e importancia ecológica y biotecnológica.

### 3.5 CONCLUSIONES PARCIALES

- Este trabajo es el primer estudio sobre biodiversidad de hongos utilizando herramientas de secuenciación masiva para diferentes sustratos del sistema glaciario del Monte Tronador.
- Las comunidades fungicas presentes en el suelo desnudo de los glaciares Castaño Overa y Ventisquero Negro fueron significativamente diferentes a las comunidades presentes en el hielo, la nieve y el agua de deshielo de estos glaciares.
- Hongos filamentosos del phylum Ascomycota fueron dominantes en el suelo de los glaciares estudiados del Monte Tronador.

- Las levaduras del phylum Basidiomycota fueron dominantes en nieve, hielo y agua de los glaciares estudiados del Monte Tronador.
- La clase Microbotryomycetes fue mayoritaria en nieve, hielo y agua de los glaciares estudiados del Monte Tronador.
- Se registra por primera vez para la Patagonia Argentina la presencia de hongos Chytridiomycetes y Monoblepharidomycetes.

## **CAPÍTULO IV**

### **ESTUDIO COMPARATIVO DE LEVADURAS EN AMBIENTES FRÍOS: MONTE TRONADOR Y OTROS AMBIENTES GLACIARIOS**

## 4.1 INTRODUCCIÓN

El descubrimiento de microorganismos tolerantes al frío en glaciares y otros ambientes que se encuentran la mayor parte del año a temperaturas bajo cero, ha ampliado el conocimiento de los rangos de condiciones ambientales que sustentan la vida microbiana. En muchos ambientes, incluyendo los que conforman la criosfera, la disponibilidad y el balance de elementos claves (fósforo, carbono, nitrógeno) son los que determinan la estructura y la composición de las comunidades (Cross et al., 2005; Ren et al., 2019). En los glaciares y casquetes de hielo, se definen tres tipos de ecosistemas diferentes: el ecosistema supraglacial, el ecosistema englacial y el ecosistema subglacial (Hodson et al., 2008; Boetius et al., 2015). Estos tres ecosistemas difieren en términos de radiación solar, contenido de agua, contenido de nutrientes y potencial redox (Hodson et al., 2008). Aún así, es importante recalcar que los hábitats criosféricos interactúan unos con otros; por ejemplo, la producción primaria y la deposición atmosférica que ocurren en la superficie de los glaciares (zona supraglacial) influyen en los procesos debajo de ellos en la zona subglacial (Garcia-Lopez & Cid, 2017; Ren et al., 2019).

Otro ecosistema a considerar, asociado al sistema glaciario, son los lagos y arroyos alimentados por glaciares, que incluyen los hábitats río abajo que están directamente adyacentes a los mismos. Los glaciares se derriten y suministran agua, sedimentos y nutrientes claves a los ecosistemas acuáticos, determinando sus turbidez, la disponibilidad de recursos y la estructura y composición de las comunidades biológicas (Martyniuk et al., 2014; Hotaling et al., 2017; Ren et al., 2017). En general, los arroyos y lagos alimentados por glaciares se caracterizan por un aporte considerable de sedimentos provenientes del lecho de roca río arriba, temperaturas frías (por ejemplo,  $< 10^{\circ}$  incluso en verano) y niveles variables del agua (Ren et al., 2019).

Del total de glaciares de las regiones andinas de Argentina, los Andes del norte de la Patagonia ( $36^{\circ}$ - $45^{\circ}$ S) han sido de los menos estudiados. El norte de la Patagonia posee una gran variedad de ambientes y glaciares de tamaño medio a chico con mucho potencial para la investigación científica, pero en la actualidad sólo existe información detallada para un escaso número de glaciares (IANIGLA, 2018). Durante los últimos años los efectos del cambio climático se han ido vislumbrando debido al retroceso sostenido de gran parte de las masas de hielo montañosas (Villarosa et al., 2008; Ruiz et al., 2017). Adicionalmente, el calentamiento global aumenta la tasa de desertificación, exponiendo el suelo bajo los glaciares en retroceso (Oerlemans, 2001; Higgins & Vellinga, 2004), descubriendo comunidades de microorganismos cerca y bajo de estos glaciares, permitiendo el estudio de diferentes sustratos asociados al sistema glaciario y las adaptaciones de las especies que los habitan (Connell et al., 2008).

En los últimos años se han desarrollado modelos analíticos para predecir el balance de masa de los glaciares de montaña. Los glaciares de la zona del Tronador no son una excepción, coincidiendo con las observaciones de retracción realizadas en otras regiones del mundo, y ha sido considerado por los expertos como una de las evidencias naturales más claras del calentamiento del planeta durante las últimas décadas (Villarosa et al., 2008; Ruiz & Trombotto-Liaudat, 2012; Ruiz et al., 2017).

Dentro de los glaciares de interés para este trabajo se encuentra el glaciar Castaño Overa. Este glaciar está ubicado en el Monte Tronador, a unos pocos kilómetros al este del glaciar Río Manso. Hasta mediados de la década de los 80, la parte inferior del glaciar Castaño Overa era un cono de hielo regenerado por debajo de un acantilado de 200 metros de altura, el cual podía ser visitado por medio un sendero, pero en las últimas décadas este cono se ha desintegrado por completo, lugar desde el que nace el río Castaño Overa (Rabassa, 2007, Masiokas et al. 2008). Otro de los glaciares comprendidos en este estudio es el Ventisquero Negro, es un glaciar que se encuentra por debajo del *timberland*, cubierto por detritos (Villarosa et al., 2008; Worni et al., 2012), debido a que constituye un glaciar reconstituido a partir de los desprendimientos del Glaciar Manso y representa el 1% de la superficie total inventariada para el Monte Tronador. Posee un lago proglacial en uno de sus extremos, situación que comparte de forma cada vez más usual con otros glaciares, debido a los aumentos de temperaturas (IANIGLA, 2018).

La ecología microbiana de la criosfera se ha beneficiado de los enfoques ómicos más recientes, gracias a ella no sólo se ha podido inventariar las especies más relevantes, sino que también se ha podido ver los cambios estacionales de las mismas, las sucesiones debidas a disturbios del ambiente estudiado y se han podido realizar proyecciones en diversos escenarios de cambio climático (Feller, 2017; Edwards et al., 2020). En este capítulo realizaremos un análisis integral de la biodiversidad de levaduras (cultivables y no cultivables) del Monte Tronador y las condiciones físico-químicas de este ambiente. A su vez, contrastaremos la información obtenida con los datos existentes de otros lugares del mundo con condiciones equivalentes y de otros sustratos naturales de la región Andino-patagónica.

## **4.2 MATERIALES Y MÉTODOS**

### **4.2.1 ANÁLISIS FÍSICO-QUÍMICOS DE LOS DIFERENTES SUSTRATOS**

De cada muestra recolectada se analizó temperatura, pH, carbono total, nitrógeno y fósforo.

### *SUELO*

Para el análisis físico-químico de las muestras de suelo se procedió a juntar las submuestras de cada muestra. La temperatura se midió *in situ* en cada sitio de muestreo. El pH del suelo se midió en una dilución de 1:2,5 (p/v) de suelo en agua destilada. La humedad fue determinada gravimétricamente (Barrett et al., 2002). El carbono total fue determinado por medio de oxidación húmeda (Okalebo et al., 2002). El N total fue estimado utilizando el método de micro-Kjeldahl y la concentración de fósforo fue determinada por medio de la mineralización de la muestra y posterior digestión seca (Gregorich & Carter, 2007). Todos los análisis de este sustrato fueron llevados a cabo por parte del Grupo de Suelos del Centro regional Universitario Bariloche, Universidad Nacional del Comahue.

### *HIELO Y AGUA:*

La temperatura se midió *in situ* en cada sitio de muestreo. El contenido de N total fue estimado mediante digestión (Grasshoff et al., 1983) y valoración de NO<sub>3</sub>+NO<sub>2</sub> por reducción en columna de cadmio y diazotización (APHA, 1992). Mientras que el contenido de P total fue determinado por medio de digestión ácida y posterior valoración del fósforo solubilizado por reducción del complejo fosfomolibdico con ácido ascórbico (Golterman et al., 1978). Todos los análisis de hielo, nieve y agua fueron realizados en el Laboratorio GECARA, del Centro regional Universitario Bariloche, Universidad Nacional del Comahue. Para las muestras de hielo y nieve correspondientes al glaciar Castaño Overa no se obtuvieron datos ya que las muestras no pudieron ser analizadas.

#### 4.2.2 DATOS AMBIENTALES

Los datos ambientales correspondientes a la temperatura media anual del aire y las precipitaciones medias anuales para el período 2013-2017, fueron obtenidos de los registros de la estación meteorológica ubicada en el Hotel Tronador (41°16'S, 71°39'O, 815 m snm) suministrados por la Autoridad Interjurisdiccional de las Cuencas de los ríos Limay, Neuquén y Negro (AIC).

#### 4.2.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Se llevó a cabo un Análisis de Componentes Principales, ACP (PCA, siglas en inglés) utilizando el paquete FactoMiner en el programa R (Lê et al., 2008), para visualizar la influencia de las características físico-químicas del suelo en las diferentes muestras.

Se realizó un Análisis Multivariado de Escalamiento Multidimensional No Métrico (NMDS, siglas en inglés), parámetro de disimilitud de Bray-Curtis y 999 permutaciones libres, para analizar la relación de los factores ambientales con las comunidades de levaduras presentes en las muestras analizadas. Se utilizaron el número de aislamiento de los distintos órdenes de levaduras (cultivables) y el número de secuencias (metagenómica). En todos los casos se ajustaron las variables ambientales de química del sustrato utilizando la función *envfit*, utilizando el paquete *vegan* 2.5-6 (Oksanen et al., 2019).

Se realizaron test de normalidad para la posterior realización de correlaciones entre los datos de abundancia total de UFC y secuencias de cada muestra, así como de abundancia relativa de los taxones identificados por aislamiento o secuencia para cada muestra. En caso de que los datos no tuvieran distribución normal, se utilizó la correlación de Spearman. Para los análisis de diversidad de las muestras se utilizó el índice de Shannon-Wiener que fue comparado para cada sitio/sustrato y método, por medio del test de t de Hutcheson.

Para catalogar posibles funciones de todos los grupos taxonómicos, obtenidas por las diferentes herramientas utilizadas en la presente tesis, se usó la herramienta FUNGuild, con revisiones hechas a mano (Nguyen et al., 2016).

## 4.3 RESULTADOS

### 4.3.1 ANÁLISIS FÍSICO-QUÍMICOS DE LAS MUESTRAS

Se estudiaron a nivel físico-químico (C, N, pH, P, temperatura y humedad) un total de 27 muestras (18 muestras de suelo, 3 muestras de hielo y 6 de agua), a los resultados obtenidos se les realizó un Análisis de Componentes Principales (ACP), los dos primeros componentes explicaron el 48,1% y el 38,5% respectivamente, explicando un total del 86,6%. El PC1 estuvo conformado por C, N, pH, P y humedad, mientras que el CP2 estuvo conformado por la temperatura. Se observa que los valores de C y N estuvieron relacionados entre sí y fueron independientes de los valores de P, y como es de esperarse, los valores de temperatura y humedad fueron opuestos. Este análisis mostró que las muestras de agua y hielo se separan de las muestras de suelo (Fig 4.1), por lo que se decidió realizar el ACP de cada grupo de muestras por separado.

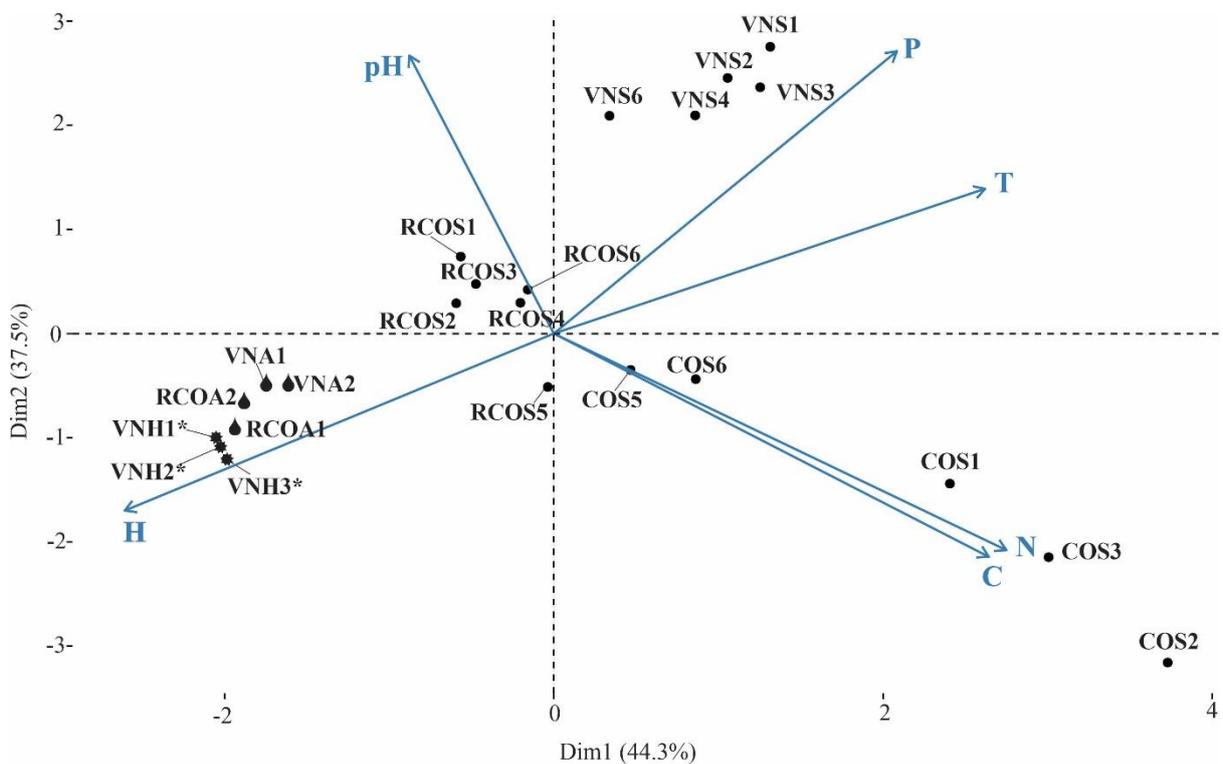
Al analizar las muestras de suelo, se observó que los dos primeros componentes explicaron el 82,6% de la varianza total. En este análisis se observa un patrón similar al obtenido en todas las muestras para los parámetros C, N, P y pH, mientras que los valores de temperatura y humedad en las muestras de suelo muestran ser independientes unas de otras; así mismo la

humedad muestra ser opuesta a la concentración de P y pH obtenida. Se observa un leve patrón que agrupa a las muestras por su lugar de origen. Tres muestras de suelo del glaciar Castaño Overa (COS1, COS2 y COS3), mostraron la mayor concentración de nitrógeno y carbono, mientras que todas las muestras de suelo del Ventisquero Negro tuvieron una mayor concentración de fósforo (Fig 4.2).

Al analizar las muestras de hielo y agua el ACP realizado mostró que los dos primeros componentes principales explicaron el 92,9% de la varianza total, con el componente 1 explicando el 61,2% y el componente 2 el 31,7% (Fig. 4.3). A diferencia de los datos obtenidos para las muestras de suelo, en las muestras de hielo, nieve y agua no se pudo detectar C con el método utilizado, observándose que el N sigue siendo independiente de la concentración de P y pH, y estos valores son opuestos a la temperatura. Las muestras de hielo y agua de los dos sitios analizados (VN y RCO), mostraron agrupaciones que diferenciaron el agua del Ventisquero Negro, con un pH levemente mayor del agua del río Castaño Overa. Las muestras de hielo del Ventisquero Negro mostraron variaciones con mayor concentración de fósforo (VNH2\*, VNH3\*) o de nitrógeno (VNH1\*).

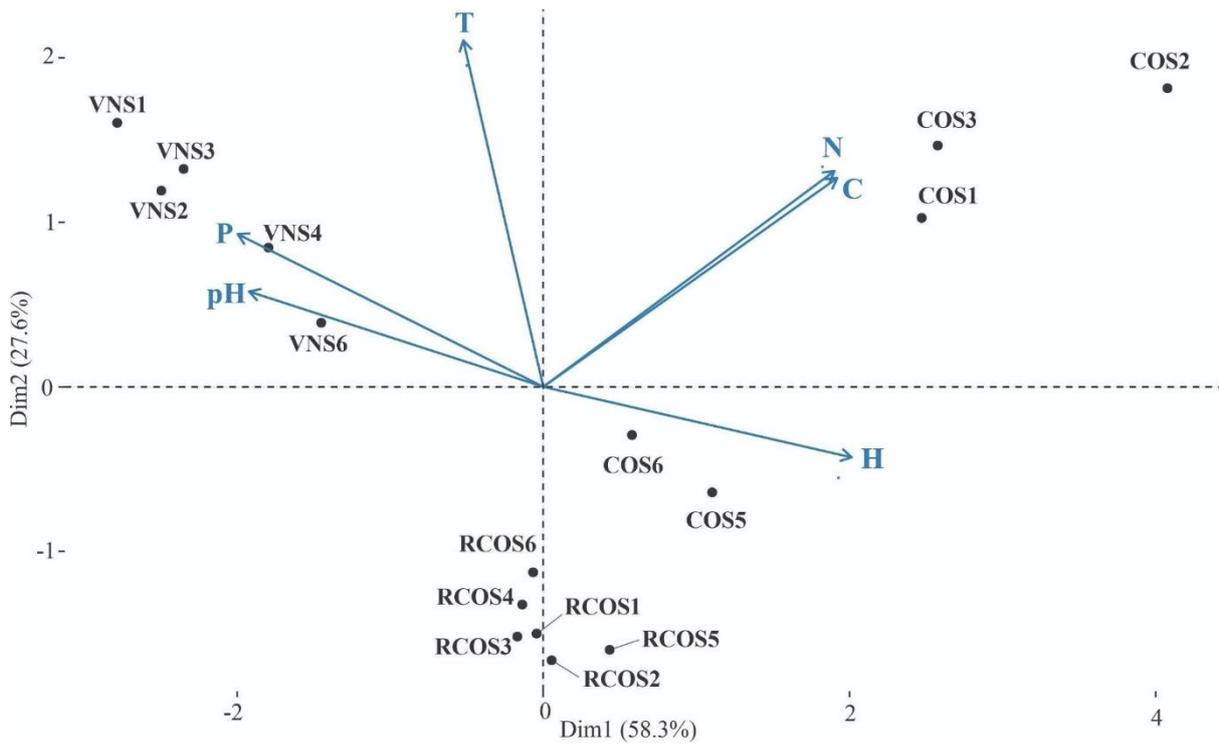
**Figura 4.1: Biplot del Análisis de Componentes Principales (ACP) para las diferentes características físico-químicas de todas las muestras tomadas en el sistema glaciar del monte Tronador**

H: Humedad; T: Temperatura, P: fósforo, C: Carbono, N: Nitrógeno y pH.



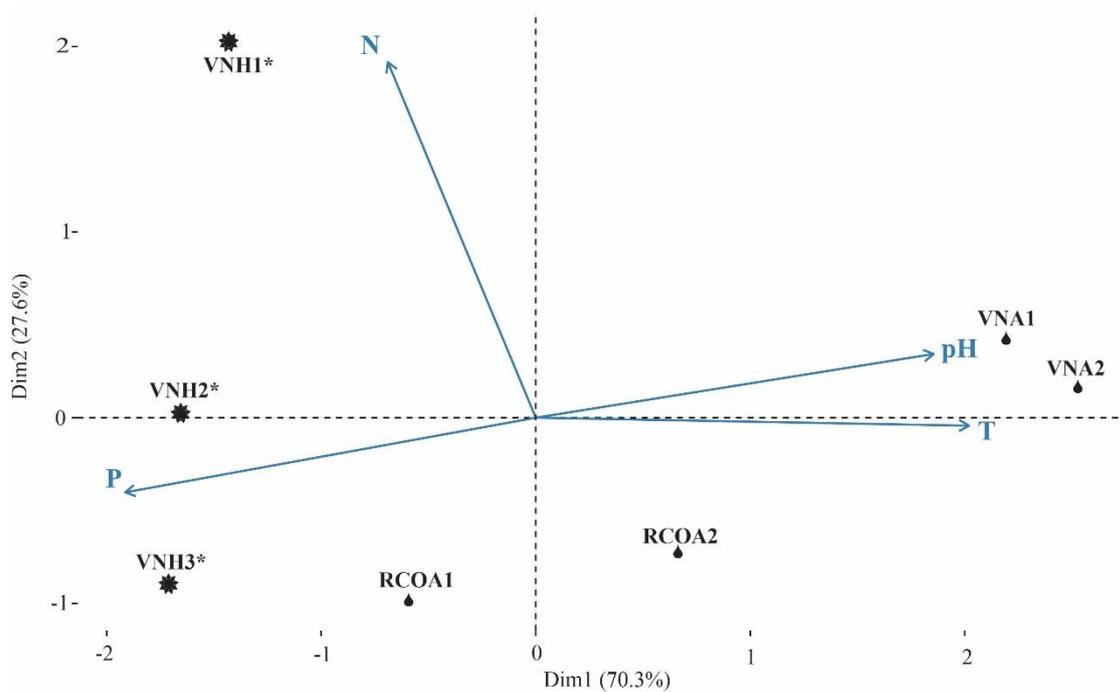
**Figura 4.2: Biplot del Análisis de Componentes Principales (ACP) para las diferentes características físico-químicas de las muestras de suelo en el sistema glaciar del monte Tronador**

H: Humedad; T: Temperatura, P: fósforo, C: Carbono, N: Nitrógeno y pH.



**Figura 4.3: Biplot del Análisis de Componentes Principales (ACP) para las diferentes características físico-químicas de las muestras de hielo, nieve y agua**

P: fósforo, N: Nitrógeno, T: Temperatura y pH.



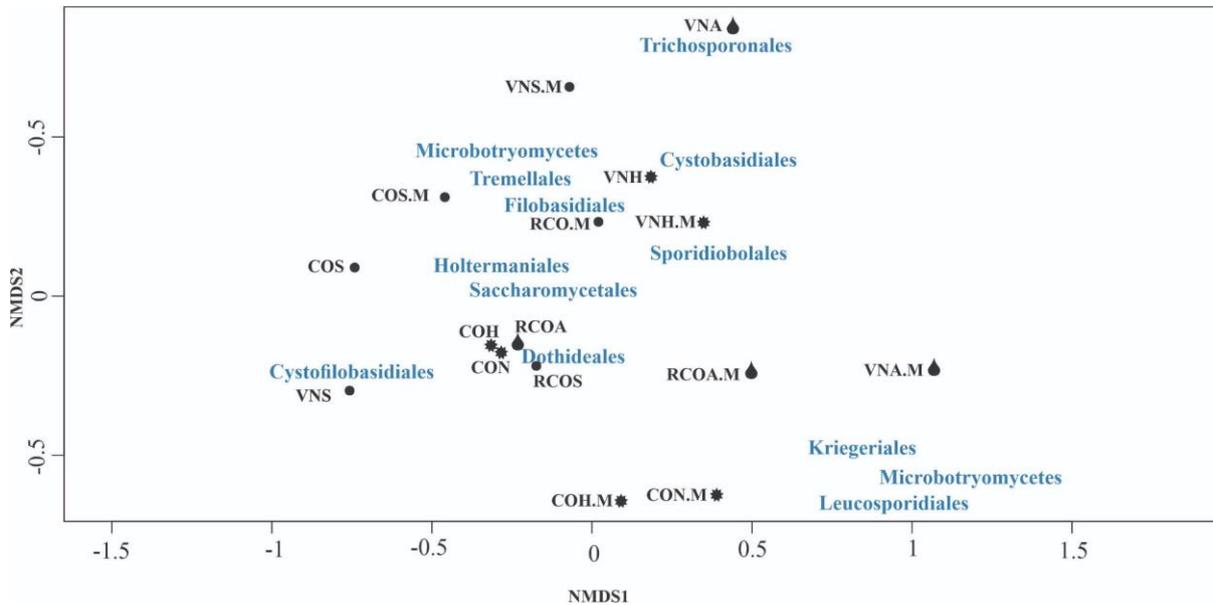
Con los análisis de los datos físico-químicos del ambiente, se plantea, a continuación, la comparación de los datos de biodiversidad obtenidos por medio del análisis de levaduras cultivables y las secuencias de levaduras obtenidas por medio de metagenómica. Para los datos de metagenómica, las secuencias correspondientes solamente a grupos taxonómicos de levaduras (órdenes que incluyen especies de levaduras), variaron desde el 89,1% en CO, 28,1% en RCO y 52,9% en VN, siendo mayoritarias en las muestras de hielo, nieve y agua con valores comprendidos entre el 98,4 y el 94,5%.

#### 4.3.2 ANÁLISIS COMPARATIVO DE LAS METODOLOGÍAS DE ESTUDIO DE DIVERSIDAD FÚNGICA

Se realizó un análisis de escalamiento multidimensional no métrico (NMDS), para estudiar la posible relación entre las variables ambientales estudiadas (Carbono, Nitrógeno, Fósforo, pH, Temperatura y Humedad) y los órdenes identificados dentro de cada muestra, tanto de datos cultivables como metagenómicos. El análisis ajustado con la función “envfit” mostró que existe una alta correlación entre las variables ambientales, haciendo poco potente el valor explicativo de las variables ambientales sobre la composición de las comunidades en las muestras ( $p > 0,05$ ). Se observó que todas las muestras de suelo, tanto para las levaduras cultivadas como no cultivadas, mostraron distancias entre ellas, no se agruparon en este análisis, y estuvieron relacionadas a los órdenes Cystofilobasidiales, Holtermanniales y Tremellales. Por su parte las muestras de hielo, de ambos métodos, proveniente del glaciar Ventisquero Negro, estuvieron relacionadas con Cystobasidiales, Filobasidiales y Sporidiobolales. El orden Dothideales estuvo relacionado a muestras cultivadas del hielo y nieve del glaciar Castaño Overa y del agua y suelo del río Castaño Overa. Los órdenes Kriegeriales y Leucosporidiales y las secuencias no identificadas de la clase Microbotryomycetes estuvieron relacionados a las muestras de metagenómica, provenientes de agua, nieve y hielo del glaciar Castaño Overa, río Castaño Overa y glaciar Ventisquero Negro. (Fig. 4.4).

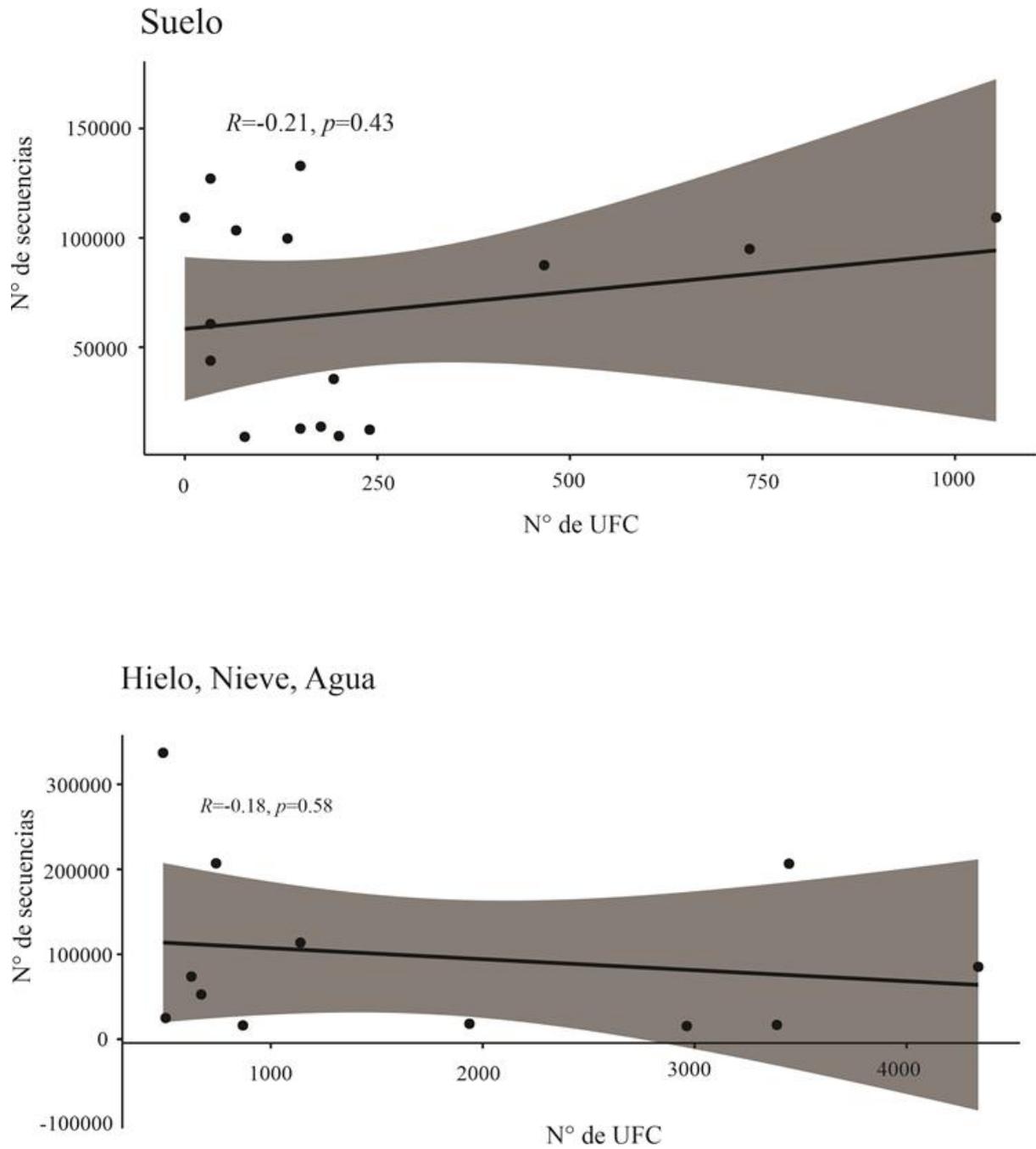
**Figura 4.4: Análisis multivariado (NMDS) de las comunidades de levaduras de suelo, hielo, nieve y agua**

CO: glaciar Castaño Overa; RCO: río Castaño Overa, VN: glaciar Ventisquero Negro; S: suelo; H: Hielo; N: nieve; A: agua; M: datos de metagenómica; Stress 0,17.

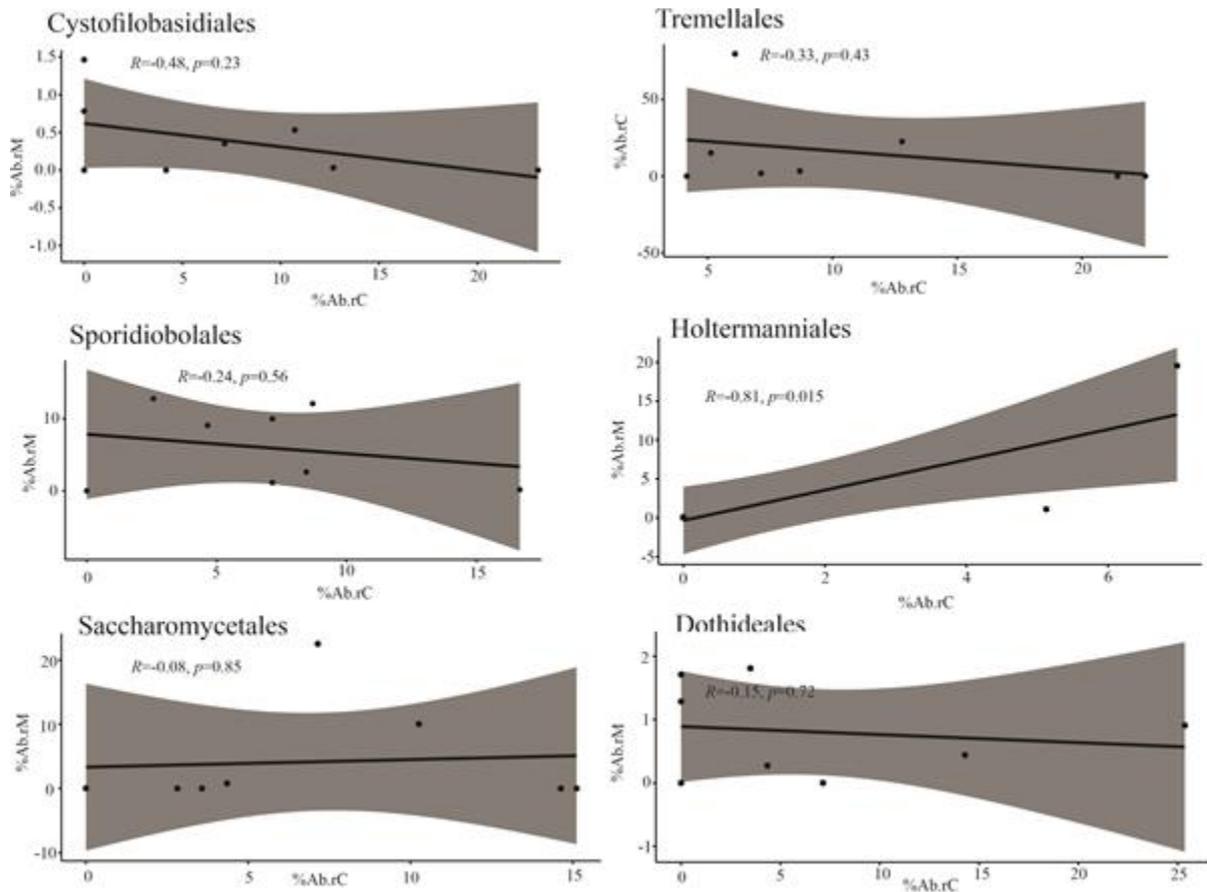


Se realizaron correlaciones entre las UFC y el número de secuencias de levaduras obtenidas de las muestras provenientes del sistema glaciar de Cerro Tronador, estos análisis mostraron que no existe una relación significativa entre ambos resultados (Fig 4.5). De la misma manera, las correlaciones realizadas para los órdenes más abundantes de levaduras, no fueron significativas, a excepción de Holtermanniales ( $R=0,81$ ,  $p<0,05$ ), que mostró una correlación positiva entre la abundancia relativa de secuencias y la de aislamientos (Fig. 4.6). De todas maneras, esta correlación positiva está dada por el bajo número de muestras. Este orden estuvo presente tanto en levaduras cultivadas y no cultivadas en el suelo del río Castaño Overa y del glaciar Ventisquero Negro.

**Figura 4.5: Correlaciones del número de UFC y de secuencias para cada sustrato, detectadas por los métodos de cultivo y secuenciación respectivamente**



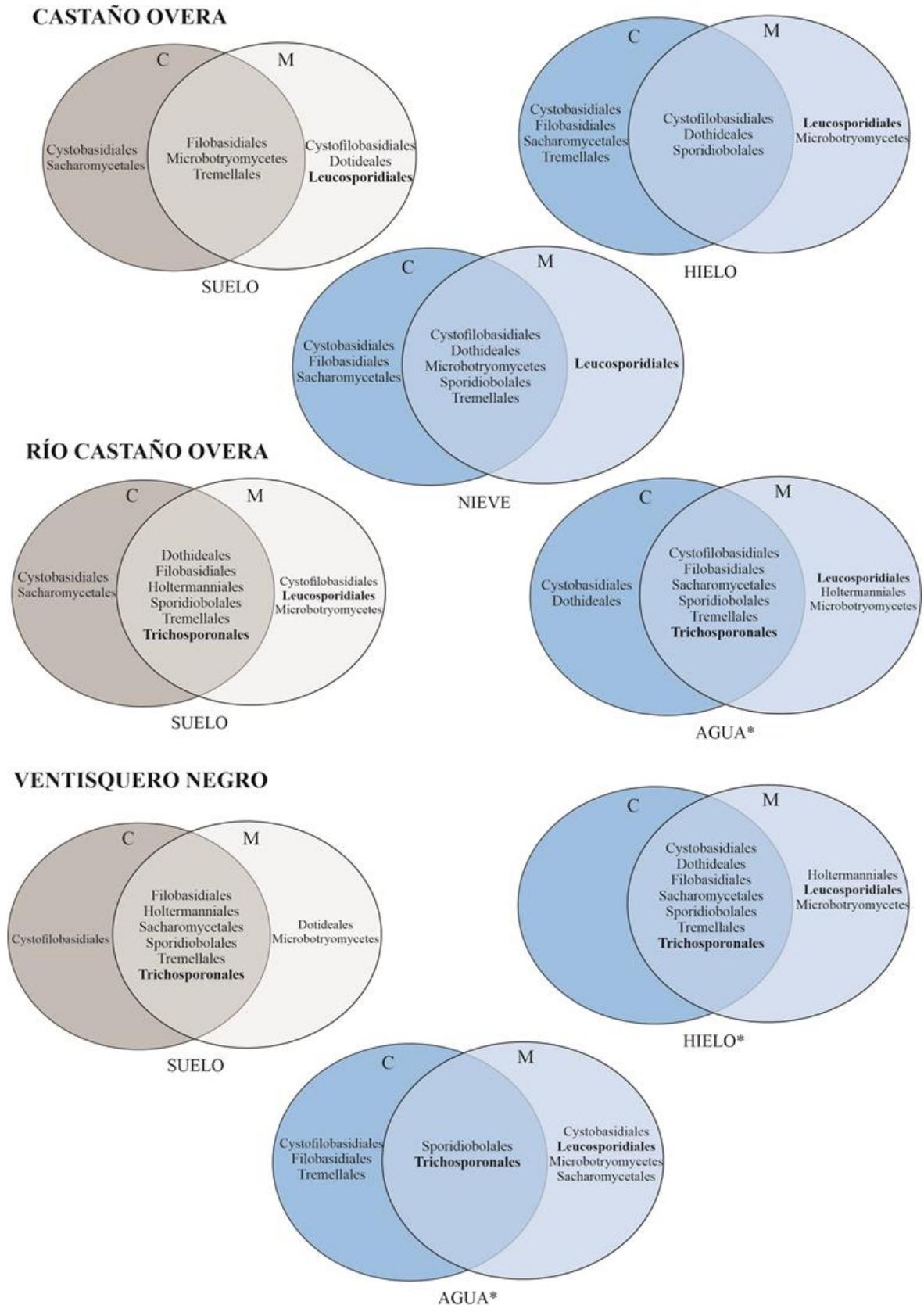
**Figura 4.6: Correlación de las abundancias relativas de cada orden detectadas por los métodos dependientes de cultivo y metagenómicos**



Luego de realizar el análisis de correlación entre los órdenes de levaduras obtenidos, se compararon con el test *t* de Hutcheson los órdenes presentes en el mismo tipo de muestra (mismo sitio y sustrato), obtenidos con las dos metodologías utilizadas. En todos los casos, tanto en las metodologías dependientes de cultivo como de metagenómica, hubo órdenes identificados sólo con uno u otro método. Se observaron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) en la representación de géneros entre las dos metodologías en las muestras de agua provenientes del río Castaño Overa y del glaciar Ventisquero Negro, y en las muestras de hielo del glaciar Ventisquero Negro, estos resultados se presentan con diagramas de Venn en la figura 4.7.

**Figura 4.7: Diagramas de Venn, con los órdenes de levaduras obtenidos para cada sitio (en secuencias o en aislamientos)**

C: cultivables, M: metagenómica. En negrita se marcan los órdenes más abundantes o exclusivos para cada metodología. Las diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre las comunidades se señalan con un asterisco.



Al analizar los resultados referentes a los órdenes obtenidos, se observó que los órdenes Leucosporidiales y Kriegeriales estuvieron presentes exclusivamente en las muestras de metagenómica, mientras que Trichosporonales estuvo siempre presente para ambos análisis. Cystobasidiales por otro lado, tuvo mayor ocurrencia sólo en los aislamientos, independientemente del sustrato del cual provino. No se observó ninguna preferencia de los géneros de levaduras obtenidos por algunos de los sustratos analizados (fuera del método utilizado).

En base a los grupos taxonómicos identificados, tanto en los análisis metagenómicos como los obtenidos en cultivables, se procedió a utilizar la herramienta *FUNGuild*, para agrupar las especies obtenidas por sus características ecológicas en gremios, Saprófito, Variable, Simbionte, Simbionte - Saprófito, Simbionte - Patógeno, Patógeno - Saprófito, Patógeno Planta, Patógeno Hongo, Patógeno Animal, según Nguyen et al. (2016). Esta herramienta utiliza una base de datos que se encuentra desactualizada respecto a la taxonomía de levaduras, por lo que se corrigió manualmente utilizando la bibliografía actualizada, la cual se enlista en materiales y métodos. Así mismo, los grupos taxonómicos en hongos generalmente no están agrupados por sus características ecológicas, y muchos géneros incluyen individuos/especies con características variables o no tan homogéneas, por lo que para el caso de levaduras que presentan individuos saprobios, patógenos y/o simbiontes fueron identificados como gremio “variable”.

Al realizar el análisis de los resultados obtenidos para levaduras, tanto para el método de cultivables como para metagenómica, se observó que los gremios mayoritarios fueron los denominados saprobios y variable, la mayoría representado por levaduras cosmopolitas. Además, se observaron representantes de los gremios simbiontes (plantas) y patógeno-saprobios (animal) para los datos de metagenómica, estos incluyeron a miembros de *Cladophialophora minutissima* y *Cutaneotrichosporon moniliiforme* respectivamente (Fig. 4.8A y 4.8B).

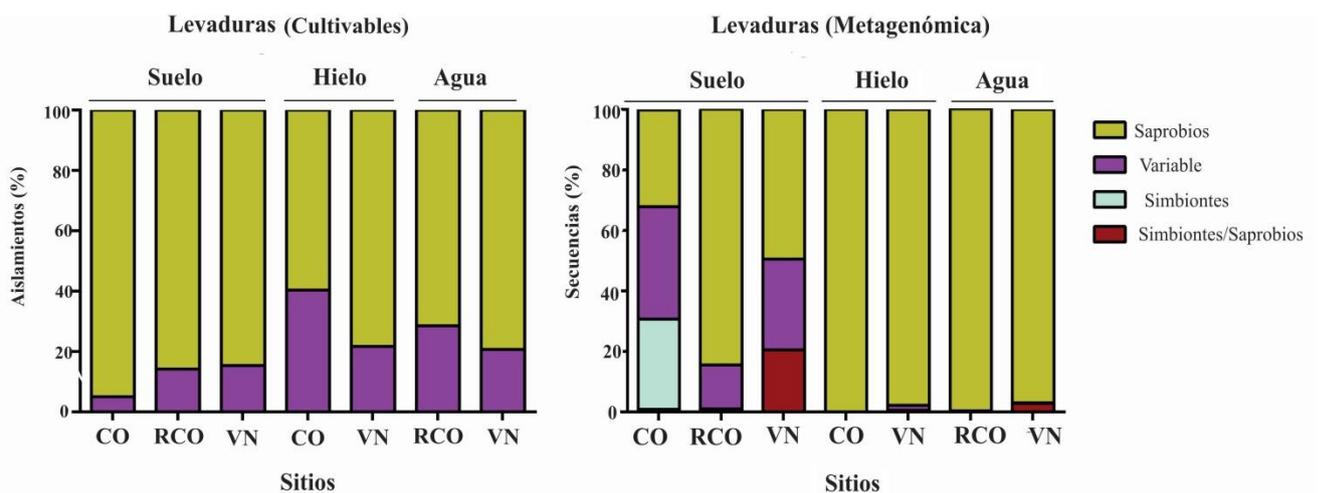
Se analizó la composición de los gremios mayoritarios obtenidos para cada sustrato y método utilizado, teniendo en cuenta los aislamientos obtenidos para cultivables y el número de secuencias obtenidas en metagenómica. Para el suelo, el grupo variable estuvo representado por *Candida sake* (4,9 y 9,1% en CO y VN respectivamente) y *Vishniacozyma victoriae* (11,6% en RCO) en cultivables; y por *Candida blankii* (21,3% en CO) y *Rhodotorula mucilaginosa* (7,1 y 6,3% en RCO y VN respectivamente) en metagenómica. El grupo de saprófitos estuvo representado por *Solicoccozyma aerea* (23,1% en CO), *Naganishia friedmannii* (18,6% en RCO) y *Filobasidium magnum* (22,7% en VN) en cultivables; y por *Dioszegia statzelliae*

(11,8% en CO), *Holtermanniella festucosa* (13,3% en RCO) y *Debaryomyces prosopidis* (4,5% en VN) en metagenómica.

En las muestras de hielo/nieve, las levaduras obtenidas del grupo variable estuvieron representadas por *Aureobasidium pullulans* (13,4% en CO) y *Rhodotorula mucilaginosa* (9% en VN) en cultivables; y *Rhodotorula mucilaginosa* (8,4% en VN) en metagenómica. El grupo de saprótrofos estuvo representado por *Dioszegia patagonicus* (8,7% de CO) y *Filobasidium magnum* (25,8% en hielo de VN) en cultivables; y por *Leucosporidium fragarium* (42,7% en CO) y *Naganishia friedmannii* (57,5% en hielo de VN) en metagenómica.

Para el agua, el grupo variable estuvo representado por *Rhodotorula mucilaginosa* (7,1% y 16,7% de RCO y VN respectivamente) en cultivables; y por *Rhodotorula* sp. (0,31% en RCO) y *Torula* sp. (0,17% en VN) en metagenómica. El grupo de saprobios estuvo representado por *Naganishia albida* (14,3% en RCO) y *Vanrija albida* (63,9% en VN) para cultivables; y por *Phenoliferia glacialis* (14,8% en RCO) y *Leucosporidium intermedium* (3.3% en VN) en metagenómica.

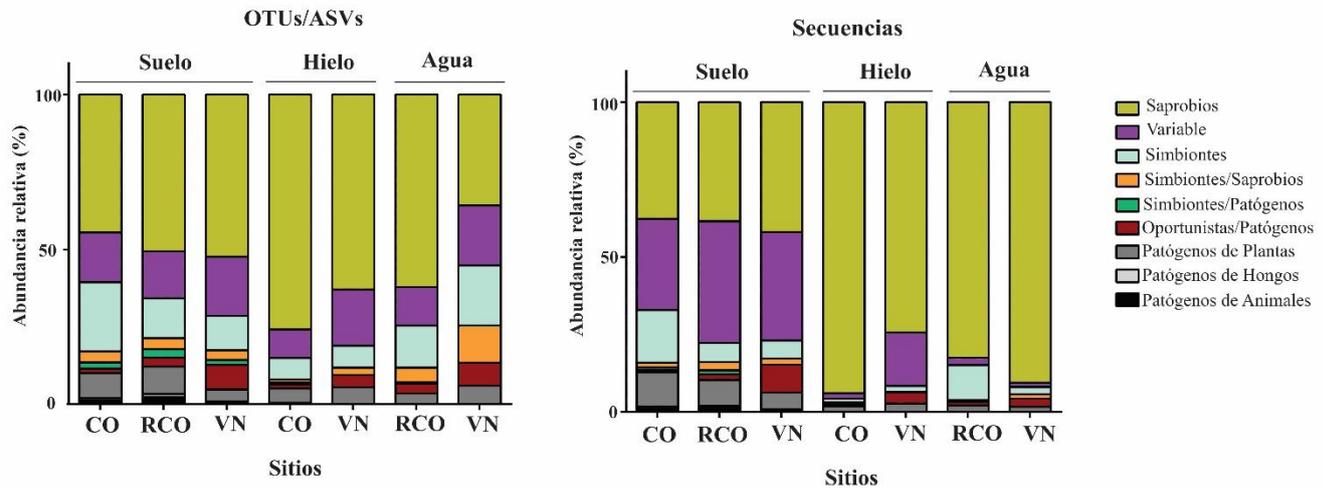
**Figura 4.8 A y B: Abundancia relativa de los gremios de levaduras registradas para cada uno de los sitios y sustratos estudiados para ambos métodos de detección**



Además, con los datos de metagenómica se analizaron todos los grupos de hongos obtenidos. Al igual que lo obtenido para levaduras, el gremio saprobio fue el más representado, tanto para los OTUs/ASVs como para las secuencias obtenidas. El gremio denominado “variable”, junto con los simbiontes, siguieron en importancia, así como los patógenos de plantas. Como puede observarse en las figuras 4.8A y B, los sustratos y los sitios de muestreo presentaron diferencias en la composición de gremios cuando comparamos los OTUs/ASVs obtenidos con las secuencias. En la figura 4.9 podemos ver que la proporción de cada gremio se mantiene para

cada sitio, pero cuando la comparamos con las secuencias, el suelo muestra un patrón diferencial con respecto al hielo y el agua. El hielo, la nieve y el agua presentaron una mayor abundancia relativa de saprobios y el suelo, con una importante proporción del grupo variable. El detalle de las especies de hongos más abundantes para cada gremio se encuentra en el Anexo 2.

**Figura 4.9: Abundancia relativa de los gremios de hongos en OTUs/ASVs para cada sitio y sustrato**



#### 4.4 DISCUSIÓN

Cuando se realizan estudios de ecología microbiana, el diseño del muestreo y los datos ambientales, son fundamentales para tener datos del contexto en el que se obtienen las muestras, lo que ayuda a la interpretación de los resultados. Una descripción detallada del contexto ambiental y los métodos utilizados son necesarios para las comparaciones en el tiempo, entre estudios, o con estudios de otro tipo de comunidades del mismo ambiente. En el caso particular de la ecología microbiana, los metadatos pueden hacer referencia a las características físicas, químicas u otros detalles ambientales de la muestra (Felczykowska et al., 2015).

En nuestro trabajo los datos ambientales obtenidos nos ayudaron a vislumbrar la realidad de la composición de carbono, nitrógeno y fósforo, en muestras de suelo desnudo, hielo glaciar y agua de deshielo, para comenzar a comprender parte de la complejidad de los ambientes glaciarios y las condiciones generales de diferentes glaciares pertenecientes al sistema del Monte Tronador.

Anesio & Laybourn-Parry (2012), presentaron un estudio de ambientes glaciarios de Svalbard, donde mencionan que la concentración de carbono orgánico de los detritos de la superficie de

glaciares y capas de hielo (2-5%), es significativamente mayor a la de las morenas marginales u otros hábitats sub-glaciales (aproximadamente 0,05%). Este resultado se puede relacionar a lo observado en nuestro trabajo, donde el suelo desnudo de las morenas adyacentes al glaciar Castaño Overa presentó la mayor concentración de carbono y nitrógeno, con respecto a los suelos del Ventisquero Negro y río Castaño Overa, estos últimos ambientes corresponden a sectores más alejados de la masa de hielo.

Los valores de nutrientes obtenidos para muestras de agua y hielo tanto para el río Castaño Overa, como para el glaciar Ventisquero Negro, mostraron que las concentraciones de nutrientes fueron bajas y variables entre las muestras. Estos valores fueron comparables a lo observado para muestras de hielo y agua del mismo sitio (Modenutti et al., 2018). Las variaciones observadas entre las muestras podrían explicarse o estar relacionada a los aportes de nieve, hielo, sedimentos y nutrientes por parte del glaciar Manso y del suelo que son arrastradas desde las zonas superiores (Ruiz et al., 2017, 2012, Modenutti et al., 2018). Así mismo, resta en un futuro realizar más análisis, sobre todo en el hielo y nieve del glaciar Castaño Overa para terminar de completar los estudios físico-químicos realizados en este trabajo.

Los análisis sobre los hongos en general y las comunidades de levaduras en particular, en el marco del medio ambiente circundante mostraron que no hubo correlación entre la composición de las comunidades fúngicas y las variables ambientales estudiadas (Carbono, Nitrógeno, Fósforo, pH, Temperatura y Humedad). Esto puede deberse a que se trata de ambientes extremos oligotróficos a ultraoligotróficos, por lo que las concentraciones de nutrientes son bajas, ubicándose en la mayoría de los casos por fuera del error del equipamiento utilizado (Baigún et al., 2006; Corno et al., 2009). En estudios futuros sería interesante para este tipo de ambientes utilizar otro tipo de metodología que permita obtener datos más precisos o que permitan determinar los valores reales que existen de cada nutriente, y también ampliar el análisis a otro tipo de nutrientes como el calcio, potasio, magnesio, etc.

Es importante destacar, que las levaduras se encuentran bien adaptadas a condiciones oligotróficas e incluso ultraoligotróficas. Poseen adaptaciones de uso del carbono y el nitrógeno que les proveen una ventaja ecológica en competencia con otros microorganismos en los suelos y otros sustratos (Botha, 2006; Fonseca & Inácio, 2006; Yurkov, 2017). En general, y tal como se puede observar en nuestros resultados, las levaduras basidiomicéticas a menudo dominan en ambientes oligotróficos, ya que pueden utilizar un espectro más amplio de fuentes de energía que las levaduras ascomicéticas (Buzzini et al., 2018). Este tipo de levaduras basidiomicéticas, están representadas por grupos taxonómicos que han sido ampliamente descritos para

ambientes similares (Tremellales, Cystofilobasidiales, Filobasidiales, Leucosporiales, Sporidiobolales, etc).

En nuestro trabajo abordamos el estudio de diferentes tipos de sustratos en un ambiente glaciario de montaña del noroeste patagónico, entre ellos el suelo desnudo. Dentro de las muchas funciones ecológicas de los suelos en general, se encuentran la producción de biomasa, la conformación del sostén físico para las raíces y el aporte de nutrientes; proporcionan aire y agua necesarios para el crecimiento de las plantas. Además, actúan como filtros importantes de contaminantes químicos o biológicos, y como amortiguadores físicos en el ciclo global del agua. Finalmente, la biodiversidad contenida en los suelos afecta la diversidad genética, en particular la preservación de genes y poblaciones microbianas que podrían ser de uso potencial para los humanos, por ejemplo, para la producción de nuevos tipos de antibióticos (Baveye et al., 2016).

Por lo general, la mayoría de estudios microbiológicos del suelo se concentran en el aporte a los ciclos de ciertos nutrientes (carbono, nitrógeno, fósforo, etc) (Aislasbie et al., 2013) y en la relación planta/microorganismos. Para el Parque Nacional Nahuel Huapi existe abundante bibliografía con estudios de micorrizas y otros hongos simbiotes (Mestre et al., 2011; Nouhra et al., 2013; Fernández et al., 2012, 2015; Bruzone et al., 2017; Carron et al., 2019). Los hongos micorrízicos son habitantes comunes del suelo que establecen una asociación simbiótica con una gran variedad de plantas terrestres (Wang & Qiu, 2006). En nuestro trabajo, los hongos de géneros micorrícicos más abundantes, identificados gracias a los métodos metagenómicos fueron: *Efibulobasidium*, *Rhizoscyphus*, *Sebacina* y *Tomentella*.

Las micorrizas brindan varios servicios ecosistémicos, que incluyen promover el crecimiento de las plantas y la absorción de nutrientes, aumentar la resistencia de las plantas a la sequía junto con la protección contra el estrés biótico y mejorar la estabilidad del suelo y la retención de agua (Gianinazzi et al., 2010), por ello constituyen un componente de mucha importancia para el establecimiento de la flora de los ambientes de montaña (Bruzone, et al., 2017; Velásquez et al., 2016) así como para la resiliencia de la misma (Fernández et al., 2018).

Los estudios de biodiversidad de levaduras asociados a suelos realizados en Patagonia estuvieron mayormente centrados en el suelo rizosférico de los bosques de *Nothofagus pumilio*. Las levaduras más abundantes pertenecen a la clase Tremellomycetes, entre ellas las especies *Saitozyma podzolica*, *Solicoccozyma phenolica* y *Solicoccozyma aerea*, y junto con los órdenes Tremellales y Filobasidiales llegaron a componer hasta el 58% de los aislamientos (Mestre et al., 2011; de Garcia et al; 2014). Algo similar para lo encontrado en los suelos de las diferentes zonas muestreadas de este trabajo, en donde dominaron las levaduras del género *Solicoccozyma*

y *Naganishia*. Las especies dentro de estos géneros poseen algunas características que podrían facilitar su desarrollo en suelos, como la producción de cápsulas de polisacáridos que permiten a las levaduras secuestrar y concentrar nutrientes (Fonseca & Inácio, 2006), y cuyos polisacáridos externos podrían desempeñar un papel importante en los procesos de agregación del suelo (Mestre et al., 2011).

Los estudios de hongos de suelo desnudo/permafrost son relativamente pocos, especialmente los relacionados al Monte Tronador, cuando se los compara a estudios de hongos de suelos de bosques. En otros sustratos estudiados en la Patagonia, asociados mayormente a bosques nativos, se pudo estudiar otros patrones con respecto a la prevalencia de hongos Dikarya. En el filoplano, por ejemplo, predominan los hongos ascomicéticos y el género más frecuentemente aislado fue *Aureobasidium* (Muñoz et al., 2010). Fonseca e Inácio (2006) mencionaron que *Aureobasidium pullulans* aparentemente es ubicua en la superficie de plantas aéreas en regiones templadas o subtropicales en todo el mundo, así como en ambientes extremos fríos o salinos (Zalar et al., 2008; Gostinčar et al., 2019).

El hielo conforma un ambiente habitable para los microorganismos cuando una fracción de él permanece descongelada; es decir, cuando los procesos físico-químicos mantienen el agua en su forma líquida a temperaturas que están por debajo del punto de congelación, llegando incluso a -20°C. Para ello, los microorganismos que están activos dentro de la matriz de hielo tienen adaptaciones únicas al frío, incluidas alteraciones en las composiciones de lípidos de la membrana que protegen contra la rigidez, proporcionando una interfaz flexible con el medio ambiente para la absorción continua de nutrientes y la liberación de productos (Boetius et al., 2015). La criosfera sustenta diversas comunidades biológicas en la superficie de los glaciares y capas de hielo continentales (de Garcia et al., 2012; Anesio et al., 2009; Hotaling et al., 2017), debajo de ellos (Hamilton et al., 2013), en su agua de deshielo (de García et al., 2007; Hotaling et al., 2019), en permafrost (Jansson & Tas, 2014) y en hielo marino (de Garcia et al., 2012; Boetius et al., 2015), siendo los grupos de microorganismos eucariotas más abundantes en el hielo glaciar, se encuentran los hongos, junto con las algas verdes (Anesio, 2015).

Se registró por primera vez para la zona del Parque Nacional y la Patagonia Argentina la presencia de hongos quitridios y levadura del género *Malassezia*. Los quitridios ya han demostrado poseer tolerancia a los ciclos de congelamiento y descongelamiento en condiciones de laboratorio (Gleason, et al., 2008, 2010). Así mismo han sido aislados de zonas de alta montaña de Colorado, Suiza, Francia y Nepal (Freeman et al., 2009; Naff et al., 2013), de hielo marino del ártico (Killias et al., 2020) y presentado alta abundancia en lagos congelados de la Antártida (Rojas-Jimenez et al., 2017). Se puede considerar que la influencia del glaciar y del

agua de deshielo del monte Tronador, proveen condiciones favorables para la dispersión y desarrollo de los quitridios en el suelo, y que las condiciones presentes en las diferentes capas del glaciar son adecuadas para su supervivencia.

Por otro lado, *Malassezia* spp., cuya secuencia fue detectada en una de las muestras de hielo del glaciar Castaño Overa, son especies que se pensaba que estaban específicamente asociadas a diversos mamíferos. Sin embargo, otros estudios independientes de cultivo revelaron su presencia en ecosistemas marinos y terrestres muy diversos, tales como, suelos antárticos, sedimentos de aguas profundas, respiraderos hidrotermales de aguas profundas, entre otros (Amend, 2014). Debido a que la secuencia de ADN ribosómico de *Malassezia* en los estudios ambientales son casi idénticas a las secuencias de aislados asociados con humanos, lo que sugiere que o bien divergieron en sus hábitats muy recientemente o que son capaces de una gran adaptabilidad y una alta tolerancia al estrés que les permite colonizar ambientes tan diferentes como la piel humana y el hielo subglacial (Perini et al., 2019). El hecho de que esta especie no haya sido detectada por cultivo puede deberse a su lento crecimiento y naturaleza lipofílica, que generalmente no se tiene en cuenta en los medios de cultivo estándar (Kurtzman et al., 2011).

Hasta el momento no se registra el aislamiento en laboratorio de hongos quitridios o levaduras del género *Malassezia* spp., para ambientes del Monte Tronador en particular o la Patagonia Argentina en general. Sería interesante en un futuro diseñar medios de cultivos específicos para intentar su aislamiento y poder determinar qué especies se encuentran en estos ambientes extremos, para intentar determinar sus características y qué rol cumplen estos ambientes.

Las levaduras cultivables que mostraron mayor dominancia en nuestro trabajo, son las del phylum Basidiomycetes, entre las especies de levaduras aisladas de los ambientes fríos, los géneros *Glaciozyma*, *Leucosporidium*, *Mrakia*, *Naganishia* y *Goffeauzyma* son en promedio las más frecuentemente reportadas, aunque no siempre las únicas en la criosfera (Connell et al., 2008; de García et al, 2014; Buzzini et al., 2018). A pesar de numerosos estudios que destacan su capacidad superior para colonizar ambientes fríos, estas especies también han sido reportadas en hábitats no extremos. La colonización y la dispersión de levaduras entre hábitats extremos de forma permanente (por ejemplo, criosfera) y temporal (por ejemplo, suelo forestal en la estación fría) aún no se ha estudiado. Aunque demuestran una mayor adaptabilidad fisiológica que otras especies (por ejemplo, producción de enzimas activas al frío, proteínas de choque por frío, membranas celulares con un alto grado de insaturación de ácidos grasos, etc.), poco se sabe sobre las bases moleculares de su adaptación al frío (Buzzini et al, 2018).

En trabajos previos de ambientes glaciarios del Monte Tronador se aislaron varias especies del género *Leucosporidium* (de Garcia et al., 2012, 2015; Libkind, et al., 2017), en este trabajo este género estuvo presente en los análisis de metagenómica, pero no se encontró en ninguno de los aislamientos identificados. Como ya se discutió en el Capítulo 2, el submuestreo de ciertos grupos de levaduras característicos de la zona, puede deberse a dos razones principales. La primera de ellas la metodología empleada para el agrupamiento morfológico de los aislamientos: después de todo las especies de levaduras del género *Leucosporidium* podrían llegar a confundirse con otras especies o grupos, ya que no presentan ninguna característica distintiva como color, morfología de la colonia y/u otras estructuras exclusivas (Kurtzman et al., 2011). La segunda podría ser las condiciones de cultivo durante y después del aislamiento, que, aunque se priorizó el uso de condiciones que permitan el aislamiento de levaduras psicrófilas/psicrotolerantes (de Garcia et al; 2007; 2012; Kurtzman et al., 2011), podrían aun así estar afectando la capacidad de crecimiento de este y otro tipo de levaduras extremotolerantes.

A pesar de las limitaciones de los métodos de cultivo, que no permitieron aislar levaduras que fueron registradas por la metagenómica, como se mencionó para *Leucosporidium*, y también para el caso en particular de las secuencias de Microbotryomycetes de los ambientes englacial y supraglacial. Los métodos de cultivo sí permitieron el aislamiento de posibles especies nuevas en sustratos como el suelo desnudo, que contribuirán a la base de datos de secuencias y con ello a ir completando la información y mejorando la identificación de grupos taxonómicos relevantes, pero poco estudiados. En términos generales, la biodiversidad, tanto de levaduras cultivables como de metagenómica, fue alta y para ambas metodologías se obtuvieron resultados complementarios.

Cuando analizamos los gremios a los que pertenecen las especies identificadas, la gran mayoría corresponden a saprobios para todos los sustratos y los sitios, seguido por las categorías, variable y simbioses. Sin embargo, cuando observamos la abundancia de secuencias, el suelo presenta un aumento en la categoría “variable”, al igual que el hielo del Ventisquero Negro. En estudios que se relacionan con suelos ultraoligotróficos rocosos de la Antártida (Coleine, et al., 2018), la tundra ártica (Semenova-Nelsen, 2016) o acuíferos alemanes (Nawaz, et al., 2018), los gremios mayoritarios correspondieron a saprobios y simbioses (líquenes). En nuestro trabajo, para poder estudiar los gremios, tuvimos que crear una categoría que representa a los géneros y/o especies funcionalmente diversos (variables), ya que muchos hongos, y en especial las levaduras, poseen estrategias que varían incluso entre cepas (Zhang & Xu, 2018).

Aunque la plataforma *FUNguild* presenta limitaciones asociadas a una mayor información con respecto a las especies de suelos boscosos que a las especies de perfiles extremófilos, es una herramienta muy útil para la descripción de los diferentes ambientes y posteriores comparaciones. Sería importante agregar estudios estacionales, ya que, en bosques templados de la Patagonia argentina, se ha visto incremento de diferentes gremios según la estación (Carrón et al., 2020), por lo que podríamos esperar diferencias en la composición de las comunidades con respecto a los cambios de temperatura, deshielo y humedad del sistema glaciar del Monte Tronador.

Cuando se vislumbran las conexiones entre los diferentes ecosistemas asociados a los glaciares, es importante destacar los vínculos espaciales entre hábitats criosféricos; por ejemplo, la producción primaria y la deposición atmosférica que ocurren en la superficie de los glaciares (zona supraglacial), la cual influye en los procesos biogeoquímicos debajo de ellos en la zona subglacial. Influyen también, en última instancia, en los cuerpos de agua que reciben los aportes de sedimentos y agua de deshielo del glaciar (Zawierucha et al., 2015; Hotaling et al., 2019). Los ambientes glaciares de montaña son particularmente vulnerables a los cambios previstos por los efectos del cambio climático, ya que su crecimiento o recesión dependen directamente de las temperaturas y precipitaciones a lo largo del tiempo (Zemp et al. 2015, Roe et al. 2017). Por lo que este trabajo muestra la importancia del estudio de las comunidades que habitan los ambientes glaciares, no solo por la potencialidad biológica que poseen, si no también porque muestra el registro de las especies más relevantes en estos ambientes, muchos de los cuales, probablemente desaparezcan en los próximos años. Como resultado, se puede esperar la disminución de la biodiversidad de microorganismos extremófilos presentes en ellos, junto con la modificación de las redes trófica que sustentan.

#### **4.5 CONCLUSIONES PARCIALES**

- Las condiciones físico-químicas de los glaciares Castaño Overa, Ventisquero Negro y su ambiente circundante son oligotróficas.
- La composición de las comunidades de hongos estudiadas de los ambientes del cerro Tronador no presenta correlación con las condiciones físico-químicas relevadas.
- Las herramientas dependientes de cultivo y secuenciación masiva de amplicones capturaron al grupo *Dykaria* como mayoritario, tal como lo registrado anteriormente para los métodos de cultivo en estos ambientes.

- Los resultados de los métodos dependientes de cultivo y metagenómica utilizados en este trabajo son complementarios.
- El gremio de hongos saprobios domina en los glaciares estudiados del Monte Tronador.

## **CAPÍTULO V**

### **PRODUCCIÓN DE LÍPIDOS EN LEVADURAS EXTREMOTOLERANTES**

## 5.1 INTRODUCCIÓN

La industria oleoquímica tradicional está basada en las grasas animales y aceites vegetales, de las que se puede obtener, aceites comestibles, detergentes, lubricantes, biodiesel, plásticos, revestimientos y otros productos (Marella et al., 2018; Msanne et al., 2020). Los aceites vegetales, que consisten principalmente en triacilgliceroles (TAG), son fuentes importantes de calorías y ácidos grasos esenciales en la dieta humana. Están compuestos principalmente por ácido oleico, linoleico, omega-6, omega-3 y ácido  $\alpha$ -linolénico (Rehkamp, 2016). Las cantidades relativas de estos ácidos grasos varían entre los diferentes aceites vegetales, lo que influye tanto en su aporte nutricional, como en su prospección como biocombustible (Garg & Jain, 2020). Estos perfiles lipídicos obtenidos en la industria tradicional son similares a los producidos por microorganismos oleaginosos (Beopoulos et al., 2009).

Los microorganismos se consideran oleaginosos cuando tienen la capacidad de acumular dentro de la célula desde un 20% y hasta 80% de lípidos por biomasa seca. Estos lípidos se obtienen en fase de crecimiento estacionario, bajo limitaciones de nutrientes, por ejemplo, nitrógeno o fósforo, y con un exceso simultáneo de fuente de carbono (Papanikolau et al., 2011a). Los microorganismos oleaginosos generalmente producen aceites unicelulares (AU), estos son lípidos de almacenamiento intracelular que comprenden a los triacilgliceroles (TAG). Existen bacterias, microalgas y hongos (levaduras y hongos filamentosos) oleaginosos, y cada grupo presenta su perfil particular de ácidos grasos, lo que los hace muy adecuados para diversas aplicaciones industriales (Ochsenreither et al., 2016).

Una ventaja, sobre la producción de aceites vegetales, de la producción de lípidos microbianos por parte de organismos fúngicos, es que no depende de las estaciones, el clima y/o la ubicación geográfica. El cultivo se puede realizar utilizando una amplia gama de fuentes de carbono, por ejemplo, desechos de la industria alimentaria o fuentes de carbono renovables, en el caso de microalgas incluso CO<sub>2</sub>, no usa tierra cultivable, da como resultado altos rendimientos y se puede lograr con organismos genéticamente modificados que cambian la composición de ácidos grasos y mejoran la producción (Ward & Singh, 2005; Li Q. et al., 2008). Los principales productores de lípidos son los hongos, las levaduras y las algas, mientras que la producción en bacterias no es tan interesante en comparación (Wynn & Ratledge, 2005; Li Y. et al., 2010; Bellou et al., 2016).

En diversos estudios relacionados a los lípidos microbianos, se han identificado varios hongos, tanto filamentosos como levaduras, que pueden acumular más del 20% de su biomasa en forma de lípidos (Liang & Jiang, 2013). La presencia de levaduras oleaginosas en diferentes clados y

grupos taxonómicos permite inferir que esta característica puede estar relacionada a múltiples mecanismos de acumulación de aceites. La identificación de nuevas especies de levaduras y cepas, capaces de acumular altos niveles de lípidos intracelulares es, por tanto, deseable para ampliar el campo de levaduras candidatas que se utilizarán en estudios fundamentales y aplicados.

Las condiciones de cultivo que llevan a la acumulación de los lípidos microbianos son muy importantes. Se sabe que, cuando un nutriente como el nitrógeno se agota del medio de cultivo, se produce un cambio importante en el metabolismo, se suprime la síntesis de proteínas y se activa la síntesis y acumulación de ácidos grasos. Los factores genéticos y metabólicos responsables de este cambio se han estudiado en especies seleccionadas de levaduras oleaginosas, particularmente en los géneros ascomicetos *Lipomyces* (Liu et al., 2011) y *Yarrowia* (Beopoulos et al, 2009).

Debido a las condiciones de cultivo necesarias (alta relación C/N) para desencadenar la acumulación de lípidos, es económicamente eficaz utilizar materias primas de bajo costo, como el glicerol (Chatzifragkou et al., 2011; Tchakouteu et al., 2015), azúcares comerciales (Chatzifragkou et al., 2010), material vegetal (Economou et al., 2011; Matsakas et al., 2015) y materiales lignocelulósicos (Zeng et al., 2013). Dentro del sector de alimentos y bebidas, la industria cervecera es una sección muy importante de la economía de muchos países. Actualmente, la cerveza es la quinta bebida más consumida en el mundo (Fillaudeau et al., 2006; Hultberg & Bodin, 2017). El proceso de elaboración de la cerveza consume grandes cantidades de agua y genera entre 3 y 10 L de aguas residuales por 1 L de cerveza producida (Hultberg & Bodin, 2017; Dias et al., 2020). Por lo general, los efluentes cerveceros tienen un alto nivel de contaminantes orgánicos (azúcares, proteínas, amoníaco, fosfatos, entre otros) que requieren remediación, para evitar la eutrofización de los cuerpos de agua, que a su vez los convierten en recursos interesantes para su reutilización como medios de cultivo (Dias et al., 2019).

La mayoría de las pequeñas cervecerías no tienen ningún sistema de tratamiento de aguas residuales y descargan sus efluentes directamente al sistema de alcantarillado sin ningún tratamiento (Simate et al., 2011). Por lo tanto, es necesario prestar atención a posibles alternativas de uso y tratamiento de los efluentes de la cervecería, en particular cuando abundan productores en regiones cercanas a ambientes naturales protegidos como es el caso del Parque Nacional Nahuel Huapi (Patagonia, Argentina) donde coexisten naturaleza con producción de cerveza. En este capítulo realizaremos una búsqueda de las levaduras potencialmente oleaginosas obtenidas en este trabajo, empleando como medio de cultivo efluente cervecero.

Las levaduras con mayor acumulación de ácidos grasos serán seleccionadas y sus perfiles de ácidos grasos analizados.

## 5.2 MATERIALES Y MÉTODOS

Se evaluó la producción de vacuolas lipídicas intracelulares de 19 aislamientos de levaduras de ambientes glaciarios del Monte Tronador obtenidas en este trabajo. El criterio de selección de estas levaduras se basó en los resultados preliminares, la relación filogenética con levaduras oleaginosas conocidas y además el sustrato/sitio de muestreo también fue tomado en cuenta (Tabla 5.1).

La producción de vacuolas lipídicas se evaluó luego del crecimiento en medio de cultivo GMY (glucosa 40 g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 8 g/L, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0,5 g/L, extracto de levadura 3 g/L, pH 5.5) con alta relación C/N (~49), (Filippucci et al., 2016), cada cultivo se realizó por triplicado (en la siguiente sección se detallan las condiciones de cultivo).

En base a la información obtenida en el primer ensayo con 19 levaduras en medio GMY (*Ensayo preliminar*), se procedió a ampliar la selección a un total de 50 levaduras (*Ensayo extendido*), donde se evaluó en efluente cervecero su capacidad de crecimiento, producción y acumulación de vacuolas lipídicas, cada cultivo se realizó por triplicado. El efluente cervecero utilizado para estos ensayos correspondió al agua de lavado, utilizado luego del hervido del mosto de una cerveza de tipo Kolsch (8-11 °Bx), este efluente fue provisto por la Cervecería Manush, cervecería artesanal de San Carlos de Bariloche. Dicho efluente fue diluido hasta 5°Bx (equivale a 5% m/v de azúcares), para lograr una concentración de azúcares similar a la de los medios de cultivo utilizados en el estudio de levaduras de ambientes fríos ultra-oligotróficos (MYP, YM). La concentración final de azúcares se determinó mediante HPLC Waters 600E, con la columna para azúcares Rezex<sup>TM</sup> (ROA-Organic Acid, 300 x 7,8 mm) acoplada a detector de índice de refracción controlado por el software Empower 2.

Para los ensayos con efluente, se utilizaron 4 litros, provenientes de 2 *batch* diferentes, de los que se analizó la composición de carbono, nitrógeno y fósforo, estas no presentaron diferencias significativas, por los que se consideraron como un mismo medio, los datos de la composición de cada *batch* se muestran en el Anexo 5.1.

### 5.2.1 PRODUCCIÓN DE BIOMASA Y LÍPIDOS

Se utilizaron medios convencionales para el cultivo de las levaduras estudiadas (YM, cultivo 48-72 hs), para los repiques iniciales en medio sólido, así como para el preinóculo en medio

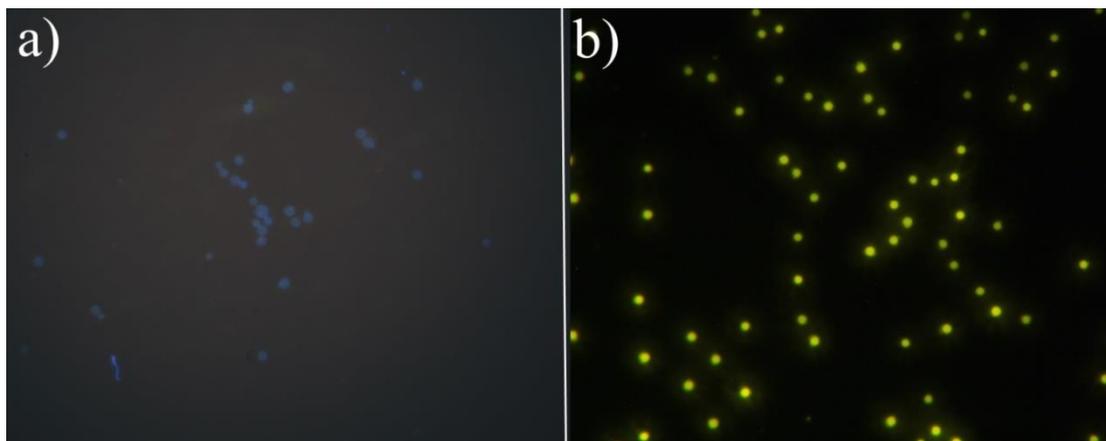
líquido. El preinóculo de cada cepa fue sembrado por triplicado en Erlenmeyers de 50 mL con volumen final de 10 mL, con una concentración de células aproximadamente de  $1 \times 10^6$  cel/mL ( $DO_{630i}=0,1$ ). Para ello se estandarizó el número de células por recuento directo en cámara de Neubauer correspondiente a la densidad a óptica a 630nm para cada cepa y luego se utilizó la DO para realizar todas las mediciones.

Cada cepa seleccionada fue cultivada en 10 mL de medio GMY o efluente cervecero, según corresponda al ensayo preliminar o extendido respectivamente, en tubos falcon de 50 mL con agitación orbital (Shaker INFORS) a 180 rpm, durante 6 días, las levaduras con perfil psicrotolerante se cultivaron a 20°C y las psicrófilas a 10°C. Los perfiles de crecimiento de las levaduras se evaluaron en base a trabajos previos (Duo Saito, 2015; Favier, 2019) y se seleccionaron aislamientos representativos para corroborar dichos resultados, los mismos se muestran en la tabla suplementaria 5.2, Anexo 1. Cada día se registró el consumo de azúcares de cada cultivo, por medio de un refractómetro Alla France (0-32 °Bx con precisión de 0.2 °Brix).

Al finalizar el cultivo (tanto en el ensayo preliminar como en el extendido) se observaron las levaduras al microscopio y se realizó tinción con Rojo Nilo para observar las vacuolas lipídicas. Para ello se centrifugaron 50-100  $\mu$ l de cultivo por 3 min a 1000 rpm, se descartó el sobrenadante y se resuspendieron en un volumen igual de una solución preparada con 950  $\mu$ l de PBS 1x, 2  $\mu$ l de Rojo Nilo 5 mM (preparado en acetona) y 50  $\mu$ l de DMSO 50% preparado en PBS 1x. Se incubaron 5 minutos en oscuridad, y luego se observó entre porta y cubreobjeto en un microscopio Olympus BX40 con un filtro UV-MNB2 a 575-580 nm. Se tomó como acumulación positiva si el total de las células observadas presentaban vacuolas lipídicas (Figura 5.1). La composición de cada buffer y solución utilizada en este capítulo se detallan en el Anexo 5.1.

**Figura 5.1: Microfotografías de levaduras (a) no productoras de lípidos y (b) productoras de lípidos, teñidas con rojo Nilo**

Aumento 40x.



Al efluente cervecero utilizado para el ensayo extendido (50 aislamientos), se le analizó la Demanda Química de Oxígeno (DQO), el contenido de Nitrógeno mediante el método de Kjeldahl Nitrogen, (N), y el contenido de fósforo total (P). Los análisis se realizaron, por triplicado, tanto al efluente antes del cultivo, como a los sobrenadantes libres de células al final del cultivo de cada una de las cepas. Con los datos de carbono se pudo cuantificar el sustrato consumido (S). Estos análisis fueron llevados a cabo por parte del Grupo de Suelos del Centro regional Universitario Bariloche, Universidad Nacional del Comahue.

Finalizado el ensayo extendido (50 aislamiento, con efluente cervecero), se seleccionaron 5 aislamientos de levaduras que presentaron los mayores valores de consumo de azúcares y producción de vacuolas lipídicas, para la realización de un *ensayo selectivo* a mayor escala. Estas cepas fueron cultivadas, por triplicado, en un volumen de 400 mL de efluente cervecero en Erlenmeyers de 2 L durante 6 días. Se tomaron los datos de consumo de azúcares cada día con refractómetro. Una vez finalizado cada cultivo, se separó la biomasa en diferentes tubos falcon para cuantificar su producción, determinar gravimétricamente la producción de lípidos y realizar el análisis de los perfiles lipídicos por GC-MS.

Para cuantificar la biomasa obtenida, se tomaron 4 mL de cada cultivo en tubos falcon, por triplicado, cada tubo se centrifugó dos veces por 10 min a 3000 rpm, las células se lavaron con agua destilada en el paso intermedio. La biomasa obtenida se resuspendió en 2 mL de agua destilada para trasvasar las muestras en tubos Khan, previamente secados y pesados. Se llevaron los tubos a 85°C en estufa, por 48 hs o hasta obtener peso constante. Se registró el peso final para obtener la producción gravimétrica de biomasa (X).

Para la extracción de lípidos totales se utilizó el método publicado por Viñarta et al. (2016) con modificaciones. Se centrifugaron 10 mL de cada cultivo en tubos falcon hasta formar un pellet y se retiró el sobrenadante. Se agregó 4 mL de HCl 4N por 60 min a 60°C en baño seco a cada pellet para realizar una lisis ácida al pellet. Luego se agregaron 6 mL de solvente de extracción (Metanol - Cloroformo 1:2; Sintorgan, grado A.C.S.) por 30 min en agitación. Se retiró la fase orgánica, constituida por la fracción de cloroformo, se la transfirió a un tubo khan previamente pesado y se la secó bajo corriente de N<sub>2</sub> hasta la formación de un pellet de lípidos. Luego se pesó el tubo nuevamente, para obtener el valor de producción gravimétrica de lípidos totales (YI). Este ensayo se realizó por triplicado.

Con los datos de consumo de sustrato (S), producción de biomasa (X) y producción de lípidos (YI), se calculó la productividad en base a los coeficientes de lípidos/carbono consumido (YI/S) y el rendimiento (% YI/X) en base a la producción de lípidos/biomasa (Tabla Suplementaria 5.3).

### 5.2.2 CARACTERIZACIÓN DE LOS PERFILES DE ÁCIDOS GRASOS

Los perfiles lipídicos se registraron exclusivamente para el ensayo selectivo, por medio de GC-MS. Para ello se realizó la extracción de lípidos sin mediar lisis ácida en 10 mL de cultivo. Este volumen se centrifugó a 3000m rpm por 5 minutos, el pellet obtenido fue resuspendido en 0,5 mL de agua destilada y luego fue trasvasado a un tubo de vidrio largo. Se agregaron 6 mL de metanol-cloroformo 2:1 con BHT (Butilhidroxitolueno) 50-100 ppm, se agitó en vortex durante 1 h y se conservó por 24 h a - 20°C. Luego, se centrifugó a 3000 rpm por 5 minutos, el pellet obtenido se resuspendió con vortex, añadiendo 2 mL de cloroformo y 2 mL de agua destilada para formar una emulsión por agitación. Una vez obtenida la emulsión, se centrifugó por 3 minutos y se descartó la fase acuosa superior, se lavó con 4 mL de KCl 2M, y se pasó la fase orgánica inferior a un nuevo tubo, en el cual se evaporó bajo corriente de N<sub>2</sub>. Cada extracción fue realizada por triplicado.

Con los lípidos obtenidos se procedió a realizar la derivatización y posterior caracterización por GC-MS. La fase orgánica obtenida en el punto anterior se resuspendió en 2 mL de metanol anhidro (Sintorgan, grado plaguicida), a la que se agregó 10 gotas de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (98% m/m), y se incubó a 80 °C durante 1 h. Una vez frío se añadió 1,5 mL de NaCl y 3,5 mL de hexano, se centrifugó a 3000 rpm por 10 min y se trasvasó la fase de hexano (superior) a un tubo limpio. Se repitió la extracción con hexano y se juntaron las fracciones. Por último, se evaporó el hexano en vial bajo corriente de nitrógeno, y los metil-ésteres de ácidos grasos obtenidos se

conservaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  para ser enviados al servicio de análisis de GC-MS del Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario - IBR (Rosario).

### 5.3 RESULTADOS

#### 5.3.1 PRODUCCIÓN LIPÍDICA – ENSAYO PRELIMINAR

El análisis realizado en el ensayo preliminar (19 aislamientos, 15 especies diferentes) para constatar la producción de vacuolas lipídicas en cultivo GMY, mostró que el 52,6% (10 aislamientos) tuvieron la capacidad de acumulación de lípidos en estas condiciones. Estos aislamientos correspondieron a 7 especies diferentes (*Cystobasidium laryngis*, *Dioszegia patagonica*, *Mrakia frigida*, *Solicoccozyma* sp. I, *Tausonia pullulans*, *Udeniomyces kanasensis* y *Vishniacozyma victoriae*). *Vishniacozyma victoriae* fue la especie con más aislamientos analizados (4) donde 3 presentaron acumulación de lípidos y una no. De los géneros *Dioszegia* y *Solicoccozyma* se analizaron 2 especies diferentes de cada género, en ambos casos una especie presentó producción (*D. patagonica* y *Solicoccozyma* sp. I) y la otra no (*D. statzelliae* y *S. aeria*) (Tabla 5.1).

**Tabla 5.1: Aislamientos utilizados en el ensayo preliminar y su producción de vacuola lipídica**

| Cepa     | Taxón                            | Lípidos        | Sustrato |
|----------|----------------------------------|----------------|----------|
| CRUB2120 | <i>Cystobasidium laryngis</i>    | Productores    | Nieve    |
| CRUB2122 | <i>Dioszegia patagónica</i>      |                | Nieve    |
| CRUB2134 | <i>Mrakia frígida</i>            |                | Nieve    |
| G1A3.5   | <i>Mrakia frígida</i>            |                | Nieve    |
| CRUB2155 | <i>Solicoccozyma</i> sp. I       |                | Nieve    |
| CRUB2156 | <i>Tausonia pullulans</i>        |                | Nieve    |
| CRUB2157 | <i>Udeniomyces kanasensis</i>    |                | Hielo    |
| G2B2.4   | <i>Vishniacozyma victoriae</i>   |                | Hielo    |
| CRUB2165 | <i>Vishniacozyma victoriae</i>   |                | Nieve    |
| G4A1.10  | <i>Vishniacozyma victoriae</i>   |                | Nieve    |
| G2A2.3   | <i>Vishniacozyma victoriae</i>   | No productores | Nieve    |
| G4A5.15  | <i>Aureobasidium pullulans</i>   |                | Hielo    |
| G3A2.11  | <i>Coniochaeta polymorpha</i>    |                | Nieve    |
| G1A1.3   | <i>Dioszegia statzelliae</i>     |                | Nieve    |
| G4A1.13  | <i>Kabatiella bupleuri</i>       |                | Nieve    |
| G2B1.8   | <i>Naganishia adeliensis</i>     |                | Hielo    |
| CRUB2145 | <i>Naganishia adeliensis</i>     |                | Hielo    |
| G1A1.2   | <i>Solicoccozyma aeria</i>       |                | Nieve    |
| G1A1.4   | <i>Sporobolomyces ruberrimus</i> |                | Nieve    |

## 5.3.2 PRODUCCIÓN LIPÍDICA – ENSAYO EXTENDIDO

Luego del análisis preliminar en medio GMY, se seleccionó un aislamiento de cada género que acumuló lípidos (7 aislamientos), para evaluar el crecimiento (consumo de los azúcares total) y producción de vacuolas lipídicas en el efluente cervecero. Además de estas 7 cepas se seleccionaron 43 aislamientos, de 16 géneros, para incluir en el ensayo extendido (50 aislamientos en total) (Tabla 5.2). Los géneros se seleccionaron en base a la bibliografía y lo reportado respecto a la producción de lípidos para los grupos taxonómicos disponibles en este trabajo, en base a esto se incluyeron aislamientos del género *Naganishia* en el análisis en efluente cervecero. Además de tomar en cuenta la taxonomía para la selección de las cepas, también se consideró el sustrato y lugar donde cada una de las cepas fue aislada. En relación a los resultados obtenidos con respecto a la producción de vacuolas lipídicas y el sustrato/sitio de aislamiento de las cepas estudiadas no observamos ningún patrón o relación en este sentido (Tabla 5.2).

**Tabla 5.2: Cepas seleccionadas para evaluar la producción de vacuolas lipídicas**

Efluente: Si: Aislamientos que mostraron vacuolas lipídicas en medio efluente cervecero, No: aislamientos que no mostraron vacuolas lipídicas en medio efluente cervecero; Los aislamientos marcados en negrita son los que presentaron vacuolas lipídicas en el ensayo preliminar (medio GMY), los marcados en rojo son los seleccionados para el ensayo selectivo.

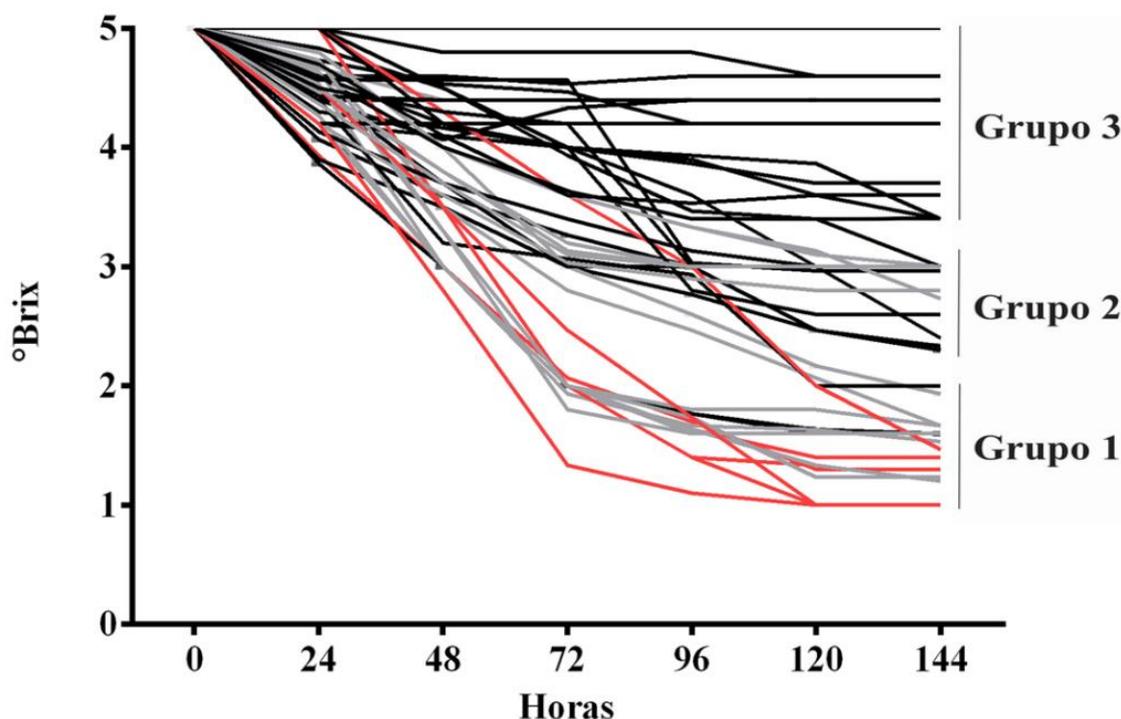
| Cepa            | Especie                               | Efluente |         | Lugar y Sustrato |
|-----------------|---------------------------------------|----------|---------|------------------|
|                 |                                       | Consumo  | Lípidos |                  |
| CRUB2120        | <i>Cystobasidium laryngis</i>         | No       | No      | CO – Nieve       |
| CRUB2122        | <i>Dioszegia patagonica</i>           | No       | No      | CO – Nieve       |
| CRUB2123        | <i>Filobasidium magnum</i>            | Si       | No      | VN – Hielo       |
| CRUB2124        | <i>Filobasidium magnum</i>            | Si       | No      | VN – Agua        |
| CRUB2125        | <i>Goffeauzyma gastrica</i>           | Si       | Si      | CO – Hielo       |
| CRUB2126        | <i>Goffeauzyma gilvescens</i>         | Si       | No      | CO – Suelo       |
| CRUB2127        | <i>Holtermanniella festucosa</i>      | Si       | No      | RCO – Suelo      |
| CRUB2128        | <i>Holtermanniella takashimae</i>     | Si       | No      | RCO – Suelo      |
| CRUB2129        | <i>Holtermanniella takashimae</i>     | Si       | No      | RCO – Suelo      |
| <b>CRUB2130</b> | <b><i>Holtermanniella wattica</i></b> | Si       | Si      | VN – Suelo       |
| <b>CRUB2131</b> | <b><i>Holtermanniella wattica</i></b> | Si       | Si      | VN – Suelo       |
| CRUB2132        | <i>Hormonema</i> sp.                  | Si       | No      | RCO – Suelo      |
| CRUB2133        | <i>Kabatiella bupleuri</i>            | Si       | Si      | CO – Nieve       |
| CRUB2134        | <i>Mrakia frigida</i>                 | No       | No      | CO – Nieve       |
| CRUB2135        | <i>Mrakia hoshinonis</i>              | No       | No      | CO – Nieve       |
| CRUB2136        | <i>Naganishia adeliensis</i>          | No       | No      | VN – Suelo       |
| CRUB2137        | <i>Naganishia adeliensis</i>          | Si       | No      | VN – Suelo       |
| CRUB2138        | <i>Naganishia adeliensis</i>          | No       | No      | VN – Suelo       |
| CRUB2139        | <i>Naganishia adeliensis</i>          | No       | No      | VN – Hielo       |
| CRUB2140        | <i>Naganishia antarctica</i>          | Si       | No      | CO – Suelo       |

|                 |                                       |    |    |             |
|-----------------|---------------------------------------|----|----|-------------|
| CRUB2141        | <i>Naganishia diffluens</i>           | Si | No | RCO – Suelo |
| CRUB2142        | <i>Naganishia diffluens</i>           | Si | Si | RCO – Suelo |
| CRUB2143        | <i>Naganishia friedmannii</i>         | Si | Si | CO – Hielo  |
| CRUB2144        | <i>Naganishia friedmannii</i>         | Si | No | CO – Hielo  |
| CRUB2145        | <i>Naganishia liquefaciens</i>        | No | No | CO – Hielo  |
| CRUB2146        | <i>Naganishia liquefaciens</i>        | Si | Si | CO – Hielo  |
| CRUB2147        | <i>Rhodotorula mucilaginosa</i>       | No | No | CO – Hielo  |
| CRUB2148        | <i>Rhodotorula mucilaginosa</i>       | No | No | VN – Suelo  |
| CRUB2149        | <i>Rhodotorula mucilaginosa</i>       | No | No | CO – Nieve  |
| CRUB2150        | <i>Rhodotorula mucilaginosa</i>       | Si | No | RCO – Agua  |
| <b>CRUB2153</b> | <b><i>Solicoccozyma aeria</i></b>     | Si | Si | CO – Suelo  |
| CRUB2154        | <i>Solicoccozyma gelidoterrea</i>     | Si | Si | CO – Suelo  |
| <b>CRUB2155</b> | <b><i>Solicoccozyma sp. I</i></b>     | Si | Si | CO – Nieve  |
| <b>CRUB2156</b> | <b><i>Tausonia pullulans</i></b>      | Si | Si | CO – Nieve  |
| <b>CRUB2157</b> | <b><i>Udeniomyces kanasensis</i></b>  | No | No | CO – Hielo  |
| CRUB2158        | <i>Udeniomyces kanasensis</i>         | No | No | VN – Suelo  |
| CRUB2159        | <i>Vanrija albida</i>                 | Si | Si | VN – Agua   |
| CRUB2160        | <i>Vanrija albida</i>                 | Si | Si | VN – Agua   |
| <b>CRUB2161</b> | <b><i>Vanrija albida</i></b>          | Si | Si | VN – Agua   |
| CRUB2162        | <i>Vanrija albida</i>                 | Si | Si | VN – Agua   |
| CRUB2163        | <i>Vanrija albida</i>                 | No | No | VN – Hielo  |
| CRUB2164        | <i>Vanrija albida</i>                 | Si | Si | VN – Agua   |
| <b>CRUB2165</b> | <b><i>Vishniacozyma victoriae</i></b> | Si | Si | CO – Nieve  |
| CRUB2166        | <i>Vishniacozyma victoriae</i>        | Si | Si | VN – Agua   |
| CRUB2167        | <i>Wickerhamomyces anomalus</i>       | Si | Si | RCO – Suelo |
| CRUB2168        | <i>Wickerhamomyces anomalus</i>       | Si | Si | RCO – Suelo |
| CRUB2169        | <i>Wickerhamomyces anomalus</i>       | Si | Si | RCO – Suelo |
| CRUB2170        | <i>Wickerhamomyces anomalus</i>       | Si | Si | CO – Suelo  |
| CRUB2171        | <i>Wickerhamomyces sp.</i>            | Si | Si | RCO – Suelo |
| CRUB2172        | <i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i>  | No | No | VN – Suelo  |

De las 50 cepas evaluadas en el ensayo extendido, 19 (38%) tuvieron un consumo de los azúcares del efluente igual o mayor al 60%, de estas, 14 cepas acumularon vacuolas (grupo 1, Figura 5.2), 16 cepas (32%) consumieron entre el 60% y el 40% de azúcares donde 7 acumularon vacuolas (grupo 2, Figura 5.2), y 15 (30%) presentaron un consumo inferior al 40% de azúcares, ninguna de estas cepas presentó acumulación de vacuolas (grupo 3, Figura 5.2). Las curvas de consumo de azúcares en efluente cervecero de todas las cepas analizadas se muestran en la Figura 5.2. Las curvas de color rojo muestran a las cepas con mayor consumo y producción de vacuolas lipídicas (que fueron seleccionadas para análisis posteriores), en color gris todas las cepas que presentaron vacuolas lipídicas y en color negro las cepas que no produjeron vacuolas.

**Figura 5.2: Cinética de consumo de azúcares de las levaduras seleccionadas a lo largo del cultivo en efluente (ensayo extendido)**

Eje x: horas de cultivo; Eje Y: Brix medidos (con grado inicial=5°Bx); curvas en color rojo: aislamientos seleccionados para el ensayo selectivo de producción de lípidos; curvas en color gris: aislamientos productores de vacuolas; curvas de color negro: aislamientos no productores. Se evaluó la desviación estándar para cada punto (en su mayoría los valores fueron igual a cero).

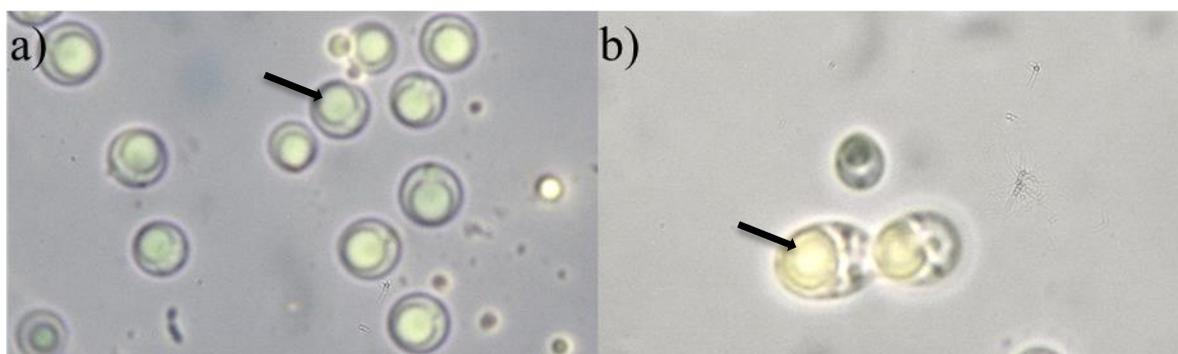


Las 21 levaduras que presentaron crecimiento en el efluente y presencia de vacuolas lipídicas (curvas de color rojo y gris) pertenecieron a 12 especies: *Goffeauzyma gastrica*, *Holtermanniella wattica*, *Kabatiella bupleuri*, *Naganishia diffluens*, *N. friedmannii*, *N. liquefaciens*, *Solicoccozyma aerea*, *S. gelidoterrea*, *Solicoccozyma* sp. I, *Tausonia pullulans*, *Vanrija albida*, *Vishniacozyma victoriae* y *Wickerhamomyces anomalus*. Dentro de estas hay 3 que también presentaron resultados positivos en el primer screening con medio GMY (*Solicoccozyma* sp. I, *Tausonia pullulans* y *Vishniacozyma victoriae*). Las 4 cepas restantes elegidas para el primer screening (*Cystobasidium laryngis*, *Dioszegia patagonica*, *Mrakia frigida* y *Udenomyces kanasensis*) no presentaron crecimiento en el efluente, y por ende tampoco la formación de vacuolas lipídicas. También, observamos que algunas especies consumieron los azúcares presentes en el efluente pero que no mostraron la acumulación de vacuolas lipídicas, como es el caso de *Filobasidium magnum*, *G. gilvescens*, *Holtermanniella festucosa*, *H. takashimae*, algunos aislamientos de *Naganishia adeliensis* y *N. antarctica*.

En base a los resultados obtenidos en los ensayos de consumo del efluente cervecero, se seleccionaron 7 cepas de levaduras (*Vishniacozyma victoriae* - CRUB2165, *Solicoccozyma aerea* - CRUB2153, *Tausonia pullulans* - CRUB2156, *Solicoccozyma* sp. I - CRUB2155, *Holtermanniella wattica* - CRUB2131, *Vanrija albida* - CRUB2161 y *Holtermanniella wattica* - CRUB2130), el criterio de selección incluyó los valores >60% de consumo de azúcares y producción de vacuolas lipídicas (Fig 5.3).

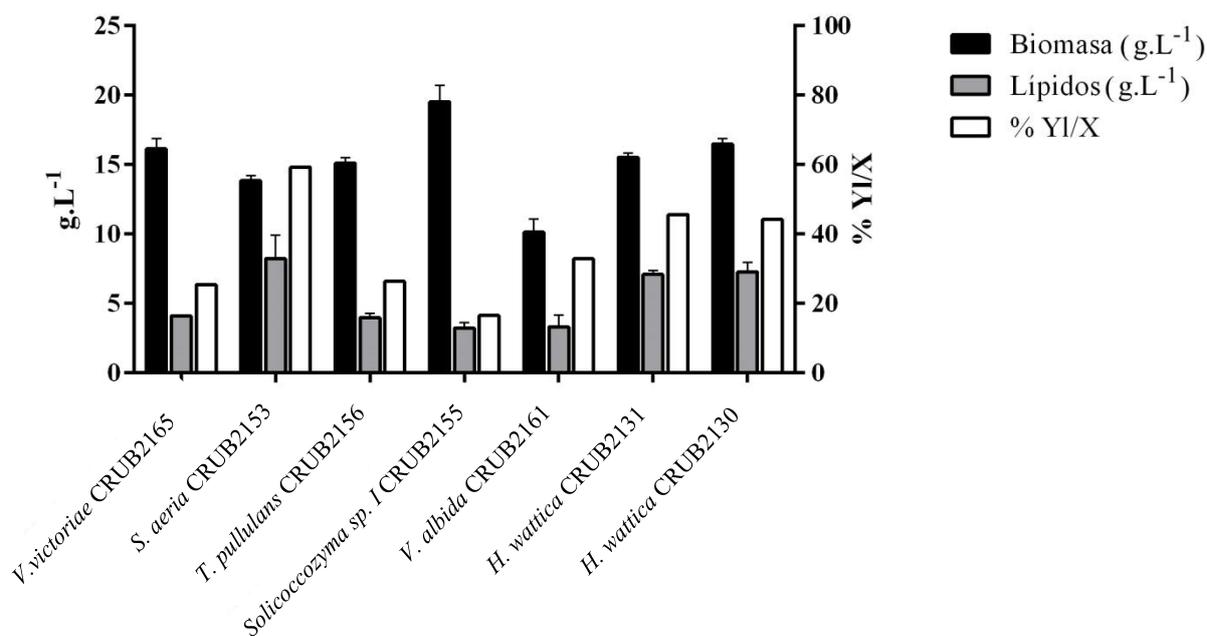
**Figura 5.3: Microfotografías ilustrando la producción de vacuolas lipídicas en dos cultivos de las levaduras seleccionadas para el análisis del perfil lipídico**

a) *Solicoccozyma aerea* - CRUB2153, y b) *Vishniacozyma victoriae* - CRUB2165, las flechas negras indican las vacuolas lipídicas de color amarillo/naranja características. Aumento 40x.



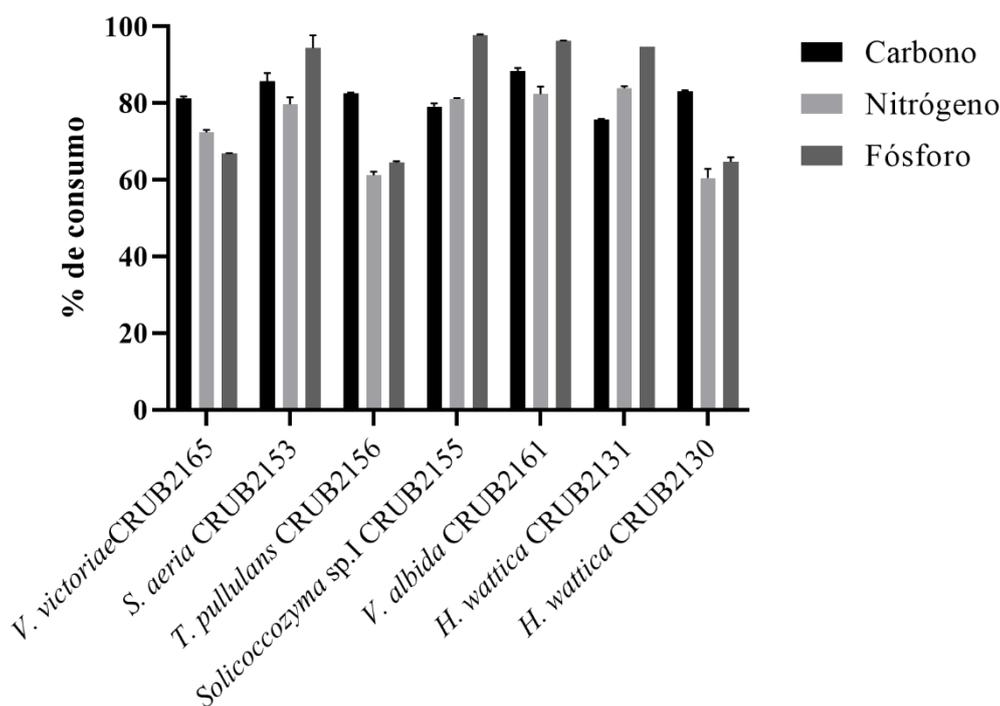
### 5.3.3 PRODUCCIÓN LIPÍDICA – ENSAYO SELECTIVO

De las levaduras seleccionadas, *Solicoccozyma* sp. I - CRUB2155 produjo la mayor cantidad de biomasa ( $19,5 \pm 1,2 \text{ g.L}^{-1}$ ) en comparación con el resto, seguida por *H. wattica* CRUB2130 ( $16,5 \pm 0,4 \text{ g.L}^{-1}$ ). Por otro lado, las levaduras que presentaron mayor cantidad de lípidos totales fueron *S. aerea* - CRUB2153 ( $8,2 \pm 1,69 \text{ g.L}^{-1}$ ), y los dos aislamientos de *H. wattica*: CRUB2130 ( $7,3 \pm 0,66 \text{ g.L}^{-1}$ ) y CRUB2131 ( $7,1 \pm 0,29 \text{ g.L}^{-1}$ ). El rendimiento de lípidos en función de la biomasa producida (% YI/X) fué acorde a lo obtenido para la producción de lípidos donde *S. aerea* - CRUB2153, % YI/X= 59,2; y *H. wattica* CRUB2131 y CRUB2130, % YI/X= 45,6 y % YI/X= 44,2, respectivamente, mostraron los mayores rendimientos. Todos los resultados de producción de lípidos, biomasa y % YI/X se muestran en la Fig 5.4.

**Figura 5.4: Producción de biomasa, lípidos y rendimiento (% YI/X) de las levaduras del ensayo selectivo**

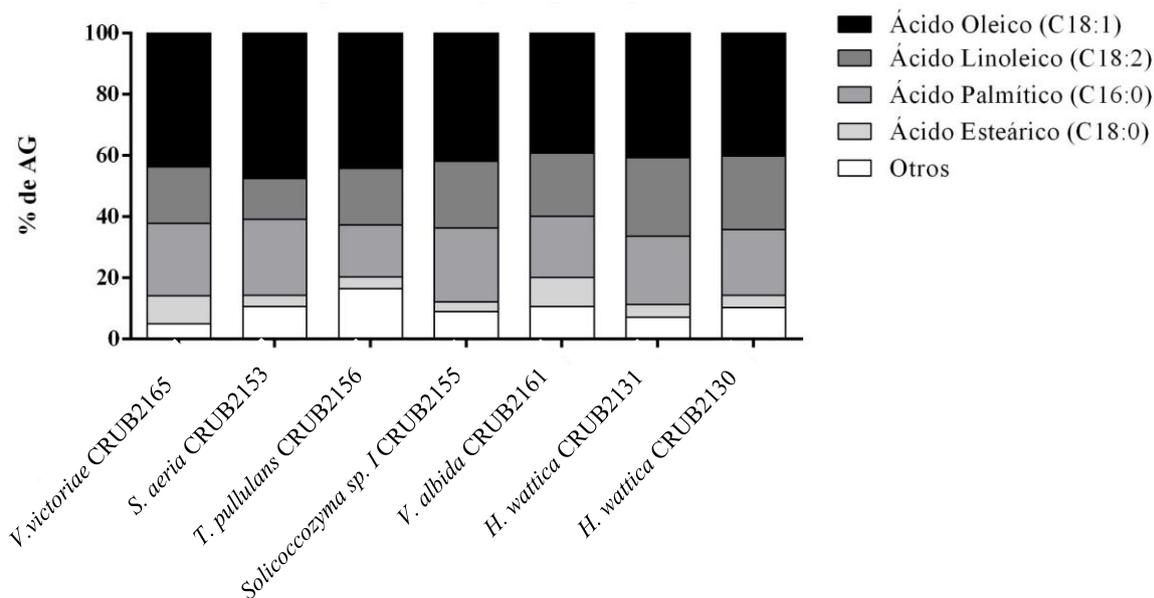
El mayor consumo de carbono lo presentó *Vanrija albida* - CRUB2161 (88,4% del C consumido), seguido por *H. wattica* - CRUB2130 (83% del C consumido). Sin embargo, la productividad lipídica en función del carbono consumido, fue mayor para *S. aeria* - CRUB2153, % YI/S= 0,44; seguida por *H. wattica* - CRUB2130, % YI/S= 0,37.

El mayor consumo de nitrógeno lo presentó *H. wattica* - CRUB2131 (83% del N consumido) seguido por *V. albida* - CRUB2161 (82,3% del N consumido). Finalmente, el mayor consumo de fósforo lo presentó *Solicoccozyma* sp. I CRUB2155 (97,7% de P consumido) seguido por *V. albida* - CRUB2161 (96,2% de P consumido). Se pudo observar que entre los mayores consumidores de fósforo se encontraron algunas de las cepas con mayor producción de lípidos totales, como es el caso de *Solicoccozyma* sp. I CRUB2155, *V. albida* - CRUB2161, *S. aeria* - CRUB2153 y *H. wattica* - CRUB2131. El consumo de nutrientes del efluente por parte de las levaduras se muestra en la Figura 5.5.

**Figura 5.5: Consumo de nutrientes en el efluente de cerveza (C, N y P) por parte de las levaduras del ensayo selectivo**

En los lípidos extraídos de cada aislamiento analizado se estudiaron 31 ácidos grasos, 5 cepas presentaron la presencia de más de 20 tipos de ácidos grasos diferentes, y 2 presentaron 19 (*Solicoccozyma* sp. I) y 14 (*V. victoriae*) ácidos grasos respectivamente. Para todos los casos se obtuvieron 4 tipos de ácidos grasos mayoritarios: ácido oléico (C18:1), con una producción que varió entre 47,6 y 33,8%; ácido linoleico (C18:2), cuya producción varió entre 25,7 y 13,4%; ácido palmítico (C16:0), cuya producción varió entre 24,7 y 17% y ácido esteárico (C18:0), cuya producción varió entre 10,2 y 3,2%. Estos ácidos mayoritarios representaron entre el 83,6% y el 95,1% del total de lípidos para las cepas estudiadas, el porcentaje restante estuvo representado por otros ácidos grasos minoritarios. *Tausonia pullulans* - CRUB2155 presentó la mayor proporción de los mismos con 16,4% (18 ácidos grasos minoritarios), mientras que *Vishniacozyma victoriae* presentó la menor proporción con 4,9% (10 ácidos grasos minoritarios) (Tabla suplementaria 5.4, Anexo 1). El detalle del perfil lipídico de todas las cepas se muestra en la Fig. 5.6.

**Figura 5.6: Perfil de los diferentes tipos de ácidos grasos producidos por cada levadura**  
AG: ácidos grasos



## 5.4 DISCUSIÓN

En este trabajo, se ha llevado a cabo el estudio de las comunidades naturales de hongos, con especial énfasis en el estudio de las levaduras tanto cultivables como no-cultivables. El estudio de levaduras cultivables, nos permitió obtener levaduras aisladas y purificadas, las que permanecen disponibles para diferentes estudios en la colección de cultivos microbianos del IPATEC. La disponibilidad de estos microorganismos nos permite realizar estudios de los ciclos de vida, de las estrategias fisiológicas que presentan para habitar ambientes extremos y, además, estudiar diferentes aplicaciones biotecnológicas de estas levaduras para la producción de metabolitos de interés o de las células como maquinaria para la obtención de un producto determinado (Buzzini & Margesin, 2014).

El estudio de levaduras psicrófilas/psicrotolerantes como productoras de aceites apenas se ha abordado en estos últimos años (Viñarta et al, 2016; Villarreal et al., 2018). En este trabajo se ha logrado aislar una importante diversidad de levaduras, este resultado refuerza el hecho que las diferentes especies de levaduras de los ambientes fríos de la Patagonia Argentina, poseen una amplia aplicabilidad y/o proyección biotecnológica (Libkind et al., 2020), entre las que se encuentra la producción de lípidos microbianos.

Generalmente las levaduras pertenecientes al phylum Basidiomycota prevalecen entre las levaduras oleaginosas, aunque también se han identificado algunas especies oleaginosas de

importancia del phylum Ascomycota (Rossi et al., 2009). Las levaduras reportadas como oleaginosas en la bibliografía, incluyen a las especies *Lipomyces starkeyi*, *Lipomyces lipofer* y *Yarrowia lipolytica* como ejemplos de levaduras ascomicéticas, y levaduras basidiomicéticas dentro de los géneros *Rhodotorula*, *Phaffia*, *Sporobolomyces* y *Solicoccozyma* (Jin et al., 2015; Ochsenreither et al., 2016). Las levaduras estudiadas en este capítulo fueron en su mayoría basidiomicéticas, pertenecientes a los géneros *Cystobasidium*, *Dioszegia*, *Filobasidium*, *Goffeauzyma*, *Holtermanniella*, *Mrakia*, *Naganishia*, *Rhodotorula*, *Solicoccozyma*, *Tausonia*, *Udeniomyces*, *Vanrija*, *Vishniacozyma*, y *Xanthophyllomyces*, además de tres géneros del phylum Ascomycota representado por *Kabatiella*, *Hormonema* y *Wickerhamomyces*. Todos estos géneros tienen antecedentes en la producción de lípidos (Libkind et al., 2008b; Rossi et al., 2009; Johnson, 2013; Sitepu et al., 2013; 2014; Filippucci et al., 2016; Garay et al., 2018; Viñarta et al., 2016; Villarreal et al., 2018; Bardhan et al., 2020).

Dentro de las levaduras oleaginosas basidiomicéticas estudiadas, los géneros *Goffeauzyma*, *Naganishia*, *Solicoccozyma* y *Vishniacozyma* (denominados anteriormente *Cryptococcus*), contienen especies con la capacidad de acumular alto contenido de lípidos, y presentan generalmente variabilidad intraespecífica (Buzzini et al., 2018; de Garcia et al., 2012). Esta característica podría influir en la variabilidad de la acumulación de aceites para las cepas de una dada especie (Sitepu et al., 2012; 2013), como así también en la proporción de los diferentes ácidos grasos acumulados (Khot et al., 2012; Tanimura et al., 2014). Lo observado en este trabajo confirma que la producción de lípidos de estos grupos es muy variable, y si se desea trabajar con aislados de estos grupos taxonómicos se deben realizar relevamientos para la búsqueda de productoras de lípidos de interés.

Uno de los factores que se tuvieron en cuenta para la selección de levaduras fue el sustrato de origen. Este criterio estuvo basado en que el suelo es de los sustratos más estudiados y por lo tanto de donde se han aislado la mayoría de las levaduras utilizadas para el estudio y la producción de lípidos (Pan et al., 2009; Kraisintu et al., 2010; Leesing & Karraphan, 2011; Duarte et al., 2013; Viñarta et al., 2016; Vyas et al., 2017). Incluso, los estudios enfocados en ambientes fríos como la Antártida, presentan mayor información de aislamientos en suelo (Viñarta et al., 2016; Villarreal et al., 2018), mientras que las levaduras oleaginosas aisladas de sustratos como el agua, la nieve y el hielo, permanecen poco estudiadas. El enfoque en el ambiente glaciario del presente capítulo, nos permite hacer inferencias sobre las levaduras de otros sustratos, además del suelo. En este sentido pudimos observar que las levaduras con características interesantes para la producción de lípidos, como *Solicoccozyma* sp. I, *Tausonia*

*pullulans*, *Vanrija albida* y *Vishniacozyma victoriae*, fueron mayormente aisladas de agua, hielo y nieve.

Por lo mencionado anteriormente, se plantea considerar el estudio del ambiente como un todo, lo que nos brinda información más completa de las características de los microorganismos que los habitan, más allá del sustrato de aislamiento. Además, al conocer los grupos taxonómicos mayoritarios de un determinado ambiente, y sus potencialidades en la producción de un metabolito de interés, permitiría la búsqueda dirigida de estos grupos, para obtener nuevas especies con posible aplicación biotecnológica (Libkind & van Brock, 2006; 2008a; 2008b; de García et al., 2012).

Otras de las estrategias utilizadas para el *screening* de levaduras capaces de acumular lípidos fue la selección de grupos taxonómicos de conocida acumulación lipídica. Los resultados obtenidos mostraron que dicha estrategia resultó útil (tanto en medio convencional como en efluente cervecero), ya que permitió porcentajes superiores al 45% en la acumulación de vacuolas lipídicas en las levaduras analizadas. Sitepu et al., (2014) reportó que generalmente en *screenings* al azar, realizados con levaduras de ambientes naturales, la tasa de aislamientos positivos o capaces de acumular lípidos no supera el 5% en medios diseñados para la producción de lípidos.

En lo que refiere a la utilización de medios de cultivo no convencionales, con frecuencia se ha reportado que los efluentes industriales no contienen los nutrientes, o las cantidades de nutrientes, necesarios para el metabolismo de las levaduras más utilizadas en biotecnología, esto genera bajas productividad de biomasa y lípidos (Xue et al., 2010; Chi et al., 2011; Iasimone et al., 2018). Muchas veces es necesario la adición de carbono y/o nitrógeno, como melaza de caña de azúcar y urea, respectivamente (Dias et al., 2020). Sin embargo, nuestros resultados muestran que el efluente cervecero diluido sin suplementar es efectivo para el cultivo de levaduras de ambientes oligotróficos, permitiendo la producción de biomasa y acumulación de lípidos.

Los efluentes cerveceros constituyen una buena estrategia para la reducción significativa de los costos generales del proceso de producción, añadiendo, a su vez, los beneficios ambientales del tratamiento biológico. Esto demuestra una vez más, la importancia de explorar las estrategias de las levaduras (por ejemplo, el bajo requerimiento de nutrientes), para poder aprovechar sus características tanto en el tratamiento de efluentes, como en la producción de lípidos en particular y/u otros metabolitos en general.

Para todas las levaduras utilizadas la remoción de los nutrientes estudiados (C, N y P) fue comparable con otros microorganismos utilizados para el tratamiento de diferentes efluentes,

como los cerveceros (Marchão et al., 2018), efluentes de destilerías y domiciliarios (Ling et al., 2014), entre otros (Dias et al., 2019). Por lo que la utilización de medios de cultivo o sustratos no convencionales, como lo son los productos de desecho de la industria cervecera, pueden ser prometedores para realizar no solo *screenings* en la producción de metabolitos, si no también para la producción en escala, permitiendo bajar significativamente los costos de producción y aportar a la reutilización y reciclado de residuos.

Los rendimientos (Yl/X) obtenidos para levaduras en cultivos a nivel industrial van desde los 0,10 g.g<sup>-1</sup> para *Rhodotorula glutinis* en medio de glicerol (Karamerou et al. 2016) hasta los 0,29 g.g<sup>-1</sup> para *Rhodospiridium toruloides* en hidrolizado de maíz (Fei et al., 2016). En este trabajo los rendimientos obtenidos con las levaduras seleccionadas a escala de laboratorio variaron entre 0,17 g.g<sup>-1</sup> a 0,44 g.g<sup>-1</sup> para las especies *Solicoccozyma* sp. I, *Vanrija albida*, *Vishniacozyma victoriae*, *Tausonia pullulans*, *Holtermanniella wattica*, *Solicoccozyma aeria* (orden ascendente de producción), cuyos valores se encuentran por encima de los registrados para otras levaduras de ambientes fríos (0,02 g.g<sup>-1</sup> a 0,15 g.g<sup>-1</sup>) (Libkind et al., 2008b). Estos resultados presentan una oportunidad para realizar estudios a mayor escala, utilizando el efluente cervecero y evaluando sus respuestas en estas condiciones. Además, se respalda la hipótesis de que las levaduras adaptadas al frío pueden presentar rendimientos mejores que las mesófilas (Rossi et al., 2009).

La mayoría de los ácidos grasos producidos por las levaduras seleccionadas, tuvieron una composición similar a la de los aceites vegetales (Brandenburg, 2021). Aunque las proporciones de los 4 ácidos grasos mayoritarios variaron en las cepas evaluadas, estos fueron similares a los reportados para otras levaduras oleaginosas, en distintos tipos de medios de cultivo (Sitepu et al., 2013). Los ácidos grasos más destacados obtenidos en este trabajo, fueron el ácido oleico (C18:1), el ácido palmítico (C16:0), el ácido linoléico (C18:2) y el ácido esteárico (C18:0). El ácido oleico (18:1) se presentó consistentemente como el más abundante, tanto en este estudio como en la bibliografía consultada (Sitepu et al., 2013; Garay et al., 2018; Patel et al., 2017). Debido a su alto porcentaje de ácido oleico, las levaduras oleaginosas tienen un perfil lipídico favorable para la producción de biodiesel y son una posible solución para los problemas de sostenibilidad relacionados con la producción de biodiesel de primera generación (Sitepu et al., 2014).

El ácido linoleico (18:2), también fue uno de los ácidos grasos mayoritarios, ocupando en algunos casos el segundo lugar en cantidad. Este es un ácido poliinsaturado, y es un ácido graso esencial de la serie omega 6 ( $\omega$ 6), por lo que presenta importancia en la nutrición humana y para la industria alimentaria (Villarreal et al., 2018; Maza et al., 2020). Debido a que dentro de

los ácidos grasos minoritarios se encontraron una gran variedad de ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados en baja proporción, la prospección productiva de las levaduras de este estudio es prometedora. Es esperable que, ajustando las condiciones de cultivo como el medio y/o la temperatura (Rossi et al., 2009; Kolouchová et al., 2016; Favier, 2019), se puedan observar variaciones en la proporción de ácidos grasos saturados e insaturados o de un ácido graso en particular, pudiendo así obtener mejores rendimientos de un determinado ácido graso.

En este trabajo se ha obtenido con éxito nuevas levaduras oleaginosas basadas en la relación taxonómica con las especies de levaduras oleaginosas reportadas previamente. Así mismo se ha explorado la utilización de un efluente cuyas concentraciones de nutrientes parece ser el adecuado para la acumulación de lípidos en ensayos de laboratorio. Queda por explorar entonces, las condiciones de cultivo como la temperatura, además de aumentar la escala, para evaluar si los altos rendimientos obtenidos, también se observan al modificar las escalas de cultivo.

## 5.5 CONCLUSIONES PARCIALES

- Las levaduras de ambientes glaciarios del Monte Tronador son un recurso prometedor para la producción de lípidos.
- El sustrato de origen de levaduras de ambientes naturales no sería un indicador para la selección de levaduras oleaginosas.
- El efluente cervecero es una opción de bajo costo prometedora para el cultivo de levaduras oligotróficas.
- El rendimiento de lípidos en levaduras oligotróficas en efluentes cerveceros a escala de laboratorio es interesante para un estudio futuro.
- Las condiciones de cultivo utilizadas favorecieron la producción de lípidos, que fueron mayores a los reportados anteriormente para la zona.
- Las levaduras estudiadas producen como ácidos mayoritarios: ácido oléico, ácido linoleico, ácido palmítico y ácido esteárico.

## **CONCLUSIONES FINALES**

- Los estudios microbiológicos con metodologías tradicionales de cultivo son una herramienta importante para el estudio y la conservación de levaduras de ambientes fríos.
- Los estudios metagenómicos son una herramienta importante para el registro de biodiversidad microbiana de ambientes amenazados por las fluctuaciones ambientales causadas por el cambio climático.
- Diversos grupos de hongos filamentosos y levaduras habitan los ambientes glaciarios del Monte Tronador.
- Los hongos filamentosos ascomicéticos son mayoritarios en el suelo desnudo circundante de los glaciares Castaño Overa y Ventisquero Negro del Monte Tronador.
- Las levaduras basidiomicéticas son mayoritarias en la nieve, hielo y agua de deshielo de los glaciares Castaño Overa y Ventisquero Negro del Monte Tronador.
- No existe una transferencia significativa entre las especies predominantes de hongos presentes en el hielo, nieve y agua y las pertenecientes al suelo de los glaciares Castaño Overa y Ventisquero Negro del Monte Tronador.
- La clase Microbotryomycetes predomina en los sustratos de nieve, hielo y agua de los glaciares estudiados del Monte Tronador.
- Se registra por primera vez la presencia de hongos Quitridiomycetos en ambientes glaciarios del Monte Tronador, Patagonia, Argentina.
- Los ambientes glaciarios del Monte Tronador son un reservorio de posibles nuevas especies de levaduras.
- Los ambientes asociados al sistema glaciar del Monte Tronador (glaciares Castaño Overa y Ventisquero Negro, río Castaño Overa) son oligotróficos.
- Las levaduras de los ambientes glaciarios del Monte Tronador presentan requerimientos nutricionales oligotróficos para su desarrollo.
- Las comunidades fúngicas asociadas a los ambientes glaciario del Monte Tronador son en su mayoría saprobias.

- Las comunidades fúngicas asociadas a los ambientes glaciario del Monte Tronador no se ven relacionadas a las características físico-químicas del ambiente en el que están presentes.
- Las levaduras de ambientes fríos de la Patagonia son un recurso promisorio para la producción de lípidos.
- Los efluentes cerveceros son un buen sustrato para el desarrollo de biomasa de levaduras aisladas de ambientes oligotróficos y la acumulación de vacuolas lipídicas.
- Este trabajo sienta las bases para futuros estudios de diversidad y taxonomía de levaduras, permitiendo la búsqueda de genes y/o taxones específicos, además del registro de la variabilidad temporal de comunidades, así como de especies de interés para la producción lipídica, utilización de efluentes disponibles en la zona como medio de cultivo y remoción de nutrientes potencialmente eutrofizantes para los cursos de agua.

## **BIBLIOGRAFÍA**

**BIBLIOGRAFÍA**

- Abarenkov, K., Nilsson, R. H., Larsson, K. H., Alexander, I. J., Eberhardt, U., Erland, S., ... Kõljalg, U. (2010). The UNITE database for molecular identification of fungi - recent updates and future perspectives. *New Phytologist*, **182**(2), 281–285.
- ACIA. Arctic Climate Impact Assessment. Cambridge University Press. Cambridge: 2005. p. 1042. <http://www.acia.uaf.edu> (19.07.2014): 183–242
- Adrio, J. & A. Demain. (2003). Fungal biotechnology. *International Microbiology*, **6**(3): 192-199.
- Ageitos, J. M., Vallejo, J. A., Veiga-Crespo, P., & Villa, T. G. (2011). Oily yeasts as oleaginous cell factories. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **90**(4), 1219–1227.
- Albores, S., Sanguinedo, P., Held, B. H., Cerdeiras, M. P., & Blanchette, R. A. (2018). Biodiversity and antimicrobial activity of antarctic fungi from the fildes peninsula, King George Island. *Sydowia*, **70**, 185–192. <https://doi.org/10.12905/0380.sydowia70-2018-0185>
- Amend, A. (2014). From dandruff to deep-sea vents: Malassezia-like fungi are ecologically hyper-diverse. *PLoS pathogens*, **10**(8), e1004277.
- Andrews, J. H., Spear, R. N., & Nordheim, E. V. (2002). Population biology of Aureobasidium pullulans on apple leaf surfaces. *Canadian journal of microbiology*, **48**(6), 500-513.
- Anesio, A. M., & Laybourn-Parry, J. (2012). Glaciers and ice sheets as a biome. *Trends in ecology & evolution*, **27**(4), 219-225.
- Antranikian, G. (2009). Extremophiles and biotechnology. *eLS*.
- APHA (1992) Standard methods for examination of water and wastewater. 16 ed., *American Public Health Association*, Washington, DC
- Arenz, B. E., & Blanchette, R. A. (2011). Distribution and abundance of soil fungi in Antarctica at sites on the Peninsula, Ross Sea Region and McMurdo Dry Valleys. *Soil Biology and Biochemistry*, **43**(2), 308–315. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2010.10.016>
- Arenz, B. E., Blanchette, R. A., & Farrell, R. L. (2014). Fungal diversity in Antarctic soils. In *Antarctic terrestrial microbiology* (pp. 35-53). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Babič, M. N., Zalar, P., Ženko, B., Džeroski, S., & Gunde-Cimerman, N. (2016). Yeasts and yeast-like fungi in tap water and groundwater, and their transmission to household appliances. *Fungal Ecology*, **20**, 30-39.
- Baeza, M., Alcaíno, J., Cifuentes, V., Turchetti, B., & Buzzini, P. (2017). Cold-active enzymes from cold-adapted yeasts. In *Biotechnology of yeasts and filamentous fungi* (pp. 297-324). Springer, Cham.
- Baeza, M., Flores, O., Alcaíno, J., & Cifuentes, V. (2019). Yeast Thriving in Cold Terrestrial Habitats: Biodiversity and Industrial/Biotechnological Applications. In Tiquia-Arashiro, S. M., & Grube, M. (Eds.), *Fungi in Extreme Environments: Ecological Role and Biotechnological Significance*, pp. 253-268.
- Baigún, C., Mugni, H., & Bonetto, C. (2006). Nutrient concentrations and trophic state of small Patagonian Andean lakes. *Journal of Freshwater Ecology*, **21**(3), 449-456.
- Bardhan, P., Gupta, K., Kishor, S., Chattopadhyay, P., Chaliha, C., Kalita, E., ... & Mandal, M. (2020). Oleaginous yeasts isolated from traditional fermented foods and beverages of Manipur and Mizoram, India, as a potent source of microbial lipids for biodiesel production. *Annals of microbiology*, **70**(1), 1-14.
- Barrett, J. E., Virginia, R. A., and Wall, D. H.: Trends in resin and KCl-extractable soil nitrogen across landscape gradients in Taylor Valley, Antarctica. *Ecosystems*, **5**, 289–299, 2002.

- Bartelme, R. P., Custer, J. M., Dupont, C. L., Espinoza, J. L., Torralba, M., Khalili, B., & Carini, P. (2020). Influence of substrate concentration on the culturability of heterotrophic soil microbes isolated by high-throughput dilution-to-extinction cultivation. *Mosphere*, **5**(1), e00024-20.
- Baveye, P. C., Baveye, J., & Gowdy, J. (2016). Soil “ecosystem” services and natural capital: critical appraisal of research on uncertain ground. *Frontiers in Environmental Science*, **4**, 41.
- Bellou, S., Triantaphyllidou, I. E., Aggeli, D., Elazzazy, A. M., Baeshen, M. N., & Aggelis, G. (2016). Microbial oils as food additives: recent approaches for improving microbial oil production and its polyunsaturated fatty acid content. *Current opinion in Biotechnology*, **37**, 24-35.
- Beopoulos, A., Cescut, J., Haddouche, R., Uribelarra, J. L., Molina-Jouve, C., & Nicaud, J. M. (2009). *Yarrowia lipolytica* as a model for bio-oil production. *Progress in lipid research*, **48**(6), 375-387.
- Bergauer, P., Fonteyne, P. A., Nolard, N., Schinner, F., & Margesin, R. (2005). Biodegradation of phenol and phenol-related compounds by psychrophilic and cold-tolerant alpine yeasts. *Chemosphere*, **59**(7), 909-918.
- Boetius, A., Anesio, A. M., Deming, J. W., Mikucki, J. A., & Rapp, J. Z. (2015). Microbial ecology of the cryosphere: sea ice and glacial habitats. *Nature Reviews Microbiology*, **13**(11), 677-690.
- Boundy-Mills, K.L. (2014). Methods for the Isolation and Investigation of the diversity of Cold-Adapted Yeast and their Ex situ Preservation in Worldwide Collections. In Buzzini P. & R. Margesin (Eds), *Cold-Adapted Yeast, Biodiversity, Adaptation Strategies and Biotechnological Significance*, pp 23-45.
- Botha, A. (2006). Yeasts in soil. In Biodiversity and ecophysiology of yeasts (pp. 221-240). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Branda, E., Turchetti, B., Diolaiuti, G., Pecci, M., Smiraglia, C., & Buzzini, P. (2010). Yeast and yeast-like diversity in the southernmost glacier of Europe (Calderone Glacier, Apennines, Italy). *FEMS Microbiology Ecology*, **72**(3), 354–369. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2010.00864.x>
- Brandão, L. R., Libkind, D., Vaz, A. B., Espírito Santo, L. C., Moliné, M., de García, V., ... & Rosa, C. A. (2011). Yeasts from an oligotrophic lake in Patagonia (Argentina): diversity, distribution and synthesis of photoprotective compounds and extracellular enzymes. *FEMS Microbiology Ecology*, **76**(1), 1–13.
- Brandão, L. R., Vaz, A. B. M., Espírito Santo, L. C., Pimenta, R. S., Morais, P. B., Libkind, D., ... Rosa, C. A. (2017). Diversity and biogeographical patterns of yeast communities in Antarctic, Patagonian and tropical lakes. *Fungal Ecology*, **28**, 33–43. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2017.04.003>
- Brandenburg, J. (2021). Lipid production from lignocellulosic material by oleaginous yeasts (No. 2021: 30).
- Bridge, P. D., & Newsham, K. K. (2009). Soil fungal community composition at Mars Oasis, a southern maritime Antarctic site, assessed by PCR amplification and cloning. *Fungal Ecology*, **2**(2), 66-74.
- Brown, S. P., Olson, B. J. S. C., & Jumpponen, A. (2015). Fungi and Algae Co-Occur in Snow: An Issue of Shared Habitat or Algal Facilitation of Heterotrophs? *Arctic, Antarctic, and Alpine Research*, **47**(4), 729–749. <https://doi.org/10.1657/AAAR0014-071>
- Browne, H. P., Forster, S. C., Anonye, B. O., Kumar, N., Neville, B. A., Stares, M. D., ... Lawley, T. D. (2016). Culturing of “unculturable” human microbiota reveals novel taxa and extensive sporulation. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/nature17645>
- Brunner, I., Frey, B., Hartmann, M., Zimmermann, S., Graf, F., Suz, L.M., Niskanen, T., Bidartondo, M.I., Senn-Irlet, B. (2017). Ecology of alpine macrofungi – combining historical with recent data. *Frontiers in Microbiology*, **8**, 2066.

- Bruzzone, M. C., Fehrer, J., Fontenla, S. B., & Vohník, M. (2017). First record of *Rhizoscyphus ericae* in Southern Hemisphere's Ericaceae. *Mycorrhiza*, **27**(2), 147–163. <https://doi.org/10.1007/s00572-016-0738-8>
- Buée, M., Reich, M., Murat, C., Morin, E., Nilsson, R. H., Uroz, S., & Martin, F. (2009). 454 Pyrosequencing analyses of forest soils reveal an unexpectedly high fungal diversity. *New Phytologist*, **184**(2), 449–456.
- Butinar, L., Spencer-Martins, I., & Gunde-Cimerman, N. (2007). Yeasts in high Arctic glaciers: the discovery of a new habitat for eukaryotic microorganisms. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **91**(3), 277–289.
- Butinar, L., Strmole, T., & Gunde-Cimerman, N. (2011). Relative incidence of ascomycetous yeasts in Arctic coastal environments. *Microbial Ecology*, **61**, 832–843.
- Buzzini P., Branda, E., Goretti, M., & Turchetti, B. (2012). Psychrophilic yeasts from worldwide glacial habitats: diversity, adaptation strategies and biotechnological potential. *FEMS Microbiology Ecology*, **82**, 217–241.
- Buzzini P. & R. Margesin. (2014). Cold-Adapted Yeasts: A Lesson from the Cold and a Challenge for the XXI Century. In Buzzini P. & R. Margesin (Eds.). *Cold-Adapted Yeast, Biodiversity, Adaptation Strategies and Biotechnological Significance*, pp 123-148.
- Buzzini, P., Turk, M., Perini, L., Turchetti, B., & Gunde-Cimerman, N. (2017). Yeasts in Polar and Subpolar Habitats. In P. Buzzini, M. A. Lachance, & A. Yurkov (Eds.), *Yeasts in Natural Ecosystems: Diversity* (pp. 331–365). Springer Cham. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-62683-3>
- Buzzini, P., Turchetti, B., & Yurkov, A. (2018). Extremophilic yeasts: the toughest yeasts around? *Yeast*, **35**(8), 487–497. <https://doi.org/10.1002/yea.3314>
- Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J. A., & Holmes, S. P. (2016). DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods*, **13**(7), 581–583. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>
- Canganella F. & Wiegel J. (2011). Extremophiles: from abyssal to terrestrial ecosystems and possibly beyond. *Naturwissenschaften*, **98**, 253-279.
- Cannon P. & B. Sutton. Microfungi on wood and plant debris. (2004). In Mueller, G., G. Bills & M. Foster (Eds.). *Biodiversity of Fungi. Inventory and Monitoring Methods*, pp. 218-219.
- Cantrell, S. A., Dianese, J. C., Fell, J., Gunde-Cimerman, N., & Zalar, P. (2011). Unusual fungal niches. *Mycologia*, **103**(6), 1161–1174. <https://doi.org/10.3852/11-108>
- Capece, M. C. Polyextremophiles and the constraints for terrestrial habitability. (2013). In Seckbach J., et al (Eds.) *Polyextremophiles: Life under multiple forms of stress*, pp 7-59.
- Caporaso, J. G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F. D., Costello, E. K., ... & Knight, R. (2010). QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature methods*, **7**(5), 335–336.
- Capone, K. A., Dowd, S. E., Stamatas, G. N., & Nikolovski, J. (2011). Diversity of the human skin microbiome early in life. *Journal of Investigative Dermatology*, **131**(10), 2026-2032.
- Carrón, A. I., Garibaldi, L. A., Marquez, S., & Fontenla, S. (2020). The soil fungal community of native woodland in Andean Patagonian forest : A case study considering experimental forest management and seasonal effects. *Forest Ecology and Management*, **461**, 117955. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2020.117955>
- Chao, A., Chazdon, R. L., Colwell, R. K., & Shen, T. J. (2005). A new statistical approach for assessing similarity of species composition with incidence and abundance data. *Ecology letters*, **8**(2), 148-159.

- Chatzifragkou, A., Dietz, D., Komaitis, M., Zeng, A. P., & Papanikolaou, S. (2010). Effect of biodiesel-derived waste glycerol impurities on biomass and 1, 3-propanediol production of *Clostridium butyricum* VPI 1718. *Biotechnology and bioengineering*, **107**(1), 76-84.
- Chatzifragkou, A., Makri, A., Belka, A., Bellou, S., Mavrou, M., Mastoridou, M., ... & Papanikolaou, S. (2011). Biotechnological conversions of biodiesel derived waste glycerol by yeast and fungal species. *Energy*, **36**(2), 1097-1108.
- Chi, Z., Zheng, Y., Jiang, A., & Chen, S. (2011). Lipid production by culturing oleaginous yeast and algae with food waste and municipal wastewater in an integrated process. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **165**(2), 442-453.
- Chiarello, M., McCauley, M., Villéger, S., & Jackson, C. R. (2022). Ranking the biases: The choice of OTUs vs. ASVs in 16S rRNA amplicon data analysis has stronger effects on diversity measures than rarefaction and OTU identity threshold. *PloS one*, **17**(2), e0264443.
- Christie, W.W. (2003) Lipid analysis. Isolation, separation, identification and structural analysis of lipids. 3rd ed, Vol. 15. The Oily Press.
- Cole, S., & McCarthy, L. (2018). Long-Term Warming Trend Continued in 2017. NASA, NOAA. <https://www.nasa.gov/press-release/long-term-warming-trend-continued-in-2017-nasa-noaa>.
- Coleine, C., Stajich, J. E., de los Ríos, A., & Selbmann, L. (2020). Beyond the extremes: Rocks as ultimate refuge for fungi in drylands. *Mycologia*, **00**(00), 1–26. <https://doi.org/10.1080/00275514.2020.1816761>
- Coleine, C., Zucconi, L., Onofri, S., Pombubpa, N., Stajich, J. E., & Selbmann, L. (2018). Sun exposure shapes functional grouping of fungi in cryptoendolithic antarctic communities. *Life*, **8**(2). <https://doi.org/10.3390/life8020019>
- Collins, T., & Margesin, R. (2019). Psychrophilic lifestyles: mechanisms of adaptation and biotechnological tools. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **103**(7), 2857–2871. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09659-5>
- Connell L. B., Rodriguez, R. R., Redman, R. S., Dalluge, J. J. (2014). Cold-adapted yeasts in Antarctic deserts. In *Cold-adapted Yeasts*, Buzzini P, Margesin R (eds.) Springer- Verlag: Berlin-Heidelberg; 75-98
- Connell, L., Redman, R., Craig, S., & Rodriguez, R. (2006). Distribution and abundance of fungi in the soils of Taylor Valley, Antarctica. *Soil Biology and Biochemistry*, **38**(10), 3083–3094. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2006.02.016>
- Connell, L., Redman, R., Craig, S., Scorzetti, G., Iszard, M., & Rodriguez, R. (2008). Diversity of soil yeasts isolated from South Victoria Land, Antarctica. *Microbial Ecology*, **56**(3), 448–459. <https://doi.org/10.1007/s00248-008-9363-1>
- Corno, G., Modenutti, B. E., Callieri, C., Balseiro, E. G., Bertoni, R., & Caravatia, E. (2009). Bacterial diversity and morphology in deep ultraoligotrophic Andean lakes: the role of UVR on vertical distribution. *Limnology and Oceanography*, **54**(4), 1098-1112.
- Correa M. N. (ed). (1998). Flora Patagónica (República Argentina). Tomo VIII. Colección científica del INTA. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, pp 31–38.
- Cox, F., Newsham, K. K., Bol, R., Dungait, J. A. J., & Robinson, C. H. (2016). Not poles apart: Antarctic soil fungal communities show similarities to those of the distant Arctic. *Ecology Letters*, **19**(5), 528–536. <https://doi.org/10.1111/ele.12587>
- Cross, W. F., Benstead, J. P., Frost, P. C., & Thomas, S. A. (2005). Ecological stoichiometry in freshwater benthic systems: recent progress and perspectives. *Freshwater Biology*, **50**(11), 1895-1912.

- D'Elia, T., Veerapaneni, R., Theraisnathan, V., & Rogers, S. O. (2009). Isolation of fungi from Lake Vostok accretion ice. *Mycologia*, **101**(6), 751–763. <https://doi.org/10.3852/08-184>
- D'Amico, S., Collins, T., Marx, J. C., Feller, G., Gerday, C., & Gerday, C. (2006). Psychrophilic microorganisms: challenges for life. *EMBO reports*, **7**(4), 385-389.
- D'Annibale, A., Rosetto, F., Leonardi, V., Federici, F., & Petruccioli, M. (2006). Role of autochthonous filamentous fungi in bioremediation of a soil historically contaminated with aromatic hydrocarbons. *Applied and Environmental Microbiology*, **72**(1), 28-36.
- Das, M. M., Haridas, M. & Sabu, A. (2020). Process development for the enhanced production of bio-nematicide *Purpureocillium lilacinum* KU8 under solid-state fermentation. *Bioresource Technology*, 308:(2020), 123328.
- de Garcia, V., Brizzio, S., Libkind, D., Buzzini, P., & Van Broock, M. (2007). Biodiversity of cold-adapted yeasts from glacial meltwater rivers in Patagonia, Argentina. *FEMS Microbiology Ecology*, **59**(2), 331-341.
- de Garcia, V., Brizzio, S., Libkind, D., Rosa, C. A., & Van Broock, M. (2010). *Wickerhamomyces patagonicus* sp. nov., an ascomycetous yeast species from Patagonia, Argentina. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **60**(7), 1693–1696. <https://doi.org/10.1099/ij.s.0.015974-0>
- de Garcia, Virginia, Brizzio, S., & van Broock, M. R. (2012). Yeasts from glacial ice of Patagonian Andes, Argentina. *FEMS Microbiology Ecology*, **82**(2), 540–550. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2012.01470.x>
- de Garcia, V., Libkind, D., Moliné, M., Rosa, C. A., & Giraudo, M. R. (2014). Cold-adapted yeasts in patagonian habitats. In P. Buzzini & R. Margesin (Eds.), *Cold-adapted Yeasts: Biodiversity, Adaptation Strategies and Biotechnological Significance*, Vol. 9783642396, pp. 123–148. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-39681-6\\_6](https://doi.org/10.1007/978-3-642-39681-6_6)
- de Garcia, V., Coelho, M., Maia, T. M., Rosa, L. H., Vaz, M., Rosa, C., Libkind, D., et al. (2015). Sex in the cold: taxonomic reorganization of psychrotolerant yeasts in the order Leucosporiales. *FEMS Yeast Research*, **15**(4), fov019–fov019. <https://doi.org/10.1093/femsyr/fov019>
- de Garcia, V., Trochine, A., Uetake, J., Bellora, N., & Libkind, D. (2020). Novel yeast taxa from the cold: description of *Cryolevonia giraudoae* sp. nov. and *Camptobasidium gelus* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **70**(6), 3711-3717.
- De Hoog, G. S., Zeng, J. S., Harrak, M. J., & Sutton, D. A. (2006). *Exophiala xenobiotica* sp. nov., an opportunistic black yeast inhabiting environments rich in hydrocarbons. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **90**(3), 257-268.
- De Hoog, G. S., Guarro, J., Gené, J., & Figueras, M. J. (2009). Atlas of clinical fungi; a pilot CD-ROM version of the 3rd edition. Baarn: Centraalbureau voor Schimmelcultures.
- de Menezes, G. C. A., Amorim, S. S., Gonçalves, V. N., Godinho, V. M., Simões, J. C., Rosa, C. A., & Rosa, L. H. (2019). Diversity, distribution, and ecology of fungi in the seasonal snow of antarctica. *Microorganisms*, **7**(10). <https://doi.org/10.3390/microorganisms7100445>
- Dee, J. M., Mollicone, M., Longcore, J. E., Roberson, R. W., & Berbee, M. L. (2015). Cytology and molecular phylogenetics of Monoblepharidomycetes provide evidence for multiple independent origins of the hyphal habit in the Fungi. *Mycologia*, **107**(4), 710-728.
- Delgado Granados, H., Miranda, J. P., Huggel, C., Ortega del Valle, S., & Alatorre Ibarguengoitia, M. A. (2007). Chronicle of a death foretold: Extinction of the small-size tropical glaciers of Popocatepetl volcano (Mexico). *Global and Planetary Change*, **56**(1–2), 13–22. <https://doi.org/10.1016/j.gloplacha.2006.07.010>
- Dias, C., Santos, J., Reis, A., & Lopes da Silva, T. (2019). Yeast and microalgal symbiotic cultures using low-cost substrates for lipid production. *Bioresour Technol Reports*, 7:100261.

- Dias, C., Reis, A., Santos, J.A.L., & Lopes da Silva, T. (2020). Concomitant wastewater treatment with lipid and carotenoid production by the oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* grown on brewery effluent enriched with sugarcane molasses and urea. *Process Biochem*, **94**, 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2020.03.015>
- Diaz, M., Pedrozo, F., & Baccala, N. (2000). Summer classification of southern hemisphere temperate lakes (Patagonia, Argentina). *Lakes & Reservoirs: Research & Management*, **5**(4), 213-229.
- Dowd, S., Sun, Y., & Allen, V. I. V. I. E. N. (2008a). Tag-encoded pyrosequencing analysis of bacterial diversity in a single soil type as affected by management and land use. *Soil Biology and Biochemistry*, **40**(11), 2762-2770.
- Dowd, S. E., Sun, Y., Wolcott, R. D., Domingo, A., & Carroll, J. A. (2008b). Bacterial tag–encoded FLX amplicon pyrosequencing (bTEFAP) for microbiome studies: bacterial diversity in the ileum of newly weaned *Salmonella*-infected pigs. *Foodborne pathogens and disease*, **5**(4), 459-472.
- Dresch, P., Falbesoner, J., Ennemoser, C., Hittorf, M., Kuhnert, R., & Peintner, U. (2019). Emerging from the ice—fungal communities are diverse and dynamic in earliest soil developmental stages of a receding glacier. *Environmental Microbiology*, **21**(5), 1864–1880. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14598>
- Duarte, S. H., Ghiselli, G., & Maugeri, F. (2013). Influence of culture conditions on lipid production by *Candida* sp. LEB-M3 using glycerol from biodiesel synthesis. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, **2**(4), 339-343.
- Duo Saito, R. A. (2015). Estudio de tolerancia al estrés de levaduras adaptadas al frío: Efectos sobre la producción de metabolitos de interés biotecnológico. Tesina de Licenciatura en Ciencias Biológicas. Universidad Nacional del Comahue, San Carlos de Bariloche.
- Economou, C. N., Aggelis, G., Pavlou, S., & Vayenas, D. V. (2011). Single cell oil production from rice hulls hydrolysate. *Bioresource Technology*, **102**(20), 9737-9742.
- Edgar, R. C. (2010). Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics*, **26**(19), 2460-2461.
- Edwards, A., Cameron, K. A., Cook, J. M., Debbonaire, A. R., Furness, E., Hay, M. C., & Rassner, S. M. (2020). Microbial genomics amidst the Arctic crisis. *Microbial genomics*, **6**(5).
- El Baidouri, F., Zalar, P., James, T. Y., Gladfelter, A. S., & Amend, A. S. (2021). Evolution and Physiology of Amphibious Yeasts. *Annual review of microbiology*, **75**, 337-357.
- Eren, A. M., Zozaya, M., Taylor, C. M., Dowd, S. E., Martin, D. H., & Ferris, M. J. (2011). Exploring the diversity of *Gardnerella vaginalis* in the genitourinary tract microbiota of monogamous couples through subtle nucleotide variation. *PloS one*, **6**(10), e26732.
- Espínola, F., Dionisi, H. M., Borglin, S., Brislawn, C. J., Jansson, J. K., Mac Cormack, W. P., ... & Lozada, M. (2018). Metagenomic analysis of subtidal sediments from polar and subpolar coastal environments highlights the relevance of anaerobic hydrocarbon degradation processes. *Microbial ecology*, **75**(1), 123-139.
- Favier, A. (2019). Evaluación del potencial oleaginoso de una especie psicrófila de levaduras: Contenido lipídico y análisis genómico. Tesina de Licenciatura en Ciencias Biológicas. Universidad Nacional del Comahue, San Carlos de Bariloche.
- Fei, Q., Chang, H. N., & Shang, L. (2011). Exploring low-cost carbon sources for microbial lipids production by fed-batch cultivation of *Cryptococcus albidus*. *Biotechnology and bioprocess engineering*, **16**(3), 482-487.
- Feller, G. (2017). Cryosphere and psychrophiles: insights into a cold origin of life? *Life*, **7**(2), 25.

- Felczykowska, A., Krajewska, A., Zielińska, S., & Łoś, J. M. (2015). Sampling, metadata and DNA extraction-important steps in metagenomic studies. *Acta Biochimica Polonica*, **62**(1).
- Fernández, N. V., Mestre, C. M., Marchelli, P., & Fontenla, S. B. (2012). Yeast and yeast-like fungi associated with dry indehiscent fruits of *Nothofagus nervosa* in Patagonia, Argentina. *FEMS Microbiology Ecology*, **80**(1), 179-192.
- Fernández, N. V., Marchelli, P., Gherghel, F., Kost, G., & Fontenla, S. B. (2015). Ectomycorrhizal fungal communities in *Nothofagus nervosa* (Raulí): a comparison between domesticated and naturally established specimens in a native forest of Patagonia, Argentina. *Fungal ecology*, **18**, 36-47.
- Fernández, N. V., Fontenla, S. B., Moguevsky, D., Meie, S., Rilling, J., & Cornejo, P. (2018). *Nothofagus pumilio* forest affected by recent tephra deposition in northern Patagonia. II-Shifts in diversity and structure of rhizosphere fungal communities. *Journal of soil science and plant nutrition*, **18**(2), 499-511.
- Ferreira, M. (1995). Comparación de la flora y vegetación Alto-andina a lo largo de una transecta longitudinal en el Parque Nacional Nahuel Huapi, Argentina, Tesina de Licenciatura en Ciencias Biológicas. Universidad Nacional del Comahue. San Carlos de Bariloche.
- Ferreira, M., Clayton, S. & Ezcurra, C. (1998). La flora altoandina de los sectores este y oeste del Parque Nacional Nahuel Huapi, Argentina. *Darwiniana*, 65-79.
- Filippucci, S., Tasselli, G., Scardua, A., Di Mauro, S., Cramarossa, M. R., Perini, D., ... & Buzzini, P. (2016). Study of *Holtermanniella wattica*, *Leucosporidium creatinivorum*, *Naganishia adeliensis*, *Solicoccozyma aerea*, and *Solicoccozyma terricola* for their lipogenic aptitude from different carbon sources. *Biotechnology for biofuels*, **9**(1), 1-14.
- Fillaudeau, L., Blanpain-Avet, P., & Daufin, G. (2006). Water, wastewater and waste management in brewing industries. *Journal of cleaner production*, **14**(5), 463-471.
- Firdaus-Raih, M., Hashim, N. H. F., Bharudin, I., Abu Bakar, M.F., Huang, K. K., Alias, H., et al. (2018). The *Glaciozyma antarctica* genome reveals an array of systems that provide sustained responses towards temperature variations in a persistently cold habitat. *PLoS ONE*, **13**(1), e0189947.
- Fonseca, A. & Inácio, J. (2006). Phylloplane yeasts. In C. Rosa (Ed), *Biodiversity and ecophysiology of yeasts.*, pp. 263-301. Springer Berlin, Heidelberg.
- França, L., Sannino, C., Turchetti, B., Buzzini, P., & Margesin, R. (2016). Seasonal and altitudinal changes of culturable bacterial and yeast diversity in Alpine forest soils. *Extremophiles*, **20**(6), 855-873. <https://doi.org/10.1007/s00792-016-0874-2>
- Freeman, K. R., Martin, A. P., Karki, D., Lynch, R. C., Mitter, M. S., Meyer, A. F., ... & Schmidt, S. K. (2009). Evidence that chytrids dominate fungal communities in high-elevation soils. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **106**(43), 18315-18320.
- Frisvad, J. C., Andersen, B., & Thrane, U. (2008). The use of secondary metabolite profiling in chemotaxonomy of filamentous fungi. *Mycological Research*, **112**(2), 231-240. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2007.08.018>
- Furbino, L. E., Godinho, V. M., Santiago, I. F., Pellizari, F. M., Alves, T. M., Zani, C. L., ... & Rosa, L. H. (2014). Diversity patterns, ecology and biological activities of fungal communities associated with the endemic macroalgae across the Antarctic Peninsula. *Microbial Ecology*, **67**(4), 775-787.
- Gadanho, M., & Sampaio, J. P. (2009). *Cryptococcus ibericus* sp. nov., *Cryptococcus aciditolerans* sp. nov. and *Cryptococcus metallitolerans* sp. nov., a new ecoclade of anamorphic basidiomycetous yeast species from an

- extreme environment associated with acid rock drainage in São Domingos pyrite mine, Portugal. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, **59**(9), 2375-2379.
- Garay, L. A., Sitepu, I. R., Cajka, T., Xu, J., Teh, H. E., German, J. B., ... & Boundy-Mills, K. L. (2018). Extracellular fungal polyol lipids: a new class of potential high value lipids. *Biotechnology advances*, **36**(2), 397-414.
- Garcia-Lopez, E., & Cid, C. (2017). Glaciers and ice sheets as analog environments of potentially habitable icy worlds. *Frontiers in microbiology*, **8**, 1407.
- Garcia-Lopez, E., Moreno, A. M., & Cid, C. (2019). Microbial community structure and metabolic networks in Polar Glaciers. *Metagenomics-Basics, Methods and Applications*, **53**(543), 501-505.
- Garg, A., & Jain, S. (2020). Process parameter optimization of biodiesel production from algal oil by response surface methodology and artificial neural networks. *Fuel*, **277**, 118254.
- Georlette, D., Blaise, V., Collins, T., D'Amico, S., Gratia, E., Hoyoux, A., ... & Gerday, C. (2004). Some like it cold: biocatalysis at low temperatures. *FEMS Microbiology Reviews*, **28**(1), 25-42.
- Gianinazzi, S., Gollotte, A., Binet, M. N., van Tuinen, D., Redecker, D., & Wipf, D. (2010). Agroecology: the key role of arbuscular mycorrhizas in ecosystem services. *Mycorrhiza*, **20**(8), 519-530.
- Gilichinsky, D. A., Wilson, G. S., Friedmann, E. I., McKay, C. P., Sletten, R. S., Rivkina, E. M., ... & Tiedje, J. M. (2007). Microbial populations in Antarctic permafrost: biodiversity, state, age, and implication for astrobiology. *Astrobiology*, **7**(2), 275-311.
- Glassman, S. I., & Martiny, J. B. (2018). Broad-scale ecological patterns are robust to use of exact sequence variants versus operational taxonomic units. *MSphere*, **3**(4), e00148-18.
- Gleason, F. H., Letcher, P. M., & McGee, P. A. (2008). Freeze tolerance of soil chytrids from temperate climates in Australia. *Mycological Research*, **112**(8), 976-982.
- Gleason, F. H., Schmidt, S. K., & Marano, A. V. (2010). Can zoospore true fungi grow or survive in extreme or stressful environments?. *Extremophiles*, **14**(5), 417-425.
- Godinho, V. M., Furbino, L. E., Santiago, I. F., Pellizzari, F. M., Yokoya, N. S., Pupo, D., ... Rosa, L. H. (2013). Diversity and bioprospecting of fungal communities associated with endemic and cold-adapted macroalgae in Antarctica. *ISME Journal*, **7**(7), 1434-1451. <https://doi.org/10.1038/ismej.2013.77>
- Godinho, V. M., Gonçalves, V. N., Santiago, I. F., Figueredo, H. M., Vitoreli, G. A., Schaefer, C. E., Junior, P. A., et al. (2015). Diversity and bioprospection of fungal community present in oligotrophic soil of continental Antarctica. *Extremophiles*, **19**(3), 585-596. <https://doi.org/10.1007/s00792-015-0741-6>
- Goiris, K., Muylaert, K., Fraeye, I., Foubert, I., De Brabanter, J., & De Cooman, L. (2012). Antioxidant potential of microalgae in relation to their phenolic and carotenoid content. *Journal of applied phycology*, **24**(6), 1477-1486.
- Gołębiewski, M., & Tretyn, A. (2020). Generating amplicon reads for microbial community assessment with next-generation sequencing. *Journal of Applied Microbiology*, **128**(2), 330-354. <https://doi.org/10.1111/jam.14380>
- Golterman, H. L., Clyno R.S., Ohsntad M.A.M. (1978). Methods for chemical analysis of fresh waters.
- Gomes, E. C. Q., Godinho, V. M., Silva, D. A. S., de Paula, M. T. R., Vitoreli, G. A., Zani, C. L., ... Rosa, L. H. (2018). Cultivable fungi present in Antarctic soils: taxonomy, phylogeny, diversity, and bioprospecting of antiparasitic and herbicidal metabolites. *Extremophiles*, **22**(3), 381-393. <https://doi.org/10.1007/s00792-018-1003-1>

- Gonçalves, V. N., Vaz, A. B. M., Rosa, C. A., & Rosa, L. H. (2012). Diversity and distribution of fungal communities in lakes of Antarctica. *FEMS Microbiology Ecology*, **82**(2), 459–471. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2012.01424.x>
- Gonçalves, V. N., Vitoreli, G. A., de Menezes, G. C. A., Mendes, C. R. B., Secchi, E. R., Rosa, C. A., & Rosa, L. H. (2017). Taxonomy, phylogeny and ecology of cultivable fungi present in seawater gradients across the Northern Antarctica Peninsula. *Extremophiles*, **21**(6), 1005–1015. <https://doi.org/10.1007/s00792-017-0959-6>
- Gonzalez, A., King, A., Robeson, M. S., Song, S., Shade, A., Metcalf, J. L., & Knight, R. (2012). Characterizing microbial communities through space and time. *Current Opinion in Biotechnology*. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2011.11.017>
- Gonzalez-Polo, M., & Austin, A. T. (2009). Spatial heterogeneity provides organic matter refuges for soil microbial activity in the Patagonian steppe, Argentina. *Soil Biology and Biochemistry*, **41**(6), 1348-1351.
- Goordial J., Lamarche-Gagnon, G., Lay, C. Y., & Whyte, L. (2013). Left out in the cold: Life in Cryoenvironments. In Seckbach J., et al (Eds.), *Polyextremophiles: Life under multiple form of stress*, pp 335-364.
- Gostinčar, C., Grube, M., De Hoog, S., Zalar, P., & Gunde-Cimerman, N. (2009). Extremotolerance in fungi: evolution on the edge. *FEMS microbiology ecology*, **71**(1), 2-11.
- Gostinčar, C., Muggia, L., & Grube, M. (2012). Polyextremotolerant black fungi: Oligotrophism, adaptive potential, and a link to lichen symbioses. *Frontiers in Microbiology*, **3**(NOV), 1–6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00390>
- Gostinčar, C., Ohm, R. A., Kogej, T., Sonjak, S., Turk, M., Zajc, J., ... & Gunde-Cimerman, N. (2014). Genome sequencing of four *Aureobasidium pullulans* varieties: biotechnological potential, stress tolerance, and description of new species. *BMC genomics*, **15**(1), 1-29.
- Gostinčar, C., Turk, M., Zajc, J., & Gunde-Cimerman, N. (2019). Fifty *Aureobasidium pullulans* genomes reveal a recombining polyextremotolerant generalist. *Environmental Microbiology*, **21**(10), 3638–3652. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14693>
- Grasshoff, K. (1983). *Methods of Seawater Analysis* (eds Grasshoff, K., Ehrhardt, M. and Kremling, K.), Verlag Chemie.
- Grube, M., Schmid, F., & Berg, G. (2011). Black fungi and associated bacterial communities in the phyllosphere of grapevine. *Fungal Biology*, **115**(10), 978-986.
- Gunde-Cimerman, N., Zalar, P., de Hoog, S., & Plemenitaš, A. (2000). Hypersaline waters in salterns–natural ecological niches for halophilic black yeasts. *FEMS microbiology Ecology*, **32**(3), 235-240.
- Gunde-Cimerman, N., Sonjak, S., Zalar, P., Frisvad, J. C., Diderichsen, B., & Plemenitaš, A. (2003). Extremophilic fungi in arctic ice: a relationship between adaptation to low temperature and water activity. *Physics and Chemistry of the Earth*, **28**(28-32), 1273-1278.
- Gunde-Cimerman, N., Zalar, P., Petrovič, U., Turk, M., Kogej, T., de Hoog, G. S., & Plemenitaš, A. (2004). Fungi in Salterns. In Gunde-Cimerman N., et al (Eds.), *Halophilic Microorganisms*, pp 103-113.
- Gupta, S. K., Katagi, S., Chatterjee, S., Prasad, R. K., Datta, S., Vairale, M. G., ... & Gupta, D. K. (2020). Cold adaptation in bacteria with special focus on cellulase production and its potential application. *Journal of Cleaner Production*, **258**, 120351.
- Gutiérrez, M. H., Galand, P. E., Moffat, C., & Pantoja, S. (2015). Melting glacier impacts community structure of Bacteria, Archaea and Fungi in a Chilean Patagonia fjord. *Environmental Microbiology*, **17**, 3882–3897. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12872>

- Hamilton, T. L., Peters, J. W., Skidmore, M. L., & Boyd, E. S. (2013). Molecular evidence for an active endogenous microbiome beneath glacial ice. *The ISME journal*, **7**(7), 1402-1412.
- Harris, S. D. (2011). Hyphal morphogenesis: an evolutionary perspective. *Fungal Biology*, **115**(6), 475–484. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2011.02.002>
- Hassan, N., Rafiq, M., Hayat, M., Shah, A. A., & Hasan, F. (2016). Psychrophilic and psychrotrophic fungi: a comprehensive review. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, **15**(2), 147-172.
- Hassan, N., Rafiq, M., Hayat, M., Nadeem, S., Shah, A. A., & Hasan, F. (2017). Potential of psychrotrophic fungi isolated from Siachen glacier, Pakistan, to produce antimicrobial metabolites. *Applied Ecology and Environmental Research*, **15**(3), 1157–1171.
- Hassett, B. T., Ducluzeau, A. L. L., Collins, R. E., & Gradinger, R. (2017). Spatial distribution of aquatic marine fungi across the western Arctic and sub-arctic. *Environmental microbiology*, **19**(2), 475-484.
- Hattori T (1980) A note on the effect of different types of agar on plate count of oligotrophic bacteria in soil. *The Journal of General and Applied Microbiology*, **26**:373–374
- He, X., & Zhang, J. (2009). On the growth of scientific knowledge: Yeast biology as a case study. *PLOS Computational Biology*, **5**(3), e1000320.
- Herbert, R. A. (1992). A perspective on the biotechnological potential of extremophiles. *Trends in Biotechnology*, **10**, 395-402.
- Hibbett, D. S., Binder, M., Bischoff, J. F., Blackwell, M., Cannon, P. F., Eriksson, O. E., ... & Zhang, N. (2007). A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological research*, **111**(5), 509-547.
- Higgins, P. A., & Vellinga, M. (2004). Ecosystem responses to abrupt climate change: teleconnections, scale and the hydrological cycle. *Climatic Change*, **64**(1), 127-142.
- Hodson, A., Anesio, A. M., Tranter, M., Fountain, A., Osborn, M., Priscu, J., ... & Sattler, B. (2008). Glacial ecosystems. *Ecological monographs*, **78**(1), 41-67.
- Hoffmeister, D., & Keller, N. P. (2007). Natural products of filamentous fungi: enzymes, genes, and their regulation. *Natural product reports*, **24**(2), 393-416.
- Hotaling, S., Hood, E., & Hamilton, T. L. (2017). Microbial ecology of mountain glacier ecosystems: biodiversity, ecological connections and implications of a warming climate. *Environmental microbiology*, **19**(8), 2935-2948.
- Hotaling, S., Shain, D. H., Lang, S. A., Bagley, R. K., Tronstad, L. M., Weisrock, D. W., & Kelley, J. L. (2019). Long-distance dispersal, ice sheet dynamics and mountaintop isolation underlie the genetic structure of glacier ice worms. *Proceedings of the Royal Society B*, **286**(1905), 20190983.
- Huang, C., Chen, X. F., Xiong, L., Ma, L. L., & Chen, Y. (2013). Single cell oil production from low-cost substrates: the possibility and potential of its industrialization. *Biotechnology advances*, **31**(2), 129-139.
- Hultberg, M., & Bodin, H. (2017). Fungi-based treatment of brewery wastewater—biomass production and nutrient reduction. *Applied microbiology and biotechnology*, **101**(11), 4791-4798.
- IANIGLA. (2018). Inventario Nacional de Glaciares.
- Iasimone, F., Zuccaro, G., D'Orlando, V., Franci, G., Galdiero, M., Pirozzi, D., ... & Pirozzi, F. (2018). Combined yeast and microalgal cultivation in a pilot-scale raceway pond for urban wastewater treatment and potential biodiesel production. *Water Science and Technology*, **77**(4), 1062-1071.
- Iassonova, D. R., Hammond, E. G., & Beattie, S. E. (2008). Oxidative stability of polyunsaturated triacylglycerols encapsulated in oleaginous yeast. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **85**(8), 711-716.

- Iskandar, A., Taha A, Ahmed RZ, Motoigi T, Watanabe K, Kurosawa N, Okuyama H (2013) Lipids in cold- adapted microorganisms. In: Yumoto I (ed) *Cold-adapted microorganisms*. Caister Academic Press, Wymondham
- Jin, M., Slininger, P. J., Dien, B. S., Waghmode, S., Moser, B. R., Orjuela, A. ... & Balan, V. (2015). Microbial lipid-based lignocellulosic biorefinery: feasibility and challenges. *Trends in biotechnology*, **33**(1), 43-54.
- Johnson E. A. & Echavarri-Erasun C. (2011). Yeast Biotechnology. In: Kurtzman C.P., et al (Eds.) *The Yeasts, Fifth Edition: A Taxonomic Study*. 5th edn. Elsevier. Amsterdam, pp. 21-44.
- Johnson, E. A. (2013a). Biotechnology of non-Saccharomyces yeasts—the ascomycetes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **97**(2), 503-517.
- Johnson E. A. (2013b). Biotechnology of non-Saccharomyces yeasts—the basidiomycetes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **97**(17), 7563-7577.
- Karamerou, E. E., Theodoropoulos, C., & Webb, C. (2016). A biorefinery approach to microbial oil production from glycerol by *Rhodotorula glutinis*. *Biomass and Bioenergy*, **89**, 113-122.
- Karpov, S. A., Mamanazarova, K. S., Popova, O. V., Aleoshin, V. V., James, T. Y., Mamkaeva, M. A., ... & Longcore, J. E. (2017). Monoblepharidomycetes diversity includes new parasitic and saprotrophic species with highly intronized rDNA. *Fungal biology*, **121**(8), 729-741.
- Khot, M., Kamat, S., Zinjarde, S., Pant, A., Chopade, B., & RaviKumar, A. (2012). Single cell oil of oleaginous fungi from the tropical mangrove wetlands as a potential feedstock for biodiesel. *Microbial Cell Factories*, **11**(1), 71.
- Kilias, E. S., Junges, L., Šupraha, L., Leonard, G., Metfies, K., & Richards, T. A. (2020). Chytrid fungi distribution and co-occurrence with diatoms correlate with sea ice melt in the Arctic Ocean. *Communications biology*, **3**(1), 1-13.
- Kimura, K., Yamaoka, M., & Kamisaka, Y. (2004). Rapid estimation of lipids in oleaginous fungi and yeasts using Nile red fluorescence. *Journal of Microbiological Methods*, **56**(3), 331-338.
- King-Miaow, K., Lee, K., Maki, T., LaCap-Bugler, D., & Archer, S. D. J. (2019). Airborne Microorganisms in Antarctica: *Transport, Survival and Establishment*. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-02786-5\\_8](https://doi.org/10.1007/978-3-030-02786-5_8)
- Kirk, P. M., Cannon, P. F., Minter, D. W., & Stalpers, J. A. (Eds.). (2008). Dictionary of the Fungi. CAB International (Vol. 113). Wallingford, UK: Elsevier BV. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2009.07.003>
- Kolouchová, I., Mařátková, O., Sigler, K., Masák, J., & Řezanka, T. (2016). Lipid accumulation by oleaginous and non-oleaginous yeast strains in nitrogen and phosphate limitation. *Folia microbiologica*, **61**(5), 431-438.
- Kot, A. M., Błażej, S., Kieliszek, M., Gientka, I., & Bryś, J. (2019). Simultaneous production of lipids and carotenoids by the red yeast *Rhodotorula* from waste glycerol fraction and potato wastewater. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **189**(2), 589-607.
- Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*, **33**, 1870-1874.
- Kuo, S. (1996). Phosphorus. In D. L. Sparks. (Ed.), *Methods of Soil Analysis: Part 3- Chemical Methods*. SSSA. Madison, pp. 869-919.
- Kraisintu, P., Yongmanitchai, W., & Limtong, S. (2010). Selection and optimization for lipid production of a newly isolated oleaginous yeast, *Rhodospiridium toruloides* DMKU3-TK16. *Agriculture and Natural Resources*, **44**(3), 436-445.

- Kurtzman, C. P., Fell, J. W., & Boekhout, T. (2011). Gene Sequence Analyses and other DNA-Based Methods for Yeast Species Recognition. In Kurtzman C.P., et al (Eds.), *The Yeasts, Fifth Edition: A Taxonomic Study*. 5th edn. Elsevier. Amsterdam, pp 137 - 144.
- Kurtzman, C. P., Mateo, R. Q., Kolecka, A., Theelen, B., Robert, V., & Boekhout, T. (2015). Advances in yeast systematics and phylogeny and their use as predictors of biotechnologically important metabolic pathways. *FEMS Yeast Research*, **15**(6), 1–73. <https://doi.org/10.1093/femsyr/fov050>
- Lages, F., Silva-Graça, M., & Lucas, C. (1999). Active glycerol uptake is a mechanism underlying halotolerance in yeasts: a study of 42 species. *Microbiology*, **145**(9), 2577-2585.
- Lahav, R., Fareleira, P., Nejdat, A., & Abeliovich, A. (2002). The identification and characterization of osmotolerant yeast isolates from chemical wastewater evaporation ponds. *Microbial ecology*, 388-396.
- LaMondia, J., & Timper, P. (2016). Interactions of microfungi and plant-parasitic nematodes. In *Biology of Microfungi* (pp. 573-614). Springer, Cham.
- Lê S, Josse J. & Husson, F. (2008). FactoMineR: A Package for Multivariate Analysis. *Journal of Statistical Software*, **25**(1), 1–18. doi: 10.18637/jss.
- Lee, S. G., Koh, H. Y., Lee, J. H., Kang, S. H., & Kim, H. J. (2012). Cryopreservative effects of the recombinant ice-binding protein from the arctic yeast *Leucosporidium* sp. on red blood cells. *Applied biochemistry and biotechnology*, **167**(4), 824-834.
- Leesing, R., & Karraphan, P. (2011). Kinetic growth of the isolated oleaginous yeast for microbial lipid production. *African Journal of Biotechnology*, **10**(63), 13867-13877.
- Lehmann-Konera, S., Ruman, M., Kozioł, K., Gajek, G., & Polkowska, Ż. (2017). Glaciers as an Important Element of the World Glacier Monitoring Implemented in Svalbard. *Glaciers Evolution in a Changing World*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.69237>
- Li, Q., Du, W., & Liu, D. (2008). Perspectives of microbial oils for biodiesel production. *Applied microbiology and biotechnology*, **80**(5), 749-756.
- Li, Y., Han, D., Hu, G., Dauvillee, D., Sommerfeld, M., Ball, S., & Hu, Q. (2010). Chlamydomonas starchless mutant defective in ADP-glucose pyrophosphorylase hyper-accumulates triacylglycerol. *Metabolic engineering*, **12**(4), 387-391.
- Li, S. L., Lin, Q., Li, X. R., Xu, H., Yang, Y. X., Qiao, D. R., & Cao, Y. (2012). Biodiversity of the oleaginous microorganisms in Tibetan Plateau. *Brazilian Journal of Microbiology*, **43**(2), 627-634.
- Liang, M. H., & Jiang, J. G. (2013). Advancing oleaginous microorganisms to produce lipid via metabolic engineering technology. *Progress in lipid research*, **52**(4), 395-408.
- Libkind, D., Brizzio, S., Ruffini, A., Gadanho, M., van Broock, M., & Sampaio, J. P. (2003). Molecular characterization of carotenogenic yeasts from aquatic environments in Patagonia, Argentina. *Antonie van Leeuwenhoek*, **84**(4), 313-322.
- Libkind, D.; Brizzio, S. & van Broock, M.R. (2004). *Rhodotorula mucilaginosa*, a carotenoid producing yeast strain from a Patagonian high altitude lake. *Folia Microbiologica* **49**(1), 19-25.
- Libkind, D.; Gadanho, M.; van Broock, M.R. & Sampaio, J.P. (2005). *Sporidiobolus longiusculus* sp. nov. and *Sporobolomyces patagonicus* sp. nov., novel yeasts of the Sporidiobolales isolated from aquatic environments in Patagonia, Argentina. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. **55**(1), 503-509.
- Libkind, D. & van Broock, M.R. (2006). Biomass and carotenoid pigments production by Patagonian native yeasts. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **22**(7), 687-692.

- Libkind, D. (2007). Evaluación de la técnica de MSP-PCR para la caracterización molecular de aislamientos de *Rhodotorula mucilaginosa* provenientes de la Patagonia noroccidental. *Revista Argentina de Microbiología*, **39**(3), 133-137.
- Libkind, D., Moliné, M., de García, V., Fontenla, S., & van Broock, M. (2008a). Characterization of a novel South American population of the astaxanthin producing yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*). *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, **35**(3), 151-158.
- Libkind, D., Arts, M. T., & Van Broock, M. (2008b). Fatty acid composition of cold-adapted carotenogenic basidiomycetous yeasts. *Revista Argentina de Microbiología*, **40**(4), 193-197.
- Libkind, D., Gadanho, M., Broock, M. V., & Sampaio, J. P. (2008c). Studies on the heterogeneity of the carotenogenic yeast *Rhodotorula mucilaginosa* from Patagonia, Argentina. *Journal of basic microbiology*, **48**(2), 93-98.
- Libkind, D., Gadanho, M., van Broock, M., & Sampaio, J. P. (2009a). *Cystofilobasidium lacus-mascardii* sp. nov., a basidiomycetous yeast species isolated from aquatic environments of the Patagonian Andes, and *Cystofilobasidium macerans* sp. nov., the sexual stage of *Cryptococcus macerans*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **59**(3), 622-630.
- Libkind, D., Moliné, M., Sampaio, J. P., & Van Broock, M. (2009b). Yeasts from high-altitude lakes: influence of UV radiation. *FEMS microbiology ecology*, **69**(3), 353-362.
- Libkind, D., Sampaio, J. P., & van Broock, M. (2010). Cystobasidiomycetes yeasts from Patagonia (Argentina): description of *Rhodotorula meli* sp. nov. from glacial meltwater. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **60**(9), 2251-2256.
- Libkind D., Moline M., Bellora N., Trochine A., & de García V. (2016). Patagonian yeasts of Biotechnological relevance. In: Olivera, N. L., Libkind, D., & Donati, E. (Eds.) *Biology and biotechnology of Patagonian microorganisms*. Springer International Publishing. pp 325-351.
- Libkind, D., Buzzini, P., Turchetti, B., & Rosa, C. A. (2017). Yeasts in Continental and Seawater. In P. Buzzini, M. A. Lachance, & A. Yurkov (Eds.), *Yeasts in Natural Ecosystems: Diversity*. Springer International Publishing. pp. 1-499 <https://doi.org/10.1007/978-3-319-62683-3>
- Libkind, D., Peris, D., Cubillos, F. A., Steenwyk, J. L., Oplente, D. A., Langdon, Q. K., ... & Hittinger, C. T. (2020). Into the wild: new yeast genomes from natural environments and new tools for their analysis. *FEMS yeast research*, **20**(2), foaa008.
- Ling, J., Nip, S., Cheok, W. L., de Toledo, R. A., & Shim, H. (2014). Lipid production by a mixed culture of oleaginous yeast and microalga from distillery and domestic mixed wastewater. *Bioresource Technology*, **173**, 132-139.
- Linnakoski, R., Kasanen, R., Lasarov, I., Marttinen, T., Oghenekaro, A. O., Sun, H., ... Heliövaara, K. (2018). *Cadophora margaritata* sp. nov. and other fungi associated with the longhorn beetles *Anoplophora glabripennis* and *Saperda carcharias* in Finland. *Antonie van Leeuwenhoek*, **111**(11), 2195-2211. <https://doi.org/10.1007/s10482-018-1112-y>
- Liu, H., Zhao, X., Wang, F., Jiang, X., Zhang, S., Ye, M., ... & Zou, H. (2011). The proteome analysis of oleaginous yeast *Lipomyces starkeyi*. *FEMS yeast research*, **11**(1), 42-51.
- Liu, X. Z., Wang, Q. M., Theelen, B., Groenewald, M., Bai, F. Y., & Boekhout, T. (2015). Phylogeny of tremellomycetous yeasts and related dimorphic and filamentous basidiomycetes reconstructed from multiple gene sequence analyses. *Studies in Mycology*, **81**, 1-26. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2015.08.001>

- Li, A. H., Yuan, F. X., Groenewald, M., Bensch, K., Yurkov, A. M., Li, K., ... & Bai, F. Y. (2020). Diversity and phylogeny of basidiomycetous yeasts from plant leaves and soil: proposal of two new orders, three new families, eight new genera and one hundred and seven new species. *Studies in Mycology*, **96**(1), 17-140.
- Longcore, J. E., Barr, D. J., & Desaulniers, N. (1995). *Powellomyces*, a new genus in the Spizellomycetales. *Canadian Journal of Botany*, **73**(9), 1385-1390.
- Loviso, C. L., Lozada, M., Guibert, L. M., Musumeci, M. A., Sarango Cardenas, S., Kuin, R. V., ... & Dionisi, H. M. (2015). Metagenomics reveals the high polycyclic aromatic hydrocarbon-degradation potential of abundant uncultured bacteria from chronically polluted subantarctic and temperate coastal marine environments. *Journal of Applied Microbiology*, **119**(2), 411-424.
- Luo, B., Sun, H., Zhang, Y., Gu, Y., Yan, W., Zhang, R., & Ni, Y. (2019). Habitat-specificity and diversity of culturable cold-adapted yeasts of a cold-based glacier in the Tianshan Mountains, northwestern China. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **103**(5), 2311–2327. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9512-5>
- Madariaga-Mazón, A., González-Andrade, M., González, M. D. C., Glenn, A. E., Cerda-García-Rojas, C. M., & Mata, R. (2013). Absolute configuration of acremoxanthone C, a potent calmodulin inhibitor from *Purpureocillium lilacinum*. *Journal of Natural Products*, **76**(8), 1454-1460.
- Maggi, O., Tosi, S., Angelova, M., Lagostina, E., Fabbri, A. A., Pecoraro, L., ... & Buzzini, P. (2013). Adaptation of fungi, including yeasts, to cold environments. *Plant Biosystems-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*, **147**(1), 247-258.
- Mancera-López, M. E., Esparza-García, F., Chávez-Gómez, B., Rodríguez-Vázquez, R., Saucedo-Castaneda, G., & Barrera-Cortés, J. (2008). Bioremediation of an aged hydrocarbon-contaminated soil by a combined system of biostimulation–bioaugmentation with filamentous fungi. *International Biodeterioration & Biodegradation*, **61**(2), 151-160.
- Marchão, L., da Silva, T. L., Gouveia, L., & Reis, A. (2018). Microalgae-mediated brewery wastewater treatment: effect of dilution rate on nutrient removal rates, biomass biochemical composition, and cell physiology. *Journal of Applied Phycology*, **30**(3), 1583-1595.
- Marella, T. K., Parine, N. R., & Tiwari, A. (2018). Potential of diatom consortium developed by nutrient enrichment for biodiesel production and simultaneous nutrient removal from waste water. *Saudi Journal of Biological Sciences*, **25**(4), 704-709.
- Margesin, R., & Collins, T. (2019). Microbial ecology of the cryosphere (glacial and permafrost habitats): current knowledge. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **103**(6), 2537–2549. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09631-3>
- Margesin, R., & Miteva, V. (2011). Diversity and ecology of psychrophilic microorganisms. *Research in Microbiology*, **162**(3), 346-361.
- Margesin, R., Neuner, G., & Storey, K. B. (2007). Cold-loving microbes, plants, and animals - Fundamental and applied aspects. *Naturwissenschaften*, **94**(2), 77–99. <https://doi.org/10.1007/s00114-006-0162-6>
- Martinez, A., Cavello, I., Garmendia, G., Rufo, C., Cavalitto, S., & Vero, S. (2016). Yeasts from sub-Antarctic region: biodiversity, enzymatic activities and their potential as oleaginous microorganisms. *Extremophiles*, **20**(5), 759–769. <https://doi.org/10.1007/s00792-016-0865-3>
- Martyniuk, N., Modenutti, B., & Balseiro, E. G. (2014). Can increased glacial melting resulting from global change provide attached algae with transient protection against high irradiance?. *Freshwater Biology*, **59**(11), 2290-2302.

- Masiokas, M. H., Villalba, R., Luckman, B. H., Lascano, M. E., Delgado, S., & Stepanek, P. (2008). 20th-century glacier recession and regional hydroclimatic changes in northwestern Patagonia. *Global and Planetary Change*, *60*(1-2), 85-100.
- Masiokas, M. H., Rabatel, A., Rivera, A., Ruiz, L., Pitte, P., Ceballos, J. L., ... & MacDonell, S. (2020). A review of the current state and recent changes of the Andean cryosphere. *Frontiers in Earth Science*, *8*, 99.
- Matsakas, L., Bonturi, N., Miranda, E. A., Rova, U., & Christakopoulos, P. (2015). High concentrations of dried sorghum stalks as a biomass feedstock for single cell oil production by *Rhodospiridium toruloides*. *Biotechnology for biofuels*, *8*(1), 1-6.
- Maza, D. D., Viñarta, S. C., Su, Y., Guillamón, J. M., & Aybar, M. J. (2020). Growth and lipid production of *Rhodotorula glutinis* R4, in comparison to other oleaginous yeasts. *Journal of biotechnology*, *310*, 21-31.
- Mclaughlin, D. J., & Spatafora, J. W. (Eds.). (2014). *The Mycota Systematics and Evolution Part A VII (Second)*. Springer. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-30826-0>
- Mclaughlin, D. J., & Spatafora, J. W. (Eds.). (2015). *The Mycota Systematics and Evolution Part B VII (Second)*. Springer. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-30826-0>
- Mestre, M.C., Libkind, D., Fontenla, S. 2009. Comparación de condiciones de cultivo para el aislamiento y recuento de levaduras de suelos de bosques nativos de *Nothofagus* spp. (Fagaceae), de la Patagonia Argentina. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica*. *44*(3-4), 229-238.
- Mestre, M. C., Rosa, C. A., Safar, S. V. B., Libkind, D., & Fontenla, S. B. (2011). Yeast communities associated with the bulk-soil, rhizosphere and ectomycorrhizosphere of a *Nothofagus pumilio* forest in northwestern Patagonia, Argentina. *FEMS Microbiology Ecology*, *78*(3), 531–541. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2011.01183.x>
- Mestre, M. C., Fontenla, S., & Rosa, C. A. (2014). Ecology of cultivable yeasts in pristine forests in northern Patagonia (Argentina) influenced by different environmental factors. *Canadian Journal of Microbiology*, *60*(6), 371–382.
- Mestre, M. C., Fontenla, S., Bruzone, M. C., Fernández, N. V., & Dames, J. (2016). Detection of plant growth enhancing features in psychrotolerant yeasts from Patagonia (Argentina). *Journal of basic microbiology*, *56*(10), 1098-1106.
- Mestre, M. C., & Fontenla, S. (2021). Yeast communities associated with ectomycorrhizal fungi in different *Nothofagus* forests of northwestern Patagonia. *Symbiosis*, *84*(2), 179-193.
- Miettinen, H., Kietäväinen, R., Sohlberg, E., Numminen, M., Ahonen, L., & Itävaara, M. (2015). Microbiome composition and geochemical characteristics of deep subsurface high-pressure environment, Pyhäsalmi mine Finland. *Frontiers in Microbiology*, *6*(OCT), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01203>
- Modenutti, B., Bastidas Navarro, M., Martyniuk, N., & Balseiro, E. (2018). Melting of clean and debris-rich ice differentially affect nutrients, dissolved organic matter and bacteria respiration in the early ontogeny of the newly formed proglacial Ventisquero Negro Lake (Patagonia Argentina). *Freshwater Biology*, *63*(11), 1341–1351. <https://doi.org/10.1111/fwb.13161>
- Moliné, M., Libkind, D., del Carmen Diéguez, M., & van Broock, M. (2009). Photoprotective role of carotenoids in yeasts: response to UV-B of pigmented and naturally-occurring albino strains. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, *95*(3), 156-161.

- Moliné, M.; Regina Flores, M.; Libkind, D.; Diéguez, M.C.; Farías, M.E. & van Broock, M. (2010). Photoprotection by carotenoid pigments in the yeast *Rhodotorula mucilaginosa*: the role of torularhodin. *Photochemical and Photobiological Sciences*, **9**, 1145–1151.
- Moliné, M., Arbeloa, E. M., Flores, M. R., Libkind, D., Farías, M. E., Bertolotti, S. G., ... & van Broock, M. R. (2011). UVB photoprotective role of mycosporines in yeast: photostability and antioxidant activity of mycosporine-glutaminol-glucoside. *Radiation research*, **175**(1), 44-50.
- Moliné M., et al. Production of Pigments and Photo-Protective Compounds by Cold-Adapted Yeasts. (2014). In Buzzini P. & R. Margesin (Eds). *Cold-Adapted Yeast, Biodiversity, Adaptation Strategies and Biotechnological Significance*, Vol. 9783642396, pp 193-224.
- Moreno C.E. (2001). Métodos para medir la biodiversidad. M&T–Manuales y Tesis SEA. vol. 1. Zaragoza.
- Morgan-Kiss, R. M., Priscu, J. C., Pockock, T., Gudynaite-Savitch, L., & Huner, N. P. (2006). Adaptation and acclimation of photosynthetic microorganisms to permanently cold environments. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **70**(1), 222-252.
- Msanne, J., Kim, H., & Cahoon, E. B. (2020). Biotechnology tools and applications for development of oilseed crops with healthy vegetable oils. *Biochimie*, **178**, 4-14.
- Muñoz M. (2010). Levaduras y Hongos Dimórficos del filoplano de *N. pumilio* y el papel de la exposición solar en su distribución y producción de metabolitos fotoprotectores. Tesina de Licenciatura en Ciencias Biológicas. Universidad Nacional del Comahue, San Carlos de Bariloche.
- Muñoz, M., Moliné, M., & Libkind, D. (2013). Comparación de técnicas para el aislamiento y recuento de levaduras y hongos dimórficos del filoplano de *Nothofagus pumilio*. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica*, **48**(2), 0-0.
- Naff, C. S., Darcy, J. L., & Schmidt, S. K. (2013). Phylogeny and biogeography of an uncultured clade of snow chytrids. *Environmental Microbiology*, **15**(10), 2672-2680.
- Naranjo-Ortiz, M. A., & Gabaldón, T. (2019). Fungal evolution: diversity, taxonomy and phylogeny of the Fungi. *Biological Reviews*, **94**(6), 2101–2137. <https://doi.org/10.1111/brv.12550>
- Nawaz, A., Purahong, W., Lehmann, R., Herrmann, M., Totsche, K. U., Küsel, K., Buscot, F., et al. (2018). First insights into the living groundwater mycobiome of the terrestrial biogeosphere. *Water Research*, **145**, 50–61. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.07.067>
- Nguyen, N. H., Song, Z., Bates, S. T., Branco, S., Tedersoo, L., Menke, J., Kennedy, P. G., et al. (2016). FUNGuild: An open annotation tool for parsing fungal community datasets by ecological guild. *Fungal Ecology*, **20**, 241–248. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2015.06.006>
- Nilsson, R. H., Anslan, S., Bahram, M., Wurzbacher, C., Baldrian, P., & Tedersoo, L. (2019a). Mycobiome diversity: high-throughput sequencing and identification of fungi. *Nature Reviews Microbiology*, **17**(2), 95–109. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0116-y>
- Nilsson, R. H., Larsson, K. H., Taylor, A. F. S., Bengtsson-Palme, J., Jeppesen, T. S., Schigel, D., ... Abarenkov, K. (2019b). The UNITE database for molecular identification of fungi: Handling dark taxa and parallel taxonomic classifications. *Nucleic Acids Research*, **47**(D1), D259–D264. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1022>
- Nisiotou, A. A., Chorianopoulos, N., Nychas, G. J., & Panagou, E. Z. (2010). Yeast heterogeneity during spontaneous fermentation of black *Conservolea* olives in different brine solutions. *Journal of Applied Microbiology*, **108**(2), 396-405.

- Nizovoy, P., Bellora, N., Haridas, S., Sun, H., Daum, C., Barry, K., ... & Moliné, M. (2021). Unique genomic traits for cold adaptation in *Naganishia vishniacii*, a polyextremophile yeast isolated from Antarctica. *FEMS Yeast Research*, **21**(1), foaa056.
- Nouhra, E., Urcelay, C., Longo, S., & Tedersoo, L. (2013). Ectomycorrhizal fungal communities associated to *Nothofagus* species in Northern Patagonia. *Mycorrhiza*, **23**(6), 487-496.
- Ochsenreither, K., Glück, C., Stressler, T., Fischer, L., & Sylđatk, C. (2016). Production strategies and applications of microbial single cell oils. *Frontiers in microbiology*, *7*, 1539.
- Oerlemans, J. (2001). *Glaciers and climate change*. CRC Press.
- Oggerin, M., Tornos, F., Rodríguez, N., del Moral, C., Sánchez-Román, M., & Amils, R. (2013). Specific jarosite biomineralization by *Purpureocillium lilacinum*, an acidophilic fungi isolated from río Tinto. *Environmental Microbiology*, **15**(8), 2228–2237. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12094>
- Okalebo, J. R., Gathua, K. W., & Woome, P. L. (2002). *Laboratory methods of soil and plant analysis: a working manual second edition*. Sacred Africa, Nairobi, 21, 25-26.
- Oksanen, J., Blanchet, F. G., Friendly, M., Kindt, R., Legendre, P., McGlinn, D., ... & Wagner, H. (2019). *Vegan: community ecology package (version 2.5-6)*. The Comprehensive R Archive Network.
- Oren, A., & Gunde-Cimerman, N. (2012). Fungal life in the Dead Sea. In *Biology of marine fungi* (pp. 115-132). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Palm, M. E., & Chapela, I. H. (Eds.). (1997). *Mycology in sustainable development: expanding concepts, vanishing borders*. Parkway Publishers, Inc.
- Pan, L. X., Yang, D. F., Shao, L., Li, W., Chen, G. G., & Liang, Z. Q. (2009). Isolation of the oleaginous yeasts from the soil and studies of their lipid-producing capacities. *Food Technology and Biotechnology*, **47**(2), 215-220.
- Papanikolaou, S., & Aggelis, G. (2011a). Lipids of oleaginous yeasts. Part I: Biochemistry of single cell oil production. *European Journal of Lipid Science and Technology*, **113**(8), 1031-1051.
- Papanikolaou, S., & Aggelis, G. (2011b). Lipids of oleaginous yeasts. Part II: Technology and potential applications. *European Journal of Lipid Science and Technology*, **113**(8), 1052–1073. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201100015>
- Park, K. S., Do, H., Lee, J. H., Park, S. I., jung Kim, E., Kim, S. J., ... & Kim, H. J. (2012). Characterization of the ice-binding protein from Arctic yeast *Leucosporidium* sp. AY30. *Cryobiology*, **64**(3), 286-296.
- Park, Y. K., Nicaud, J. M., & Ledesma-Amaro, R. (2018). The engineering potential of *Rhodospiridium toruloides* as a workhorse for biotechnological applications. *Trends in biotechnology*, **36**(3), 304-317.
- Parvizpour, S., Razmara, J., Ramli, A.N.M., Illias, R.M., Shamsir, M.S. (2014). Structural and functional analysis of a novel psychrophilic  $\beta$ -mannanase from *Glaciozyma antarctica* PI12. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, **28**(6), 685–69
- Pauli, H., Gottfried, M., & Grabherr, G. (1996). Effects of climate change on mountain ecosystems--upward shifting of alpine plants. *World resource review*, **8**(3).
- Pennisi, E. (1997). Biotechnology: in industry, extremophiles begin to make their mark. *Science*, *276*, 705-706.
- Perini, L., Gostinčar, C., & Gunde-Cimerman, N. (2019). Fungal and bacterial diversity of Svalbard subglacial ice. *Scientific Reports*, **9**(1), 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-56290-5>
- Peter, H., & Sommaruga, R. (2016). Shifts in diversity and function of lake bacterial communities upon glacier retreat. *ISME Journal*, **10**, 1545– 1554. <https://doi.org/10.1038/ismej.2015.245>

- Petrosino, J. F., Highlander, S., Luna, R. A., Gibbs, R. A., & Versalovic, J. (2009). Metagenomic pyrosequencing and microbial identification. *Clinical Chemistry*, **55**(5), 856–866. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.107565>
- Pfeffer, J., Cazenave, A., & Barnoud, A. (2021). Analysis of the interannual variability in satellite gravity solutions: detection of climate modes in water mass displacements across continents and oceans.
- Pitt, J. I., & Hocking, A. D. (2009). Fungi and food spoilage (Vol. 519, p. 388). New York: Springer.
- Porter, T. M., & Hajibabaei, M. (2020). Putting COI metabarcoding in context: The utility of exact sequence variants (ESVs) in biodiversity analysis. *Frontiers in Ecology and Evolution*, **8**, 248.
- Pontes, A., Ruethi, J., Frey, B., Aires, A., Thomas, A., Overy, D., ... & Sampaio, J. P. (2020). *Cryolevonia* gen. nov. and *Cryolevonia schafbergensis* sp. nov., a cryophilic yeast from ancient permafrost and melted sea ice. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **70**(4), 2334–2338.
- Powell, M. J., & Letcher, P. M. (2014). 6 Chytridiomycota, Monoblepharidomycota, and Neocallimastigomycota. In: McLaughlin, D. J., & Spatafora, J. W. (Eds.). *Systematics and Evolution: Part A (Vol. 7)*. Springer, Berlin, Heidelberg. pp. 141–175.
- Pringle, A., & Taylor, J. W. (2002). The fitness of filamentous fungi. *Trends in microbiology*, **10**(10), 474–481.
- Rabassa, J. O. (2007). El impacto del cambio climático en los glaciares patagónicos y fueguinos.
- Rehkamp, S. (2016). A look at calorie sources in the American diet (No. 1490-2016-128424).
- Raimondi, S., Rossi, M., Leonardi, A., Bianchi, M. M., Rinaldi, T., & Amaretti, A. (2014). Getting lipids from glycerol: new perspectives on biotechnological exploitation of *Candida freyschussii*. *Microbial Cell Factories*, **13**(1), 83.
- Ranga Rao, A., Raghunath Reddy, R. L., Baskaran, V., Sarada, R., & Ravishankar, G. A. (2010). Characterization of microalgal carotenoids by mass spectrometry and their bioavailability and antioxidant properties elucidated in rat model. *Journal of agricultural and food chemistry*, **58**(15), 8553–8559.
- Ranjard, L., Poly, F., Lata, J. C., Mougél, C., Thioulouse, J., & Nazaret, S. (2001). Characterization of bacterial and fungal soil communities by automated ribosomal intergenic spacer analysis fingerprints: biological and methodological variability. *Applied and Environmental Microbiology*, **67**(10), 4479–4487.
- Ren, Z., Martyniuk, N., Oleksy, I. A., Swain, A., & Hotaling, S. (2019). Ecological stoichiometry of the mountain cryosphere. *Frontiers in Ecology and Evolution*, **7**, 360.
- Rice, E. W., Baird, R. B., Eaton, A. D., & Clesceri, L. S. (Eds.). (2012). Standards methods for the examination of water and wastewater. 22th edn. American Public Health Association, American Water Works Association & Water Environment Federation.
- Riesenfeld, C. S., Schloss, P. D., & Handelsman, J. (2004). Metagenomics: genomic analysis of microbial communities. *The Annual Review of Genetics*, **38**, 525–552.
- Rime, T., Hartmann, M., & Frey, B. (2016). Potential sources of microbial colonizers in an initial soil ecosystem after retreat of an alpine glacier. *ISME Journal*, **10**(7), 1625–1641. <https://doi.org/10.1038/ismej.2015.238>
- Roe, G. H., Baker, M. B., & Herla, F. (2017). Centennial glacier retreat as categorical evidence of regional climate change. *Nature Geoscience*, **10**(2), 95–99.
- Rojas-Jimenez, K., Wurzbacher, C., Bourne, E. C., Chiuchiolo, A., Priscu, J. C., & Grossart, H. P. (2017). Early diverging lineages within Cryptomycota and Chytridiomycota dominate the fungal communities in ice-covered lakes of the McMurdo Dry Valleys, Antarctica. *Scientific Reports*, **7**(1), 1–11.

- Rossi, M., Buzzini, P., Cordisco, L., Amaretti, A., Sala, M., Raimondi, S., ... & Matteuzzi, D. (2009). Growth, lipid accumulation, and fatty acid composition in obligate psychrophilic, facultative psychrophilic, and mesophilic yeasts. *FEMS microbiology ecology*, *69*(3), 363-372.
- Rothschild, L. J., & Mancinelli, R. L. (2001). Life in extreme environments. *Nature*, *409*(6823), 1092-1101.
- Ruiz, L., & Trombotto, D. (2012). Mountain permafrost distribution in the Andes of Chubut (Argentina) based on a statistical model. In Hinkel, K. M. (Ed.), *Tenth International Conference on Permafrost*, pp. 365-370.
- Ruiz, L., Berthier, E., Masiokas, M., Pitte, P., & Villalba, R. (2015). First surface velocity maps for glaciers of Monte Tronador, North Patagonian Andes, derived from sequential Pléiades satellite images. *Journal of Glaciology*, *61*(229), 908–922. <https://doi.org/10.3189/2015JoG14J134>
- Ruiz, L., Berthier, E., Viale, M., Pitte, P., & Masiokas, M. H. (2017). Recent geodetic mass balance of Monte Tronador glaciers, northern Patagonian Andes. *Cryosphere*, *11*(1), 619–634. <https://doi.org/10.5194/tc-11-619-2017>
- Russell, N. J. (2008). Membrane components and cold sensing. In: Margesin R. Schinner, F., Marx, J. C., & Gerday, C. (Eds.), *Psychrophiles: from biodiversity to biotechnology*, pp. 177-190.
- Russo, G., Libkind, D., Sampaio, J. P., & Van Broock, M. R. (2008). Yeast diversity in the acidic Rio Agrio–Lake Caviahue volcanic environment (Patagonia, Argentina). *FEMS microbiology ecology*, *65*(3), 415-424.
- Russo, G., Libkind, D., Ulloa, R. J., de García, V., Sampaio, J. P., & van Broock, M. R. (2010). *Cryptococcus agrionensis* sp. nov., a basidiomycetous yeast of the acidic rock drainage ecoclade, isolated from an acidic aquatic environment of volcanic origin. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, *60*(4), 996-1000.
- Sankaran, S., Khanal, S. K., Jasti, N., Jin, B., Pometto III, A. L., & Van Leeuwen, J. H. (2010). Use of filamentous fungi for wastewater treatment and production of high value fungal byproducts: a review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, *40*(5), 400-449.
- Sannino, C., Tasselli, G., Filippucci, S., Turchetti, B., & Buzzini, P. (2017). Yeasts in Nonpolar Cold Habitats. In P. Buzzini, M. A. Lachance, & A. Yurkov (Eds.), *Yeasts in Natural Ecosystems: Diversity* (pp. 367–396). Springer Cham. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-62683-3>
- Santamauro, F., Whiffin, F. M., Scott, R. J., & Chuck, C. J. (2014). Low-cost lipid production by an oleaginous yeast cultured in non-sterile conditions using model waste resources. *Biotechnology for Biofuels*, *7*(1), 34.
- Santiago, I.F.; Rosa, C.A., & Rosa, L.H. (2015). Lichensphere: A protected natural microhabitat of the non-lichenised fungal communities living in extreme environments of Antarctica. *Extremophiles*, *19*, 1087–1097.
- Santiago, I.F.; Rosa, C.A., & Rosa, L.H. (2017). Endophytic symbiont yeasts associated with the Antarctic angiosperms *Deschampsia antarctica* and *Colobanthus quitensis*. *Polar Biology*, *40*, 177–183.
- Schloss, P. D., & Handelsman, J. (2008). A statistical toolbox for metagenomics: assessing functional diversity in microbial communities. *BMC Bioinformatics*, *9*(1), 34.
- Schmidt, P. A., Bálint, M., Greshake, B., Bandow, C., Römbke, J., & Schmitt, I. (2013). Illumina metabarcoding of a soil fungal community. *Soil Biology and Biochemistry*, *65*, 128-132.
- Schmidt, S. K., Vimercati, L., Darcy, J. L., Arán, P., Gendron, E. M. S., Solon, A. J., ... Dorador, C. (2017). A *Naganishia* in high places: functioning populations or dormant cells from the atmosphere? *Mycology*, *8*(3), 153–163. <https://doi.org/10.1080/21501203.2017.1344154>
- Semenova-Nelsen, T. A. (2016). Fungi of the greening Arctic: compositional and functional shifts in response to climatic changes. *Leiden University*.

- Shen, C., Gunina, A., Luo, Y., Wang, J., He, J. Z., Kuzyakov, Y., ... Ge, Y. (2020). Contrasting patterns and drivers of soil bacterial and fungal diversity across a mountain gradient. *Environmental Microbiology*. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15090>
- Siddiqui, K. S., Williams, T. J., Wilkins, D., Yau, S., Allen, M. A., Brown, M. V., ... & Cavicchioli, R. (2013). Psychrophiles. *Annual Review of Earth and Planetary Sciences*, **41**, 87-115.
- Simate, G. S., Cluett, J., Iyuke, S. E., Musapatika, E. T., Ndlovu, S., Walubita, L. F., & Alvarez, A. E. (2011). The treatment of brewery wastewater for reuse: State of the art. *Desalination*, **273**(2-3), 235-247.
- Singh, V., Singh, P., & Haritashya, U. (Eds.). (2011). *Encyclopedia of snow, ice and Glaciers*. Springer Science & Business Media.
- Singh, P., & Singh, S. M. (2012). Characterization of yeast and filamentous fungi isolated from cryoconite holes of Svalbard, Arctic. *Polar Biology*, **35**(4), 575-583.
- Sitepu, I. R., Ignatia, L., Franz, A. K., Wong, D. M., Faulina, S. A., Tsui, M., ... & Boundy-Mills, K. (2012). An improved high-throughput Nile red fluorescence assay for estimating intracellular lipids in a variety of yeast species. *Journal of microbiological methods*, **91**(2), 321-328.
- Sitepu, I. R., Sestric, R., Ignatia, L., Levin, D., German, J. B., Gillies, L. A., ... & Boundy-Mills, K. L. (2013). Manipulation of culture conditions alters lipid content and fatty acid profiles of a wide variety of known and new oleaginous yeast species. *Bioresource Technology*, **144**, 360-369.
- Sitepu, I., Selby, T., Lin, T., Zhu, S., & Boundy-Mills, K. (2014). Carbon source utilization and inhibitor tolerance of 45 oleaginous yeast species. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, **41**(7), 1061-1070.
- Slemmons, C., Johnson, G., & Connell, L. B. (2013). Application of an automated ribosomal intergenic spacer analysis database for identification of cultured Antarctic fungi. *Antarctic Science*, **25**(1), 44.
- Sterflinger, K., Tesei, D., & Zakharova, K. (2012). Fungi in hot and cold deserts with particular reference to microcolonial fungi. *Fungal Ecology*, **5**(4), 453-462.
- Stuefer, M., Rott, H., & Skvarca, P. (2007). Glacier Perito Moreno, Patagonia: climate sensitivities and glacier characteristics preceding the 2003/04 and 2005/06 damming events. *Journal of Glaciology*, **53**(180), 3-16.
- Tanimura, A., Takashima, M., Sugita, T., Endoh, R., Kikukawa, M., Yamaguchi, S., ... & Shima, J. (2014). Selection of oleaginous yeasts with high lipid productivity for practical biodiesel production. *Bioresource technology*, **153**, 230-235.
- Tchakouteu, S. S., Kalantzi, O., Gardeli, C., Koutinas, A. A., Aggelis, G., & Papanikolaou, S. (2015). Lipid production by yeasts growing on biodiesel-derived crude glycerol: strain selection and impact of substrate concentration on the fermentation efficiency. *Journal of applied microbiology*, **118**(4), 911-927.
- Tedersoo, L., Bahram, M., Polme, S., Koljalg, U., Yorou, N. S., Wijesundera, R., Abarenkov, K. et al. (2014). Global diversity and geography of soil fungi. *Science*, **346**(6213), 1256688-1256688. <https://doi.org/10.1126/science.1256688>
- Tedersoo, L., & Nilsson, R. H. (2016). Molecular identification of fungi. *Molecular mycorrhizal symbiosis*, 301-322.
- Tedersoo, L., Bahram, M., Zinger, L., Nilsson, R. H., Kennedy, P. G., Yang, T., ... & Mikryukov, V. (2022). Best practices in metabarcoding of fungi: From experimental design to results. *Molecular ecology*, **31**(10), 2769-2795.

- Tesei, D., Sterflinger, K., & Marzban, G. (2019). Global Proteomics of Extremophilic Fungi: Mission Accomplished?. In: Tiquia-Arashiro, S. M., & Grube, M. (Eds.). *Fungi in extreme environments: ecological role and biotechnological significance*. Springer, Cham. pp. 205-249.
- Thakur, M. S., Prapulla, S. G., & Karanth, N. G. (1989). Estimation of intracellular lipids by the measurement of absorbance of yeast cells stained with Sudan Black B. *Enzyme and Microbial Technology*, **11**(4), 252-254.
- Thomas-Hall, S. R., Turchetti, B., Buzzini, P., Branda, E., Boekhout, T., Theelen, B., & Watson, K. (2010). Cold-adapted yeasts from Antarctica and the Italian Alps-description of three novel species: *Mrakia robertii* sp. nov., *Mrakia blollopis* sp. nov. and *Mrakiella niccombsii* sp. nov. *Extremophiles*, **14**(1), 47-59. <https://doi.org/10.1007/s00792-009-0286-7>
- Tiquia-Arashiro, S. M., & Grube, M. (Eds.). (2019). *Fungi in Extreme Environments: Ecological Role and Biotechnological Significance*. Springer, Cham.
- Treseder, K. K., & Lennon, J. T. (2015). Fungal Traits That Drive Ecosystem Dynamics on Land. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **79**(2), 243-262. <https://doi.org/10.1128/membr.00001-15>
- Tsuji, M., & Kudoh, S. (2020). Soil yeasts in the vicinity of Syowa station, East Antarctica: Their diversity and extracellular enzymes, cold adaptation strategies, and secondary metabolites. *Sustainability* (Switzerland), **12**(11). <https://doi.org/10.3390/su12114518>
- Turchetti, B., Buzzini, P., Goretti, M., Branda, E., Diolaiuti, G., D'Agata, C., ... Vaughan-Martini, A. (2008). Psychrophilic yeasts in glacial environments of Alpine glaciers. *FEMS Microbiology Ecology*, **63**(1), 73-83. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2007.00409.x>
- Turchetti, B., Thomas Hall, S. R., Connell, L. B., Branda, E., Buzzini, P., Theelen, B., ... & Boekhout, T. (2011). Psychrophilic yeasts from Antarctica and European glaciers: description of *Glaciozyma* gen. nov., *Glaciozyma martinii* sp. nov. and *Glaciozyma watsonii* sp. nov. *Extremophiles*, **15**(5), 573-586.
- Turchetti, B., Goretti, M., Buzzini, P., & Margesin, R. (2014). Cold-adapted yeasts in Alpine and Apennine glaciers. In: Buzzini, P., & Margesin, R. (Eds.). *Cold-adapted yeasts*. Springer, Berlin, Heidelberg. pp. 99-122.
- Turk, M., Mejanelle, L., Šentjurc, M., Grimalt, J. O., Gunde-Cimerman, N., & Plemenitaš, A. (2004). Salt-induced changes in lipid composition and membrane fluidity of halophilic yeast-like melanized fungi. *Extremophiles*, **8**(1), 53-61.
- Uetake, J., Kohshima, S., Nakazawa, F., Takeuchi, N., Fujita, K., Miyake, T., Nakawo, M. (2011). Evidence for propagation of cold-adapted yeast in an ice core from a Siberian Altai glacier. *Journal of Geophysical Research: Biogeosciences*, **116**(1), 1-8. <https://doi.org/10.1029/2010JG001337>
- Ugalde, J. A., Gallardo, M. J., Belmar, C., Muñoz, P., Ruiz-Tagle, N., Ferrada-Fuentes, S., ... & Gallardo, V. A. (2013). Microbial life in a fjord: metagenomic analysis of a microbial mat in Chilean Patagonia. *PLoS one*, **8**(8), e71952.
- Undabarrena, A., Beltrametti, F., Claverías, F. P., González, M., Moore, E. R., Seeger, M., & Cámara, B. (2016). Exploring the diversity and antimicrobial potential of marine actinobacteria from the comau fjord in Northern Patagonia, Chile. *Frontiers in Microbiology*, **7**, 1135.
- Ustinova, I., Krienitz, L., & Huss, V. A. R. (2000). *Hyaloraphidium curvatum* is not a Green Alga, but a Lower Fungus; *Amoebidium parasiticum* is not a Fungus, but a Member of the DRIPs. *Protist*, **151**(10), 253-262.
- Vaz, A. B. M. M., Rosa, L. H., Vieira, M. L. A. A., de Garcia, V., Brandão, L. R., Teixeira, L. C. R. S. R. S., ... Rosa, C. A. (2011). The diversity, extracellular enzymatic activities and photoprotective compounds of yeasts

- isolated in Antarctica. *Brazilian Journal of Microbiology*, **42**(3), 937–947. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822011000300012>
- Velázquez, M. S., Stürmer, S. L., Bruzone, C., Fontenla, S., Barrera, M., & Cabello, M. (2016). Occurrence of arbuscular mycorrhizal fungi in high altitude sites of the Patagonian Altoandina Region in Nahuel Huapi National Park (Argentina). *Acta Botanica Brasilica*, **30**(4), 521–531. <https://doi.org/10.1590/0102-33062016abb0223>
- Villarosa, G., Outes, V., Masiokas, M., Villalba, R., & Rivas, S. (2008). El Monte Tronador: Historias de hielo y fuego. En Rastelli D. (Ed.), Sitios de Interés Geológico de la República Argentina. *SEGEMAR* (Servicio de Geología y Minería de la República Argentina), pp. 627–641.
- Villarreal, P., Carrasco, M., Barahona, S., Alcaíno, J., Cifuentes, V., & Baeza, M. (2018). Antarctic yeasts: analysis of their freeze-thaw tolerance and production of antifreeze proteins, fatty acids and ergosterol. *BMC microbiology*, **18**(1), 1–10.
- Viñarta, Silvana C., Angelicola, M. V., Barros, J. M., Fernández, P. M., Mac Cormak, W., Aybar, M. J., & de Figueroa, L. I. C. (2016). Oleaginous yeasts from Antarctica: Screening and preliminary approach on lipid accumulation. *Journal of Basic Microbiology*, **56**(12), 1360–1368. <https://doi.org/10.1002/jobm.201600099>
- Viñarta, Silvana Carolina, Angelicola, M. V., Van Nieuwenhove, C., Aybar, M. J., & de Figueroa, L. I. C. (2020). Fatty acids profiles and estimation of the biodiesel quality parameters from *Rhodotorula* spp. from Antarctica. *Biotechnology Letters*, **42**(5), 757–772. <https://doi.org/10.1007/s10529-020-02796-2>
- Vishniac HS. (1985). *Cryptococcus friedmannii*, a new species of yeast from the Antarctic. *Mycologia*, **77**, 149–153.
- Vishnivetskaya, T., Kathariou, S., McGrath, J., Gilichinsky, D., Tiedje, J. M. (2000) Low-temperature recovery strategies for the isolation of bacteria from ancient permafrost sediments. *Extremophiles*, **4**, 165–173
- Vyas, S., & Chhabra, M. (2017). Isolation, identification and characterization of *Cystobasidium* oligophagum JRC1: a cellulase and lipase producing oleaginous yeast. *Bioresource technology*, **223**, 250–258.
- Wainwright, M. (1990). *Miracle cure: The story of penicillin and the golden age of antibiotics*. Blackwell.
- Wang, B., & Qiu, Y. L. (2006). Phylogenetic distribution and evolution of mycorrhizas in land plants. *Mycorrhiza*, **16**(5), 299–363.
- Wang, Q. M., Begerow, D., Groenewald, M., Liu, X. Z., Theelen, B., Bai, F. Y., & Boekhout, T. (2015). Multigene phylogeny and taxonomic revision of yeasts and related fungi in the Ustilaginomycotina. *Studies in Mycology*, **81**, 55–83. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2015.10.004>
- Worni, R., Huggel, C., Clague, J. J., Schaub, Y., & Stoffel, M. (2014). Coupling glacial lake impact, dam breach, and flood processes: A modeling perspective. *Geomorphology*, **224**(November), 161–176. <https://doi.org/10.1016/j.geomorph.2014.06.031>
- Worni, R., Stoffel, M., Huggel, C., Volz, C., Casteller, A., & Luckman, B. (2012). Analysis and dynamic modeling of a moraine failure and glacier lake outburst flood at Ventisquero Negro, Patagonian Andes (Argentina). *Journal of Hydrology*, 444–445, 134–145. <https://doi.org/10.1016/j.jhydrol.2012.04.013>
- Wynn, J. P., & Ratledge, C. (2005). Oils from microorganisms. *Bailey's industrial oil and fat products*.
- Xue, F., Gao, B., Zhu, Y., Zhang, X., Feng, W., & Tan, T. (2010). Pilot-scale production of microbial lipid using starch wastewater as raw material. *Bioresource technology*, **101**(15), 6092–6095.

- Xue, Z., Kable, M. E., & Marco, M. L. (2018). Impact of DNA Sequencing and Analysis Methods on 16S rRNA Gene Bacterial Community Analysis of Dairy Products. *MSphere*, **3**(5), 1–14. <https://doi.org/10.1128/msphere.00410-18>
- Ykema, A., Verbree, E. C., Kater, M. M., & Smit, H. (1988). Optimization of lipid production in the oleaginous yeast *Apiotrichum curvatum* in wheypermeate. *Applied microbiology and biotechnology*, **29**(2), 211-218.
- Yurkov, A. M., & Pozo, M. (2017). Yeast Community Composition and Structure. In P. Buzzini, M. A. Lachance, & A. Yurkov (Eds.), *Yeasts in Natural Ecosystems: Ecology* . pp. 74–100. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-61575-2>
- Yurkov, A. M. (2018). Yeasts of the soil – obscure but precious. *Yeast*, **35**(5), 369–378. <https://doi.org/10.1002/yea.3310>
- Zajc, J., Zalar, P., & Gunde-Cimerman, N. (2017). Yeasts in Hypersaline Habitats. In P. Buzzini, M. A. Lachance, & A. Yurkov (Eds.), *Yeasts in Natural Ecosystems: Diversity*. Springer Cham. pp. 293–329. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-62683-3>
- Zalar, P., Gostinčar, C., De Hoog, G. S., Uršič, V., Sudhadham, M., & Gunde-Cimerman, N. (2008). Redefinition of *Aureobasidium pullulans* and its varieties. *Studies in mycology*, **61**(1), 21-38.
- Zalazar, L., Ferri, L., Castro, M., Gargantini, H., Gimenez, M., Pitte, P., ... & Villalba, R. (2020). Spatial distribution and characteristics of Andean ice masses in Argentina: results from the first National Glacier Inventory. *Journal of Glaciology*, **66**(260), 938-949.
- Zawierucha, K., Kolicka, M., Takeuchi, N., & Kaczmarek, Ł. (2015). What animals can live in cryoconite holes? A faunal review. *Journal of Zoology*, **295**(3), 159-169.
- Zemp, M., Gärtner-Roer, I., Nussbaumer, S. U., Hüsler, F., Machguth, H., Mölg, N., ... & Hoelzle, M. (2015). Global glacier change bulletin no. 1 (2012–2013). *Global Glacier Change Bulletin*, 1.
- Zeng, J., Zheng, Y., Yu, X., Yu, L., Gao, D., & Chen, S. (2013). Lignocellulosic biomass as a carbohydrate source for lipid production by *Mortierella isabellina*. *Bioresource technology*, **128**, 385-391.
- Zhang, Y., & Xu, J. (2018). Molecular Mechanisms of Fungal Adaptive Evolution. In P. H. Rampelotto (Ed.), *Molecular Mechanisms of Microbial Evolution*. Springer. pp. 409–435. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-69078-0\\_15](https://doi.org/10.1007/978-3-319-69078-0_15)

## **ANEXOS**

**ANEXO 1**

## TABLAS Y MATERIAL SUPLEMENTARIO

**Tabla suplementaria 2.1: Recuento de levaduras totales, en dos medios de cultivo diferentes, de muestras de suelo asociados a dos glaciares patagónicos de montaña y un río de deshielo**

UFC.g<sup>-1</sup>, Unidades formadoras de colonias por gramo, recuentos obtenidos a 4°C luego de 30 días de incubación. Media: valor medio del recuento de 5 submuestras. CO: Castaño Overa, RCO: Río Castaño Overa, S: Suelo. Las letras minúsculas marcan diferencias significativas p>0,05

| Sustrato | Muestra | MYP10% (UFC g <sup>-1</sup> ) | YPD (UFC g <sup>-1</sup> ) |
|----------|---------|-------------------------------|----------------------------|
| Suelo    | COS1    | 150 ± 107,8                   | 83,3 ± 23,6                |
|          | COS2    | 77,8 ± 47,1                   | 44,4 ± 19,2                |
|          | COS3    | 200 ± 106,6                   | 100 ± 62,4                 |
|          | COS4    | 100 ± 47,1                    | 116,6 ± 88,2               |
|          | COS5    | 240 ± 123,3                   | 100 ± 66,7                 |
|          | COS6    | 176,6 ± 92,5                  | 133,3 ± 62,4               |
|          | RCOS1   | 193,3 ± 109,9                 | 166,6 ± 66,7               |
|          | RCOS2   | 150 ± 57,7                    | 100 ± 33,3                 |
|          | RCOS3   | 133,3 ± 105,5                 | 140 ± 27,9                 |
|          | RCOS4   | 733,3 ± 248,0                 | 558,3 ± 140,8              |
|          | RCOS5   | 1053,3 ± 291,2 <sup>a</sup>   | 486,6 ± 171,4              |
|          | RCOS6   | 466,6 ± 254,9                 | 306,6 ± 153,9              |

**Tabla suplementaria 2.2 Recuento de levaduras totales, en dos medios de cultivo diferentes, de muestras de hielo de dos glaciares patagónicos de montaña y un río de deshielo**

UFC.L<sup>-1</sup>, Unidades formadoras de colonias por litro, recuentos obtenidos a 4 °C luego de 30 días de incubación. Media: valor medio del recuento de 3 muestras; SD: desviación estándar. CO: Castaño Overa, VN: Ventisquero Negro, RCO: Río Castaño Overa, N: Nieve, H: Hielo, A: Agua.

| Sustrato | Muestra | MYP10% (UFC L <sup>-1</sup> ) | YPD (UFC L <sup>-1</sup> ) |
|----------|---------|-------------------------------|----------------------------|
| Nieve    | CON1    | 2967,5 ± 1099                 | 2372,5 ± 778,49            |
|          | CON2    | 873,3 ± 325                   | 1313,3 ± 284,9             |
|          | CON3    | 1942,2 ± 459,2                | 1395,5 ± 693               |
|          | CON4    | 3116,3 ± 1165,6               | 2122,2 ± 570,8             |
| Hielo    | COH1    | 3392,5 ± 1899,7               | 856 ± 629,3                |
|          | COH2    | 1693,3 ± 597,1                | 3066,6 ± 1090,1            |
|          | COH3    | 508,8 ± 294,5                 | 355,5 ± 119                |
| Hielo    | VNH1    | 586,6 ± 120,6                 | 1280 ± 405,9               |
|          | VNH2    | 766,6 ± 152,7                 | 380 ± 225,3                |
|          | VNH3    | 240 ± 20                      | 120 ± 40                   |
|          | VNH4    | 1253,3 ± 150,1                | 1166,6 ± 230,9             |
|          | VNH5    | 226,6 ± 23,1                  | 593,3 ± 115,5              |
|          | VNH6    | 1033,3 ± 230,9                | 873,3 ± 357,9              |
| Agua     | VNA1    | 1144,4 ± 392,8                | 1024,4 ± 521,8             |
|          | VNA2    | 496,6 ± 200,9                 | 195,5 ± 201,4              |
|          | VNA3    | 1290 ± 662,8                  | 1462,2 ± 139,7             |
|          | RCOA1   | 4342,8 ± 2772,5               | 3597,5 ± 2537,6            |
|          | RCOA2   | 3450 ± 1342,7                 | 3222,5 ± 1497,1            |
|          | RCOA3   | 1086,6 ± 918,2                | 1211,1 ± 1073,8            |

Tabla suplementaria 2.3: Listado de aislamientos identificados molecularmente

| Código    | Especie                             | Sustrato | Sitio |
|-----------|-------------------------------------|----------|-------|
| G4A5.15   | <i>Aureobasidium pullulans</i>      | Nieve    | CO    |
| G4A5.16   | <i>Aureobasidium pullulans</i>      | Nieve    | CO    |
| VNH6.10   | <i>Aureobasidium pullulans</i>      | Hielo    | VN    |
| G4A2.18A  | <i>Aureobasidium pullulans</i>      | Nieve    | CO    |
| G4A2.20   | <i>Aureobasidium pullulans</i>      | Agua     | RCO   |
| A3-2.4    | <i>Candida sake</i>                 | Suelo    | CO    |
| G2A2.11   | <i>Cladosporium welwitschiicola</i> | Nieve    | CO    |
| G3A2.11   | <i>Coniochaeta polymorpha</i>       | Nieve    | CO    |
| G4A2.13   | <i>Curvibasidium rogersii</i>       | Nieve    | CO    |
| CRUB2120  | <i>Cystobasidium laryngis</i>       | Nieve    | CO    |
| G2B2.7C   | <i>Cystobasidium laryngis</i>       | Agua     | RCO   |
| G2B2.7B   | <i>Cystobasidium</i> sp.            | Hielo    | CO    |
| G2B2.11   | <i>Dioszegia patagonica</i>         | Hielo    | CO    |
| CRUB2122  | <i>Dioszegia patagonica</i>         | Nieve    | CO    |
| A6-4.1    | <i>Dioszegia statzelliae</i>        | Suelo    | CO    |
| VNH5.8    | <i>Filobasidium magnum</i>          | Hielo    | VN    |
| VNH1.11   | <i>Filobasidium magnum</i>          | Hielo    | VN    |
| G2A1.1    | <i>Filobasidium stepposum</i>       | Nieve    | CO    |
| G2A2.2    | <i>Fonsecazyma tronadorensis</i>    | Nieve    | CO    |
| G2A2.6    | <i>Fonsecazyma tronadorensis</i>    | Nieve    | CO    |
| G4A2.8    | <i>Goffeauzyma gastrica</i>         | Nieve    | CO    |
| CRUB2133  | <i>Goffeauzyma gastrica</i>         | Agua     | RCO   |
| CRUB2125  | <i>Goffeauzyma gastrica</i>         | Agua     | RCO   |
| CRUB2126  | <i>Goffeauzyma gilvescens</i>       | Suelo    | CO    |
| CRUB21460 | <i>Goffeauzyma gilvescens</i>       | Hielo    | CO    |
| CRUB21462 | <i>Goffeauzyma gilvescens</i>       | Hielo    | CO    |
| CRUB2143  | <i>Goffeauzyma gilvescens</i>       | Hielo    | CO    |
| CCRUB2144 | <i>Goffeauzyma gilvescens</i>       | Agua     | RCO   |
| VNH6.18   | <i>Holtermanniella wattica</i>      | Hielo    | VN    |
| CRUB2130  | <i>Holtermanniella wattica</i>      | Suelo    | VN    |
| C3-2.06   | <i>Holtermanniella festucosa</i>    | Suelo    | RCO   |
| C4-5.01   | <i>Holtermanniella takashimae</i>   | Suelo    | RCO   |
| CRUB2129  | <i>Holtermanniella takashimae</i>   | Suelo    | RCO   |
| CRUB2132  | <i>Hormonema</i> sp.                | Suelo    | RCO   |
| RCO1.4B   | <i>Itersonilia pannonica</i>        | Agua     | RCO   |
| G4A1.13   | <i>Kabatiella bupleuri</i>          | Nieve    | CO    |
| C5-1.10   | <i>Leotiomycetes</i> sp.            | Suelo    | RCO   |
| CRUB2121  | <i>Microbotryomycetes</i> sp.       | Suelo    | CO    |
| CRUB2134  | <i>Mrakia frigida</i>               | Nieve    | CO    |
| G1A3.5    | <i>Mrakia gelida</i>                | Nieve    | CO    |
| G1A1.8    | <i>Mrakia hoshinonis</i>            | Nieve    | CO    |

|           |                                   |       |     |
|-----------|-----------------------------------|-------|-----|
| CRUB2135  | <i>Mrakia hoshinonis</i>          | Nieve | CO  |
| G2B1.8    | <i>Naganishia adeliensis</i>      | Hielo | CO  |
| CRUB2136  | <i>Naganishia adeliensis</i>      | Suelo | VN  |
| CRUB2138  | <i>Naganishia adeliensis</i>      | Suelo | VN  |
| VNH4.5    | <i>Naganishia adeliensis</i>      | Hielo | VN  |
| G4A3.14   | <i>Naganishia albida</i>          | Nieve | CO  |
| CG4A5.14  | <i>Naganishia albida</i>          | Agua  | RCO |
| G2B2.11B  | <i>Naganishia albidosimilis</i>   | Hielo | CO  |
| A5-2.2    | <i>Naganishia antarctica</i>      | Suelo | CO  |
| CRUB2140  | <i>Naganishia antarctica</i>      | Suelo | CO  |
| CRUB2142  | <i>Naganishia diffluens</i>       | Suelo | RCO |
| CRUB2141  | <i>Naganishia diffluens</i>       | Suelo | RCO |
| G3B1.3    | <i>Naganishia friedmannii</i>     | Hielo | CO  |
| CRUB2146  | <i>Naganishia friedmannii</i>     | Hielo | CO  |
| G3B1.9    | <i>Naganishia friedmannii</i>     | Hielo | CO  |
| CRUB2145  | <i>Naganishia liquefaciens</i>    | Hielo | CO  |
| CG4A4.1   | <i>Naganishia liquefaciens</i>    | Agua  | RCO |
| CRUB2149A | <i>Rhodotorula mucilaginosa</i>   | Nieve | CO  |
| CRUB2149B | <i>Rhodotorula mucilaginosa</i>   | Nieve | CO  |
| G4A2.3    | <i>Rhodotorula mucilaginosa</i>   | Nieve | CO  |
| G4A2.24b  | <i>Rhodotorula mucilaginosa</i>   | Nieve | CO  |
| CRUB2147  | <i>Rhodotorula mucilaginosa</i>   | Hielo | CO  |
| VNS1W3.4  | <i>Rhodotorula mucilaginosa</i>   | Agua  | VN  |
| VNS1W3.6  | <i>Rhodotorula mucilaginosa</i>   | Agua  | VN  |
| VNH6.2    | <i>Rhodotorula mucilaginosa</i>   | Hielo | VN  |
| CG2A2.7B  | <i>Rhodotorula mucilaginosa</i>   | Agua  | RCO |
| G2B2.27A  | <i>Saccharomyces eubayanus</i>    | Hielo | CO  |
| CRUB2151  | <i>Saccharomyces eubayanus</i>    | Suelo | RCO |
| CRUB2152  | <i>Saccharomyces eubayanus</i>    | Suelo | RCO |
| CS1B4.30  | <i>Saccharomyces eubayanus</i>    | Agua  | RCO |
| A5-4.5    | <i>Solicoccozyma aeria</i>        | Suelo | CO  |
| A5-4.7    | <i>Solicoccozyma aeria</i>        | Suelo | CO  |
| CRUB2153  | <i>Solicoccozyma aeria</i>        | Suelo | CO  |
| CRUB2154  | <i>Solicoccozyma gelidoterrea</i> | Suelo | CO  |
| CRUB2155  | <i>Solicoccozyma</i> sp. I        | Nieve | CO  |
| A1-1.1    | <i>Solicoccozyma terricola</i>    | Suelo | CO  |
| A3-2.3    | <i>Solicoccozyma terricola</i>    | Suelo | CO  |
| A5-4.8    | <i>Solicoccozyma terricola</i>    | Suelo | CO  |
| G1A1.4    | <i>Sporobolomyces ruberrimus</i>  | Nieve | CO  |
| CRUB2156  | <i>Tausonia pullulans</i>         | Nieve | CO  |
| CRUB2157  | <i>Udeniomyces kanasensis</i>     | Hielo | CO  |
| VNS1W3.12 | <i>Udeniomyces kanasensis</i>     | Agua  | VN  |
| VN4.6     | <i>Vanrija albida</i>             | Agua  | VN  |
| CRUB2158  | <i>Vanrija albida</i>             | Suelo | VN  |

|          |                                      |       |     |
|----------|--------------------------------------|-------|-----|
| VN4.2    | <i>Vanrija albida</i>                | Agua  | VN  |
| VN6.2    | <i>Vanrija albida</i>                | Agua  | VN  |
| CRUB2161 | <i>Vanrija albida</i>                | Agua  | VN  |
| VN6.7    | <i>Vanrija albida</i>                | Agua  | VN  |
| VN4.4    | <i>Vanrija albida</i>                | Agua  | VN  |
| VN6.5    | <i>Vanrija albida</i>                | Agua  | VN  |
| VNH6.13  | <i>Vanrija albida</i>                | Hielo | VN  |
| VN4.3    | <i>Vanrija albida</i>                | Agua  | VN  |
| VN6.10   | <i>Vanrija albida</i>                | Agua  | VN  |
| RCO3.1   | <i>Vanrija albida</i>                | Agua  | RCO |
| G4A1.1   | <i>Vishniacozyma tephrensis</i>      | Nieve | CO  |
| CRUB2165 | <i>Vishniacozyma victoriae</i>       | Nieve | CO  |
| G4A5.3   | <i>Vishniacozyma victoriae</i>       | Nieve | CO  |
| G2A2.3   | <i>Vishniacozyma victoriae</i>       | Nieve | CO  |
| G4A1.10B | <i>Vishniacozyma victoriae</i>       | Agua  | RCO |
| CRUB2170 | <i>Wickerhamomyces anomalus</i>      | Suelo | CO  |
| CRUB2167 | <i>Wickerhamomyces anomalus</i>      | Suelo | RCO |
| CRUB2171 | <i>Wickerhamomyces anomalus</i>      | Suelo | RCO |
| C4-2.15  | <i>Wickerhamomyces anomalus</i>      | Suelo | RCO |
| CRUB2168 | <i>Wickerhamomyces anomalus</i>      | Suelo | RCO |
| CRUB2172 | <i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i> | Suelo | VN  |

Tabla suplementaria 4.1: Temperatura de los diferentes sustratos muestreados

| Sustrato | Muestra | Temperatura (C°) | SD       |
|----------|---------|------------------|----------|
| Suelo    | RCOS1   | 0                | 0        |
|          | RCOS2   | 0                | 0        |
|          | RCOS3   | 0                | 0        |
|          | RCOS4   | 2.38             | 1.194571 |
|          | RCOS5   | 2.86             | 0.089443 |
|          | RCOS6   | 5.54             | 2.030517 |
|          | VNS1    | 21.34            | 1.624192 |
|          | VNS2    | 18.4             | 1.665833 |
|          | VNS3    | 20.48            | 4.376871 |
|          | VNS4    | 18.06            | 1.427585 |
|          | VNS5    | 14.94            | 1.089954 |
|          | VNS6    | 15.72            | 1.518881 |
| Hielo    | VN.H1   | 9.4              | -        |
|          | VN.H2   | 9.4              | -        |
|          | VN.H3   | 8.3              | -        |
|          | VN.H4   | 8.3              | -        |
|          | VN.H5   | 5.6              | -        |
|          | VN.H6   | 6.3              | -        |
| Agua     | RCOA1   | 1.6              | -        |
|          | RCOA2   | 3.7              | -        |
|          | RCOA3   | 3.8              | -        |
|          | VNA1    | 6.4              | -        |
|          | VNA2    | 9.4              | -        |
|          | VNA3    | 8.3              | -        |

**Tabla suplementaria 4.2: Especies representativas de cada gremio con mayor abundancia de secuencias en el análisis metagenómico para los diferentes sitios de muestreo**

|                   | Glaciar Castaño Overa          |                                 | Río Castaño Overa        |                                | Glaciar Ventisquero Negro              |  |                                   |
|-------------------|--------------------------------|---------------------------------|--------------------------|--------------------------------|--|--|-----------------------------------|
|                   | Suelo                          | Hielo y nieve                   | Suelo                    | Agua                           | Suelo                                  | Hielo                                  | Agua                              |
| <b>Patógenos</b>  | <i>Cordyceps bassiana</i>      | <i>Kriegeria eriophori</i>      | <i>Trucatella</i> sp.    | <i>Neonectria</i> sp.          | <i>Cutaneotrichosporon moniliforme</i> | <i>Cutaneotrichosporon moniliforme</i> | <i>Exhophiala xenobiotica</i>     |
| <b>Saprobios</b>  | <i>Claussenomyces</i> sp.      | <i>Leucosporidium fragarium</i> | <i>Tetracladium</i> sp.  | <i>Phenolipharia glacialis</i> | <i>Gyoerffyella</i> sp.                | <i>Naganishia friedmannii</i>          | <i>Leucosporidium intermedium</i> |
| <b>Simbiontes</b> | <i>Phialocephala helvetica</i> | <i>Sphaerulina polyspora</i>    | <i>Cadophora melinii</i> | <i>Cadophora melinii</i>       | <i>Cadophora</i> sp.                   | <i>Cadophora</i> sp.                   | <i>Cadophora melinii</i>          |
| <b>Variables</b>  | <i>Powellomyces</i> sp.        | <i>Phialophora</i> sp.          | <i>Venturia</i> sp.      | <i>Mollisia</i> sp.            | <i>Alternaria alternata</i>            | <i>Rhodotorula mucilaginosa</i>        | <i>Cladosporium</i> sp.           |

*Análisis del efluente cervecero*

Los resultados de los análisis de los efluentes cerveceros de la concentración de los diferentes azúcares, DQO, C soluble, N total y P total, contenidos en el efluente utilizado para los cultivos se resumen en la tabla suplementaria 5.1.

**Tabla suplementaria 5.1: Concentración de diferentes nutrientes de los mostos utilizados como medio de cultivo**

| <b>Contenido analizado</b>            | <b>Mosto 1</b> | <b>Mosto 2</b> |
|---------------------------------------|----------------|----------------|
| <b>Maltotriosa (% m/v)</b>            | 0,63           | 0,69           |
| <b>Maltosa (% m/v)</b>                | 1,81           | 2,21           |
| <b>Glucosa (% m/v)</b>                | 0,49           | 0,44           |
| <b>DQO (mg O<sub>2</sub>/L)</b>       | 55190          | 57780          |
| <b>Carbono soluble (mg C/L)</b>       | 22075          | 23110          |
| <b>Nitrógeno de Kjeldahl (mg N/L)</b> | 442            | 444            |
| <b>P total (mg P/L)</b>               | 139            | 139            |

**Tabla suplementaria 5.2: Perfil de temperatura de crecimiento de diferentes aislamientos de levaduras del Monte Tronador**

| Especie                          | Código   | Temperatura |      |      |      |      |      |
|----------------------------------|----------|-------------|------|------|------|------|------|
|                                  |          | 5°C         | 10°C | 15°C | 20°C | 25°C | 30°C |
| <i>Fonsecazyma tronadorensis</i> | G2A2.6   | 0           | 1    | 1    | 1    | 0,5  | 0    |
| <i>Mrakia hoshinonnis</i>        | CRUB2135 | 1           | 1    | 0    | 0    | 0    | 0    |
| <i>Vishniacozyma victoriae</i>   | G3A2.10  | 1           | 1    | 1    | 1    | 1    | 0    |
| <i>Solicoccozyma sp.</i>         | G2B2.7A  | 0           | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    |
| <i>Kabatiella bupleuri</i>       | G4A1.6A  | 0           | 0,75 | 1    | 1    | 1    | 1    |
| <i>Vishniacozyma victoriae</i>   | G4A4.1   | 0,5         | 1    | 1    | 1    | 1    | 0,5  |
| <i>Naganishia friedmannii</i>    | G4A5.2   | 0,5         | 0,5  | 1    | 1    | 1    | 1    |
| <i>Saccharomyces eubayanus</i>   | CRUB2152 | 0           | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    |
| <i>Solicoccozyma aerea</i>       | CRUB2153 | 0,25        | 1    | 1    | 1    | 0,75 | 0,25 |
| <i>Naganishia antarctica</i>     | A5-2.2   | 1           | 1    | 0,25 | 0    | 0    | 0    |
| <i>Naganishia antarctica</i>     | CRUB2140 | 1           | 1    | 0,5  | 0    | 0    | 0    |

**Tabla suplementaria 5.3: Productividad (YL/S) y rendimiento (%YI/X) en la acumulación de lípidos en las levaduras del ensayo selectivo**

| Especie                        | Código   | %YI/X | YI/S |
|--------------------------------|----------|-------|------|
| <i>Vishniacozyma victoriae</i> | CRUB2165 | 25,34 | 0,19 |
| <i>Tausonia pullulans</i>      | CRUB2156 | 26,36 | 0,19 |
| <i>Solicoccozyma sp.</i>       | CRUB2155 | 16,51 | 0,17 |
| <i>Solicoccozyma aerea</i>     | CRUB2153 | 59,31 | 0,44 |
| <i>Holtermanniella wattica</i> | CRUB2131 | 45,65 | 0,35 |
| <i>Vanrija albida</i>          | CRUB2161 | 32,85 | 0,18 |
| <i>Holtermanniella wattica</i> | CRUB2130 | 44,18 | 0,37 |

**Tabla suplementaria 5.4: Proporción relativas de los ácidos grasos analizados para los 7 aislamientos seleccionados en el ensayo selectivo**

| Especie                  | Código       | C14:0                                   | C15:0                                   | C15:1      | Nonanedi<br>oic acid                                 | C16:0   | C16:<br>:1 | C17:0   | C16:2   | C17:<br>0  | C17:<br>1  |
|--------------------------|--------------|---|---|------------|--|---|------------|---|---|------------|------------|
| <i>H. wattica</i>        | CRUB21<br>31 | 0,188                                   | 0,000                                   | 0,000      | 0,000  | 22,200  | 0,184      | 0,000   | 0,000   | 0,331      | 0,228      |
| <i>H. wattica</i>        | CRUB21<br>30 | 0,211                                   | 0,000                                   | 0,000      | 0,000  | 21,551  | 0,067      | 0,000   | 0,000   | 0,314      | 0,177      |
| <i>Solicoccozyma sp.</i> | CRUB21<br>55 | 0,245                                   | 0,033                                   | 0,000      | 0,068  | 24,720  | 2,480      | 0,032   | 0,050   | 0,220      | 0,554      |
| <i>S. aeria</i>          | CRUB21<br>53 | 0,120                                   | 0,085                                   | 0,000      | 0,351  | 23,796  | 0,777      | 0,124   | 0,000   | 0,443      | 0,000      |
| <i>Vi. victoriae</i>     | CRUB21<br>65 | 0,567                                   | 0,204                                   | 0,048      | 0,182  | 19,984  | 1,240      | 0,079   | 0,000   | 0,281      | 0,237      |
| <i>V. albida</i>         | CRUB21<br>61 | 0,239                                   | 0,027                                   | 0,000      | 0,000  | 21,551  | 0,152      | 0,000   | 0,000   | 0,202      | 0,151      |
| <i>T. pullulans</i>      | CRUB21<br>56 | 0,174                                   | 0,257                                   | 0,038      | 0,000  | 17,050  | 0,197      | 0,000   | 0,000   | 0,207      | 0,352      |
| Especie                  | Código       | Heptadec<br>anoic<br>acid, 9-<br>methyl | iC18:0                                  | C18:0      | C18:1<br>oleico, 9<br>octadecen<br>oico              | C18:1<br>vacceni<br>co, 11<br>octadec<br>enoico | C18:2      | C19:0   | C19:1   | GC18<br>:3 | AC18:<br>3 |
| <i>H. wattica</i>        | CRUB21<br>31 | 0,027                                   | 0,040                                   | 4,205      | 40,833   | 0,091   | 25,759     | 0,059   | 0,045   | 0,013      | 0,401      |
| <i>H. wattica</i>        | CRUB21<br>30 | 0,016                                   | 0,028                                   | 4,118      | 40,258   | 0,238   | 24,068     | 0,063   | 0,037   | 0,000      | 0,368      |
| <i>Solicoccozyma sp.</i> | CRUB21<br>55 | 0,000                                   | 0,000                                   | 3,753      | 47,631   | 0,081   | 13,393     | 0,000   | 0,000   | 0,000      | 0,144      |
| <i>S. aeria</i>          | CRUB21<br>53 | 0,000                                   | 0,000                                   | 9,161      | 43,802   | 0,000   | 18,364     | 0,000   | 0,000   | 0,000      | 1,321      |
| <i>Vi. victoriae</i>     | CRUB21<br>65 | 0,000                                   | 0,035                                   | 9,471      | 39,176   | 0,430   | 20,865     | 0,043   | 0,000   | 0,000      | 2,656      |
| <i>V. albida</i>         | CRUB21<br>61 | 0,000                                   | 0,000                                   | 10,22<br>0 | 33,841   | 0,018   | 22,551     | 0,024   | 0,022   | 0,065      | 3,298      |
| <i>T. pullulans</i>      | CRUB21<br>56 | 0,025                                   | 0,020                                   | 3,928      | 44,305   | 0,000   | 27,100     | 0,032   | 0,000   | 0,000      | 1,038      |
| Especie                  | Código       | C20:0                                   | Hexadeca<br>noic acid,<br>2-<br>hydroxy | C20:1      | Octadeca<br>noic acid,<br>9,10,12-<br>trimethox<br>y | C22:0   | C23:0      | 9-<br>Octade<br>cenoic<br>acid,<br>12-<br>hydrox<br>y | Octad<br>ecano<br>ic<br>acid,<br>9,10-<br>dihyd<br>roxy | C24:0      | C26:0      |
| <i>H. wattica</i>        | CRUB21<br>31 | 1,446                                   | 0,033                                   | 0,029      | 0,073  | 0,790   | 0,000      | 0,000   | 1,350   | 1,348      | 0,326      |
| <i>H. wattica</i>        | CRUB21<br>30 | 1,392                                   | 0,000                                   | 0,079      | 0,064  | 0,717   | 0,021      | 0,073   | 4,983   | 0,896      | 0,261      |
| <i>Solicoccozyma sp.</i> | CRUB21<br>55 | 0,564                                   | 0,000                                   | 0,179      | 0,000  | 0,250   | 0,012      | 0,000   | 4,341   | 0,648      | 0,601      |
| <i>S. aeria</i>          | CRUB21<br>53 | 0,503                                   | 0,000                                   | 0,000      | 0,000  | 0,215   | 0,000      | 0,000   | 0,939   | 0,000      | 0,000      |
| <i>Vi. victoriae</i>     | CRUB21<br>65 | 0,462                                   | 0,098                                   | 0,198      | 0,131  | 0,217   | 0,103      | 0,000   | 2,439   | 0,517      | 0,337      |
| <i>V. albida</i>         | CRUB21<br>61 | 0,806                                   | 0,032                                   | 0,116      | 0,117  | 0,743   | 0,130      | 0,000   | 4,503   | 0,827      | 0,365      |
| <i>T. pullulans</i>      | CRUB21<br>56 | 0,133                                   | 0,300                                   | 0,231      | 0,231  | 0,111   | 0,000      | 0,000   | 2,698   | 0,985      | 0,588      |

**ANEXO II****SOLUCIONES Y REACTIVOS**

Tampón Tris Acetato (TAE) 1X

Tris.acetato.....40 mM

EDTA.....2 mM

pH.....8,5

GMY (g L<sup>-1</sup>)

Glucosa.....40

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.....48MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O.....0,5

Extracto de levadura.....3

pH.....5,5

(C/N~49)

Buffer PBS (Phosphate Buffered Saline) 1X

NaCl.....0,137 M

KCl.....0,0027 M

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.....0,01 MKH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.....0,0018 M

pH.....7,4



# Metabarcoding analysis of the fungal biodiversity associated with Castaño Overa Glacier – Mount Tronador, Patagonia, Argentina

R.A. Duo Saito <sup>a,\*</sup>, L. Connell <sup>b</sup>, R. Rodriguez <sup>c</sup>, R. Redman <sup>c</sup>, D. Libkind <sup>a</sup>, V. de Garcia <sup>d</sup>

<sup>a</sup> Laboratorio de Microbiología Aplicada, Biotecnología y Bioinformática, Instituto Andino Patagónico de Tecnologías Biológicas y Geoambientales (IPATEC), CONICET - Universidad Nacional del Comahue, Bariloche (8400), Quintral, 1250, Argentina

<sup>b</sup> School of Marine Sciences, University of Maine, Orono, USA

<sup>c</sup> Adaptive Symbiotic Technologies, Seattle, WA, 98105, USA

<sup>d</sup> Instituto de Investigación y Desarrollo en Ingeniería de Procesos, Biotecnología y Energías Alternativas (PROBIEN), CONICET - Universidad Nacional del Comahue, Neuquén (8300), Buenos Aires, 1400, Argentina

## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 23 February 2018

Received in revised form

28 June 2018

Accepted 12 July 2018

Corresponding Editor: Kevin K. Newsham

### Keywords:

Extremophilic

Oligotrophic environment

Microbotryomycetes

Non-polar glacier

## ABSTRACT

Cold environments represent the largest fraction of Earth's biosphere, and are known habitats for cold-adapted microorganisms. The aim of this study was to assess the occurrence and biodiversity of cold-adapted fungi associated with the Castaño Overa glacier, Mount Tronador, Patagonia, Argentina. Samples of naked soil, glacial ice and snow were collected and analyzed using tag-encoded 454 pyrosequencing of the nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS). A total of 1082 OTUs (operational taxonomic units) and 151,669 sequences were obtained. OTUs obtained from soil samples corresponded mainly to the phylum Ascomycota, whereas for snow and ice samples the phylum Basidiomycota was the most represented group. Metabarcoding analysis showed high biodiversity in glacial environments and allowed the detection of hitherto unknown taxa for Patagonia. To the best of our knowledge, this is the first report of fungal diversity in an extreme glacial environment of Patagonian Argentina using amplicon sequencing.

© 2018 Elsevier Ltd and British Mycological Society. All rights reserved.

## 1. Introduction

There are multiple habitats on Earth with factors that limit the development of microorganisms, including the ocean floor, hot springs, saltworks, acidic rivers, deserts, glaciers and high altitude areas. An ecosystem is identified as extreme if its physico-chemical conditions are outside the parameters considered optimal for life (from an anthropocentric perspective) of most organisms, such as those that allow the development of model organisms like *Escherichia coli* (Antranikian et al., 2005; Canganella and Wiegel, 2011). Cold environments are one such extreme habitat, with associated factors such as high UV radiation, low water potential, low nutrient availability, high hydrostatic pressure and oxidative stress, among other important factors (Goordial et al., 2013).

Fungi are key microorganisms in cold environments, as symbionts in mycorrhizas or lichens and as saprotrophs that contribute to the cycling of nutrients, and constitute one of the most

metabolically active groups of eukaryotes in glaciers (Anesio and Laybourn-Parry, 2012; Hassan et al., 2016). Studies in these environments in Antarctica and the Arctic have shown wide fungal diversity in varied substrates such as bulk soil (Connell et al., 2006; Sterflinger et al., 2012), Antarctic lakes (Gonçalves et al., 2012), cryoconite holes in mountain glaciers (Bergauer et al., 2005; Singh and Singh, 2012), glacier ice and meltwater on Alps and in high mountains in Patagonia, Argentina (de Garcia et al., 2007, 2012, 2014; Turchetti et al., 2008; Libkind et al., 2009; Branda et al., 2010; Brandão et al., 2011). Cold and oligotrophic environments present an ideal location to examine the evolutionary processes of native microorganisms because these habitats facilitate the speciation of endemic organisms (Gostinčar et al., 2009; Cantrell et al., 2011). Additionally, global climate change may increase the rate of desertification and exposed land from glacial retreat in certain parts of the globe (Oerlemans, 2001; Higgens and Vellinga, 2004), allowing the study of communities of soil eukaryotic microorganisms and their adaptation to these habitats (Connell et al., 2008).

The Earth's surface temperatures in the last 2 years have been the warmest since modern record keeping began in 1880 (Cole and McCarthy, 2018). The magnitude of these temperature changes

\* Corresponding author.

E-mail address: [rduosaito@comahue-conicet.gob.ar](mailto:rduosaito@comahue-conicet.gob.ar) (R.A. Duo Saito).

impels the study of extreme cold environments, and microorganisms adapted to these environments, because such habitats could be lost in a few years. Paleobotanical studies demonstrate that Arctic soil fungi have responded to climate warming, with the isolation and conservation of extremophile fungi being viewed as a means of avoiding their possible extinction (Zalar and Gunde-Cimerman, 2014).

The environments associated with mountain glaciers of Patagonia are an ideal setting for such studies. The Nahuel Huapi National Park (NHNP) in northwestern Patagonia (Argentina) has a cold to temperate climate and includes vast areas with little or no human influence. Mount Tronador is an old, extinct stratovolcano located in the Patagonian Andes along the Argentina–Chile border in NHNP. Castaño Overa is one of four glaciers located in Argentina (Ruiz et al., 2015). As a result of increases in ultraviolet radiation (UVR) resulting from its proximity to the Antarctic ozone hole, Patagonia is exposed to enhanced levels of solar UV-B radiation for periods during spring (Diaz et al., 2006; Wolfram et al., 2012). Mean annual air temperature in this area is 8.3 °C, with sub-zero temperatures in winter and precipitation, mainly in the form of snow, reaching an annual average of 1186 mm (Hotel Tronador, 41°16'S, 71°39'W, 815 m, period 2013–2017). Studies of yeast biodiversity and novel species with biotechnological value have been conducted in these habitats (de Garcia et al., 2014), but these studies have focused on cultivable yeasts.

The aim of the present study was to evaluate fungal biodiversity associated with Castaño Overa glacier, Mount Tronador (NHNP), in order to begin to elucidate the most abundant groups in this extreme habitat. 454 pyrosequencing was used to study the fungal communities in oligotrophic habitats transitioning from sub-glacial flow through to the development of mesotrophic cold desert habitats to address the following questions: (1) what is the fungal diversity and community composition in snow-ice from Castaño Overa glacier and its associated soil? (2) do diversity and composition of fungal communities vary among the different substrates (soil and snow-ice) and different sites?

## 2. Materials and methods

### 2.1. Study area and sampling

Soil, ice, and snow samples were aseptically collected from Castaño Overa glacier, Mount Tronador (41°09'S, 71°53'W) in January 2015. GPS positions were recorded *in situ* (Supplementary Table 1). Five soil samples were collected from two sites, Soil Site 1 (SS1) and Soil Site 2 (SS2), in moraines surrounding the Castaño Overa glacier. Five plots of 1 × 1 m were delimited, with five sub-samples of soil 100 g collected from each plot and placed into sterile plastic bags (Connell et al., 2006). Three ice samples were collected from three Castaño Overa fissures (each one with three

replicates) and five snow samples were collected from the surface of the glacier (Fig. 1). All samples were stored in sterile plastic bags. Ice and snow samples were melted aseptically at room temperature and then filtered through Millipore® membrane filters (pore size 0.45 µm, diameter 47 mm) (de Garcia et al., 2012).

### 2.2. Soil chemistry

Subsamples of soil from each site were pooled to obtain a composite aliquot to be used for physical and chemical analysis. Soil pH was measured in a 1:2.5 (w/v) soil-to-water ratio, soil moisture was determined gravimetrically (Barrett et al., 2002), organic carbon was assessed by wet-oxidation (Okalebo et al., 2002), total N was estimated by the micro-Kjeldahl method and phosphorus concentration was assayed by mineralization of the sample and dry digestion (Gregorich and Carter, 2007). All of the analyses were carried out by the Soil Group from the Centro Regional Universitario Bariloche, Universidad Nacional del Comahue, Río Negro, Argentina. Only soil samples were chemically analyzed, because snow-ice samples were not suitable for the corresponding analyses.

### 2.3. Direct DNA extraction from snow, ice and soil

DNA was extracted from soil and snow-ice using MOBIO PowerMax® Soil and MOBIO PowerWater® kits, respectively, as per the manufacturer's instructions. 454 Pyrosequencing (Roche) amplification of ribosomal ITS regions was performed using the primer ITS1F (5-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3) and ITS4 (5-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3) (Zhang et al., 2015). A single-step PCR profile using HotStarTaq Plus Master Mix Kit (QIAGEN, Valencia, CA) was used under the following conditions: 94 °C for 3 min, followed by 28 cycles of 94 °C for 30 s, 53 °C for 40 s and 72 °C for 1 min, and then a final elongation step at 72 °C for 5 min. Following PCR, all amplicon products from different samples were mixed in equal concentrations and purified using Agencourt AMPure beads (Agencourt Bioscience Corporation, MA, USA). Samples were sequenced utilizing Roche 454 FLX titanium instruments and reagents, following the manufacturer's guidelines.

### 2.4. Amplicon data processing

The sequence data was processed using an analysis pipeline ([www.mrdnlab.com](http://www.mrdnlab.com), MR DNA, Shallowater, TX). Sequences were depleted of barcodes and primers, and then short sequences (<200 bp), sequences with ambiguous base calls, and sequences with homopolymer runs exceeding 6 bp were removed. Sequences were then denoised and operational taxonomic units (OTUs) were defined by clustering at 3% divergence (97% similarity), followed by the removal of singleton sequences and chimeras (Dowd et al., 2008a, 2008b; Edgar, 2010; Capone et al., 2011; Eren et al., 2011;



**Fig. 1.** Locations of Castaño Overa Glacier and sampling sites. Circles represent soil samples S1–S3 collected from site 1 (SS1), white stars represent soil samples S4–S5 from site 2 (SS2) and gray squares correspond to ice-snow samples G6–G10 from glacier sites SG1–SG3.

Swanson et al., 2011). Final OTUs were taxonomically classified using BLASTn against a curated database derived from UNITE and NCBI. Taxonomy followed Kirk et al. (2008), Liu et al. (2015), McLaughlin and Spatafora (2014, 2015), Wang et al. (2015) and the MycoBank database (<http://www.mycobank.org>).

## 2.5. Data analysis

The sequences of selected OTUs were analyzed with related sequences from GenBank. The phylogenetic relationships were estimated using MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets (Kumar et al., 2016). Phylogenetic trees were constructed using the neighbour-joining algorithm, and bootstrap values were calculated from 1000 replicate runs. The Kimura two-parameter model was used to estimate evolutionary distance.

Alpha-diversity indices (i.e., Chao1, Good's coverage estimator and the Shannon Index) and beta-diversity metrics were calculated. Rarefaction curves were produced. To estimate community similarity among samples, a hierarchical cluster analysis was applied on the basis of the abundance of OTUs in the communities using Bray–Curtis dissimilarity and a dendrogram inferred with the average linkage method. These analyses were performed in R, using OTUs for community procedures in the *Vegan* package (Oksanen et al., 2011). A principal components analysis (PCA) was carried out using IBM SPSS Statistics software v. 23 (IBM Corp.), to determine which soil physicochemical characteristics best explained the variance among samples.

## 3. Results

### 3.1. Sequence data

The raw data from 10 samples (five of soil and five of snow-ice) consisted of 219,068 sequences. After removing short sequences, chimeric sequences and OTUs of non-fungal organisms, 151,669 sequences passed the quality control, resulting in a total of 1082 OTUs at 97% similarity. Soil samples had more variable numbers of OTUs, ranging from 168 to 365, while the numbers in snow-ice samples ranged from 171 to 255. The length of sequences ranged from 225 to 553 bp.

### 3.2. Diversity and structure of fungal community

The 1082 OTUs spanned eight phyla, 24 classes, 44 orders and 163 families, with 4% (43 OTUs) being classified as unknown taxa. There were few (6.6%) OTUs shared between soil and snow-ice, with the majority being specific to each of the two substrates (Supplementary Table 2 and Supplementary Figure 1). Both rarefaction curves and Good's coverage estimator suggested that 454 pyrosequencing captured the dominant phylotypes in all samples (Table 1). Furthermore, curves revealed that for a common sampling effort (9296 reads), soil samples show higher richness (number of OTUs) than snow-ice samples (Fig. 2).

Shannon-Weaver Index values, in both soil and snow-ice, ranged between 3.56 and 4.44, but there were no significant differences in index values between sites or between substrates ( $P > 0.05$ ). Nevertheless, soil sample S2 showed the most diverse profile, with a value of 4.44. The highest number of sequences was recovered from snow-ice. Dikarya related sequences dominated soil and snow-ice substrates, both for the number of sequences (87.14%) and in the number of OTUs (918 of 1082) (Fig. 3).

### 3.3. Differences in community structure between soil and ice-snow samples

The relative abundance of phylogenetic groups from soil and snow-ice, based on ITS sequences, was obtained. A comparison of the fungal components in the two substrates showed that the phylum Ascomycota dominated the soil samples, and that Basidiomycota were most frequent in snow-ice samples.

For soil samples, 23 classes were identified, with the Leotiomycetes (Ascomycota) being the most common taxon (relative abundances of 11–42%), followed by the Sordariomycetes, Dothideomycetes and Eurotiomycetes. Members of the Geoglossomycetes were only present in sample S5 (at a relative abundance of 11%), and sample S1 showed the highest proportion of Chytridiomycetes, with 45% of OTUs being related to this class (Fig. 4).

Fifteen classes/unknown classes were shared between soil samples SS1 and SS2, representing 60% of total classes (Supplementary Figure 2a). Classes unique to SS1 were the Saccharomycetes (2.07%), Archaeorhizomycetes (1.73%), Pucciniomycetes (0.55%), Orbiliomycetes (0.15%), Cystobasidiomycetes (0.1%), Monoblepharidomycetes (0.06%), Entorrhizomycetes (0.03%) and Neocallimastigomycetes (0.03%), with SS2 consisting exclusively of Geoglossomycetes (5.47%) and unknown Basidiomycota (0.01%) (all values are percentages per site).

For snow-ice samples, 13 classes were identified, and two unknown-classes were obtained, with the Microbotryomycetes (Basidiomycota), which was present in all samples, being the most abundant group (63–94% per snow-ice sample), followed by the Monoblepharidomycetes (0.5–26% per sample), and sample G10 showing the highest proportion of this class.

In snow-ice samples, nine classes were identified at each site (Supplementary Figure 2b). The Malasseziomycetes was unique to site one (SG1, 0.01%) and the Arthoniomycetes was only present at site two (SG2, 0.02%). At site three, only the Glomeromycetes were present (0.12%). Shared classes between SG1 and SG2 were the Tremellomycetes (0.6% and 0.02%, respectively) and unknown Basidiomycota (0.02 and 0.003%, respectively). Finally, an unknown group of Ascomycota was shared between SG2 and SG3 (0.03 and 0.01%, respectively). Fourteen classes and unknown classes were shared between soil and ice-snow substrates in total.

The most abundant ascomycete orders in soil and snow-ice were the Helotiales and Capnodiales, respectively, while the Sebaciales and Leucosporidiales were the most abundant basidiomycete orders in soil and snow-ice, respectively. Members of the Chytridiomycetes and Monoblepharidomycetes were also found, with a high proportion of Spizellomycetales in soil samples and Monoblepharidiales in snow-ice samples (Supplementary Table 3).

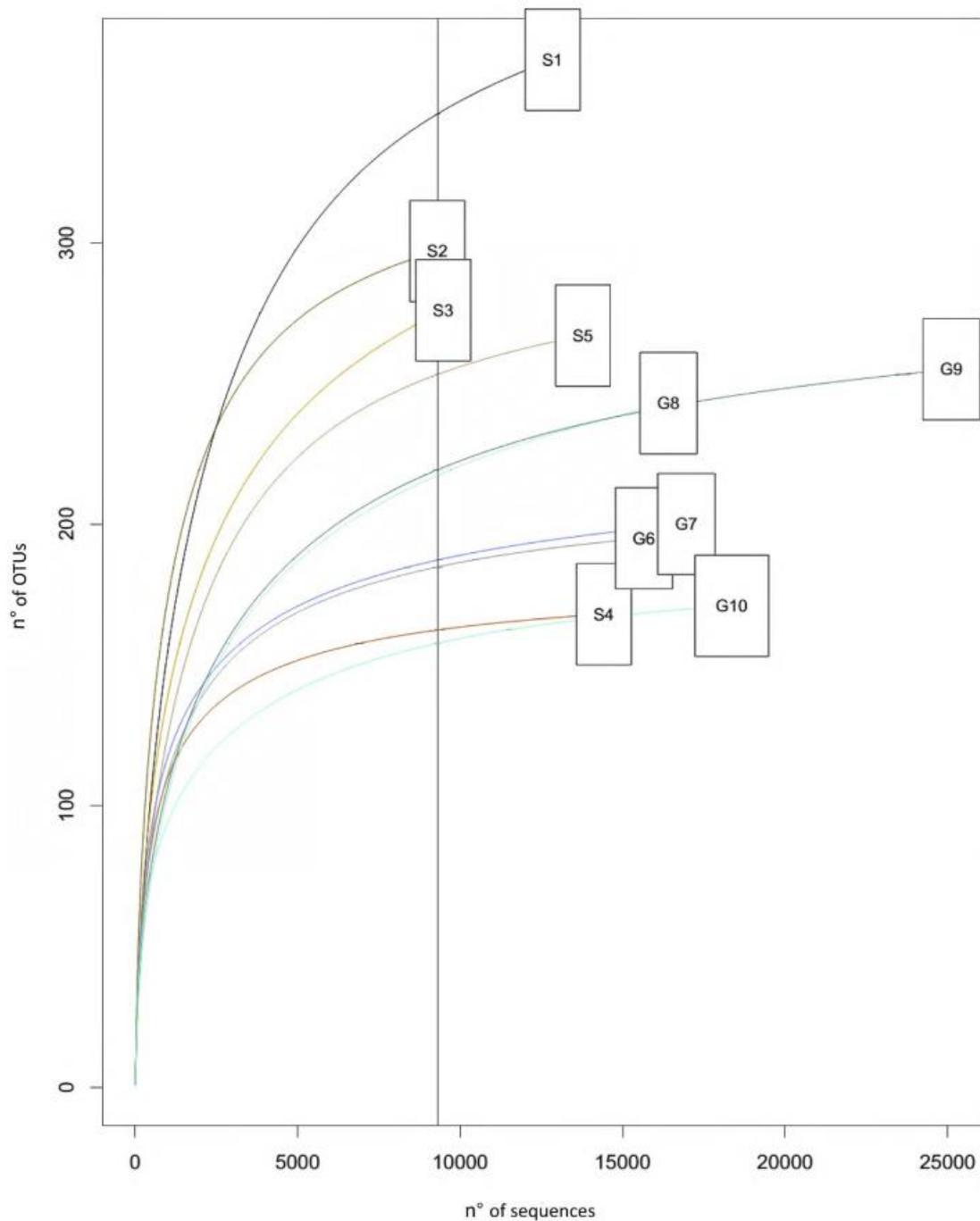
Similarity of the community among sites was assessed, comparing the relative abundance and distribution of OTUs by sample. Cluster analysis, using Bray–Curtis dissimilarity, separated the communities into three main groups (Fig. 5). One group contained all communities from snow-ice, whereas soil communities were further separated into two clusters, one in site 1 (S1–S3) and the other in site 2 (S4–S5). OTUs identified to species level were less abundant compared with OTUs from higher levels of taxonomic identification, with 202 OTUs at the species level over 1112 OTUs with <97% of identification, for both soil and snow-ice samples. Over this total, 183 were related to sequences of isolated species, while the remainders were related to environmental amplicons.

OTUs such as *Penicillium lividum*, *Venturia hystrioides*, *Gibberella* sp. and *Phialocephala helvetica* dominated in soil, while in snow-ice, *Phenoliferia psychrophena*, *Epicoccum nigrum*, *Preussia* sp. and *Phaffia rhodozyma* showed the highest abundances. *Gibberella* sp.

**Table 1**  
Fungal diversity parameters, number of OTUs and sequences in each sample.

|                                    | Soil  |       |       |       |       | Snow-Ice |       |       |       |       |
|------------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|----------|-------|-------|-------|-------|
| Sample                             | S1    | S2    | S3    | S4    | S5    | G6       | G7    | G8    | G9    | G10   |
| No. reads*                         | 12769 | 9002  | 9367  | 14409 | 13664 | 15655    | 16950 | 16410 | 25112 | 18331 |
| No. OTUs                           | 345   | 271   | 263   | 165   | 263   | 194      | 197   | 243   | 254   | 169   |
| Frequency of most abundant OTU (%) | 25.73 | 7.26  | 18.57 | 15.19 | 15.71 | 15.61    | 14.04 | 15.45 | 12.18 | 15.01 |
| <b>Diversity indices</b>           |       |       |       |       |       |          |       |       |       |       |
| Good's coverage                    | 0.96  | 0.97  | 0.97  | 0.98  | 0.98  | 0.98     | 0.98  | 0.98  | 0.98  | 0.98  |
| Shannon (H)                        | 3.56  | 4.44  | 3.93  | 3.69  | 3.6   | 3.74     | 3.81  | 3.45  | 3.66  | 3.64  |
| Chao1                              | 410.3 | 316.1 | 327.2 | 173.5 | 290.6 | 202.1    | 213.1 | 295.1 | 272.2 | 178   |

\*Final number of reads obtained after removing primers, short (<200 bp) and low-quality sequences and chimeras.



**Fig. 2.** Rarefaction curves of estimated OTU richness in soil (S1–S5) and glacier snow-ice (G6–G10).

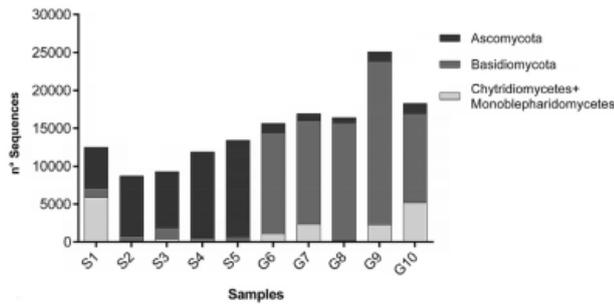


Fig. 3. Absolute abundance of sequences by sample.

had the highest number of sequences shared between the two substrates (1% of 151,669 sequences). The most abundant fungi in all samples (3.9–5.5%) were OTUs 10, 17 and 45, which were related to members of the Microbotryomycetes.

Due to the large number of unidentified OTUs within the Microbotryomycetes, a selection of the most abundant Microbotryomycetes-like OTU sequences is shown in Supplementary Table 4. A phylogenetic tree was constructed showing the placement of OTUs in the Microbotryomycetes (Fig. 6). OTU 72 was related to *P. psychrophenolica*, a cold adapted species belonging to a psychrophile ecoclade (Gadanhó and Sampaio, 2009). OTUs 17, 10, 769, 27 and 23 were grouped together as a sister group to psychrophilic yeasts isolated from glacial ice from Castaño Overa glacier and marine ice from Antarctica (strains CO1.5, CO2.3, CRUB 1741, 10.2 and, 10.6). OTUs 28 and 14 were grouped together. OTUs 17, 10, 769, 27 and 23 differed by 32 (SD: 3) nucleotide substitutions (9.8%) from Antarctic yeast (strain 10.2), while OTU 72 differed by 34 nucleotide substitutions (9.04%) from *P. psychrophenolica* AG21.

### 3.4. Soil chemistry

The moisture content of soil samples ranged from 9.9% (S5) to 27% (S1). Both carbon, nitrogen and phosphorus concentrations were highest at site 1 (S1, S2 and S3). Soil samples were slightly acidic with pH values ranging from 4.8 to 5.4 (Supplementary Table 5). The PCA showed that the first two principal components explained 85.3% of total variance (Fig. 7a). PC1 represented a gradient in phosphorus, moisture, carbon and nitrogen concentration, and PC2 represented a gradient in pH value. The samples from two sites were clearly separated by the variables comprising component 1, with the differences between samples corresponding largely to pH value (Fig. 7b).

## 4. Discussion

### 4.1. Diversity of fungal communities

To the best of our knowledge, this work represents the first analysis of fungal communities within oligotrophic soil and snow-ice from a glacial environment of Patagonia (Argentina), using a high throughput NGS method. Studies carried out in soil and glaciers in different part of the world have shown a total number of OTUs ranging between 900 and 2500 (Tedersoo et al., 2014), and 298 to 1611 (Gutiérrez et al., 2015; Rime et al., 2016), respectively. In our study we obtained 1112 total OTUs in soil and snow-ice substrates, close to the upper limit of richness in similar extreme environments.

Soil and snow-ice samples showed differences based on the most representative OTUs. Only a few OTUs were present in both substrates, suggesting a limited fungal community interchange at the terminal moraine. Rime et al. (2016) found a similar pattern in recently deglaciated soils and endogenous supra- and subglacial habitats, suggesting a lower dispersal capability of fungi than bacteria in the same habitat.

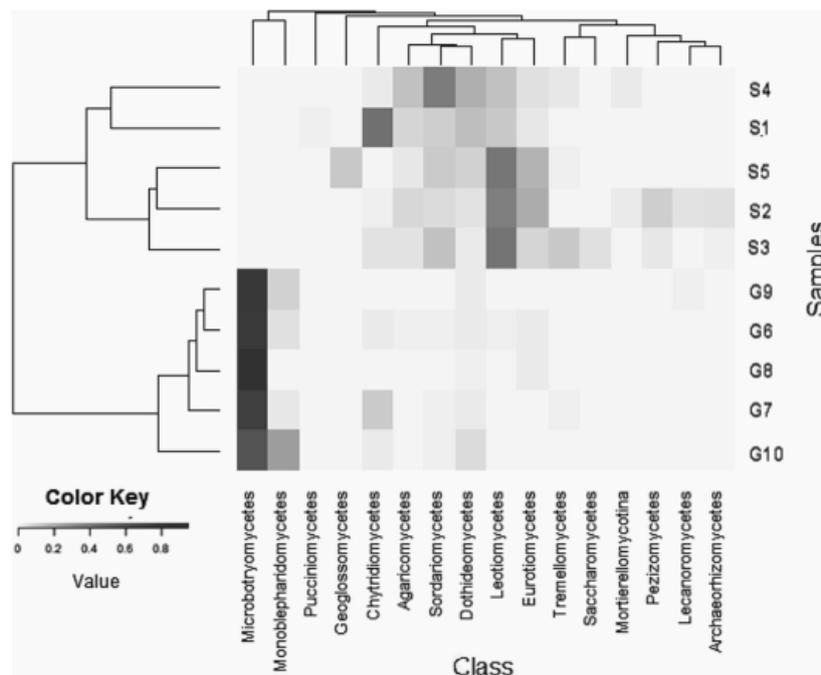


Fig. 4. Heatmap showing the total abundance of each class in each sample of soil (S1–S5) and glacier snow-ice (G6–G10) from Castaño Overa glacier. The branch lengths of the cluster dendrogram show the similarity level. Clustering among samples was based on a distance matrix computed with Bray–Curtis dissimilarity.

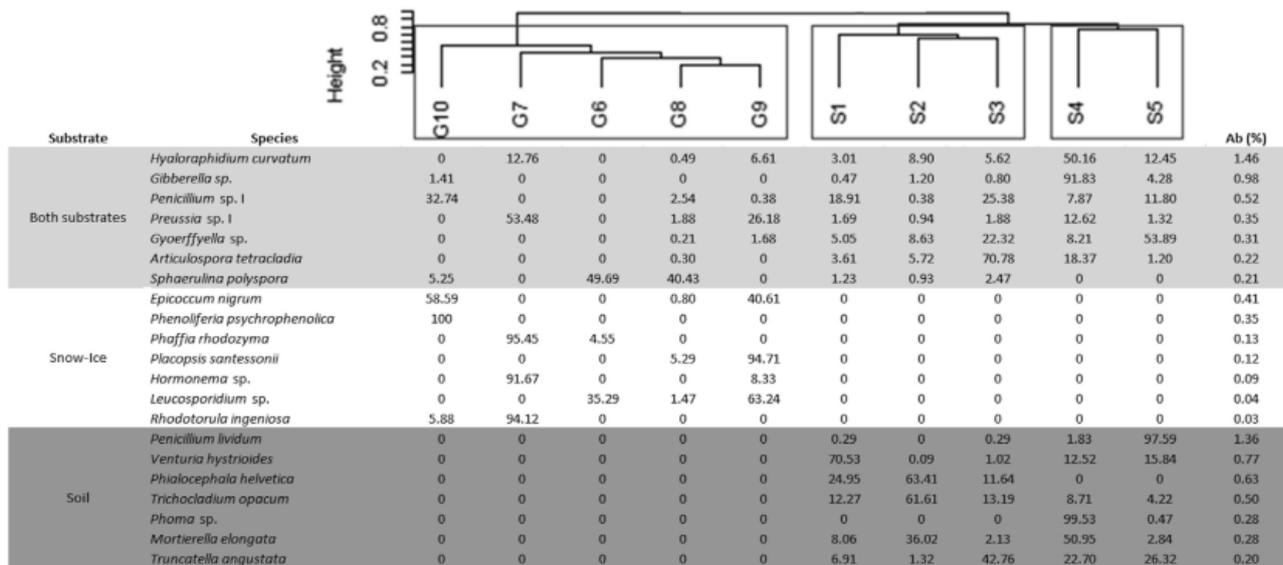


Fig. 5. Dendrogram representing the similarity between the composition of fungal OTUs in soil samples (S1–S5) and glacier snow-ice (G6–G10) from Castaño Overa glacier. The branch lengths of the cluster dendrogram show the similarity level. Clustering is based on a distance matrix computed with Bray–Curtis dissimilarity.

The rarefaction curves obtained for all samples showed different richness patterns depending on the substrate. Soil samples showed greater values when compared with snow-ice, and the estimated coverage indicated that at least 96.7% of the OTUs richness was detected in this sampling. The greater diversity in soil samples can be explained in part by fungal groups that generally are associated with plants or lichens in these soils (Sterflinger et al., 2012; Rime et al., 2016).

The results obtained through NGS technology allowed us to acquire information on diversity and on taxonomic fungal groups that have not been isolated from the studied environment. In addition, by using NGS methods, higher levels of diversity were detected when comparing the taxonomic groups identified in this work with previous research of cultivable yeasts and/or filamentous fungi of Patagonia and Antarctica (Cecilia Mestre et al., 2011; de Garcia et al., 2012; Godinho et al., 2012).

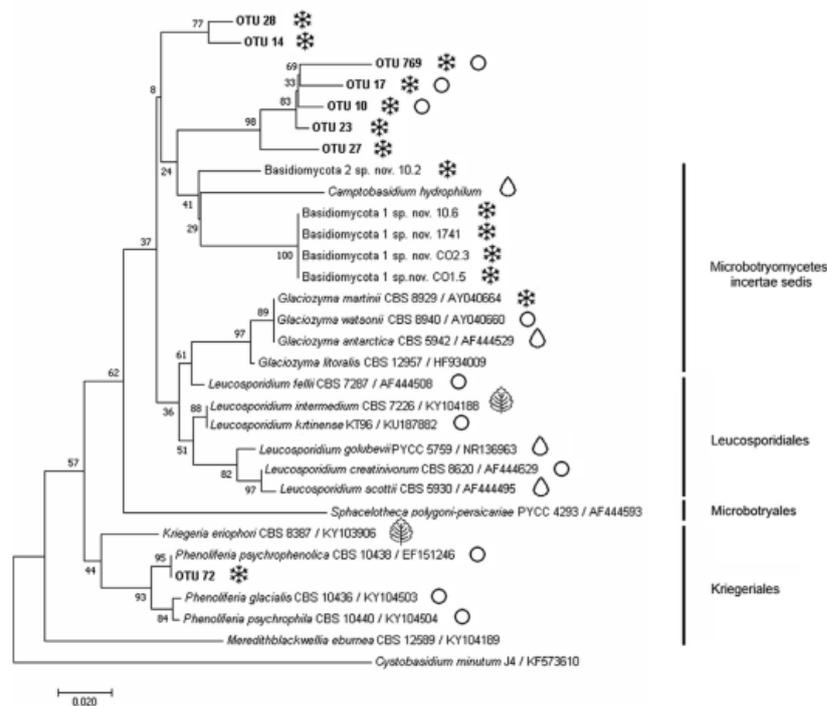


Fig. 6. Phylogenetic placement of Microbotryomycetes-like OTUs obtained by neighbour-joining (distance K2P method) of the ITS region. The figures represent the substrate from which the sequences or isolations were obtained: leaf: phylloplane; circle: soil or sediments; snowflake: glacier ice and water drop: water. Bar, number of substitutions accumulated per 100 nucleotides. Bootstrap values were calculated from 1000 replicates.

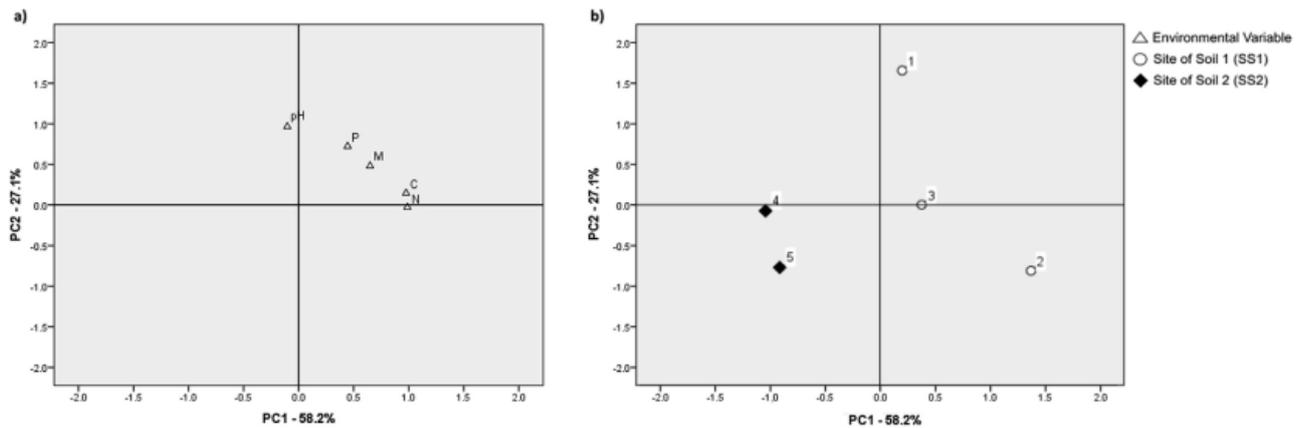


Fig. 7. PCA of the different physicochemical characteristics determined for the soils samples. (M: moisture; P, C and N: concentrations of phosphorus, carbon and nitrogen, respectively).

#### 4.2. Differences in community structure between soil and ice-snow samples

We found that ascomycetes dominated in the soils from the Mount Tronador glacier. This is similar to observations from Antarctic soils, which are also dominated by ascomycetes (Connell et al., 2006, 2008; Arenz et al., 2014; Cox et al., 2016). The most abundant OTUs were members of the genera *Claussenomyces* sp., *Rhizoscyphus* sp. and *Phialocephala* sp., which are associated with decaying wood or live plants (ericoid mycorrhiza, dark septate endophytes). Similar results have been obtained for soils close to huts in the Antarctic (Arenz et al., 2014). For the class Leotiomycetes, studies show that these fungi tend to increase in diversity towards the poles, with it being one of the most abundant ascomycete classes in Arctic tundra, and on Antarctic islands (Tedersoo et al., 2014; Zhang et al., 2015; Cox et al., 2016), with the results obtained here supporting these observations.

In our research, chytrids were present in both soil and snow-ice samples. These zoospore fungi are rarely isolated from extreme environments, but in recent years the analysis of environmental DNA has allowed further insights into the ecology of these basal fungi. For example, Chytridiomycota have been found in Antarctic soils (Bridge and Newsham, 2009) and a new clade of snow chytrids have been described in snowpacks of Colorado and Switzerland (Naff et al., 2013). Moreover, the presence of chytrids has recently been discovered in glacier meltwater and sediments in a fjord in Chilean Patagonia (Gutiérrez et al., 2015). The orders Spizellomycetales and Rhizophydiales are the most common chytrids in soil. Some species in these orders have been shown to tolerate desiccation and freezing in laboratory experiments (Gleason et al., 2004, 2010). We have observed the presence of this group in sample S1 with the highest abundance of Chytridiomycota. This soil sample had the highest pH value, moisture and P concentrations, suggesting that the influence of glacial meltwater could create favorable conditions for the dispersal and development of chytrids in soil, similar to other high elevation environments such as Colorado and Nepal, where the chytrid-like sequences dominate (Freeman et al., 2009).

The Monoblepharidales was the most represented order of chytrids in ice-snow samples. This order is generally accepted as being sister to the Chytridiomycetes in the phylum Chytridiomycota (Hibbett et al., 2007; Dee et al., 2015). However, some authors place the taxon as a separate phylum, the Monoblepharidomycota, containing the Monoblepharidomycetes and the Hyaloraphidiomycetes (Powell and Letcher, 2014). In this study, we

consider them to be a group within the Chytridiomycota. Monoblepharidales have been isolated from freshwater, soil, brackish and marine environments, with other chytrid orders (Longcore and Simmons, 2001; Gleason et al., 2008), and have been found in water samples of Lake Ontario, Canada (Zhang et al., 2015). This order is considered mostly saprotrophic, with a few known parasites (Powell and Letcher, 2014; Karpov et al., 2017). To date, there is a paucity of information about this taxon in extreme environments. Our study reports its existence in Patagonia, contributing to our knowledge of its geographic distribution and ecology, and setting the basis for future studies on its role in extreme environments.

Basidiomycota dominated in snow-ice samples of Castaño Overa glacier, Patagonia, Argentina, in agreement with previous studies of culturable yeasts from ice and water of Argentine Patagonian glaciers and other cold environments (Margesin et al., 2007; Branda et al., 2010; Thomas-Hall et al., 2010; Uetake et al., 2011; Vaz et al., 2011; de Garcia et al., 2012; Brown et al., 2015; Martinez et al., 2016). Snow-ice substrate harbored sequences related to psychrophilic and psychrotolerant species, such as *P. psychropholica*, a basidiomycetous yeast isolated from alpine glaciers (Margesin et al., 2007; Branda et al., 2010) and *P. rhodozyma*, a basidiomycetous yeast associated with temperate forests in the northern and southern hemispheres (Libkind et al., 2007; David-Palma et al., 2014). The detection of *Ph. rhodozyma* in snow-ice samples is in agreement with previous culture-dependent studies describing its distribution in Andean Patagonia (Libkind et al., 2007, 2009, 2011).

For both substrates studied here, the OTUs that we were able to identify to genus/species level were mostly related to ascomycetes. Most of these species are described as soil organic matter decomposers, plant pathogen and root or lichen symbionts, such as *Gibberella* sp., *Sphaerulina polyspora*, *P. helvetica* and *Psoroma buchananii* (McLaughlin and Spatafora, 2015). Nevertheless, unknown microbotryomycetous sequences were dominant in snow-ice samples. The Microbotryomycetes is the second largest class in the Pucciniomycotina, with more than 200 described species that include mostly dimorphic species and yeasts (Boekhout et al., 2011). This taxonomic group encompasses a wide variety of psychrophilic fungi, such as *Phenoliphia* spp. in the Sporidiobolales (Margesin et al., 2007), *Leucosporidium* spp. in the Leucosporidiales (Sampaio et al., 2003; de Garcia et al., 2015), *Glaciozyma* spp. in the Kriegeriales (Turchetti et al., 2011) and *Camptobasidium hydrophilum* in the Camptobasidiaceae (Marvanová and Suberkropp, 1990). Studies of culturable yeasts of cold environments showed that species in this class are predominant along with species in the Tremellomycetes (de Garcia et al., 2007, 2012; Turchetti et al., 2011,

2013; Edwards et al., 2013; Singh et al., 2013; Zalar and Gunde-Cimerman, 2014).

The OTUs obtained here consisted of few sequences that do match with known species, most of which are in the class Microbotryomycetes. One of the unidentified species was related to *P. psychropholica* (OTU 72), which is a cold adapted species that belongs to a psychrophile ecoclade (Gadanho and Sampaio, 2009). The remaining OTUs were close to the *Glaciozyma* clade and were related to a new taxonomic group in which all isolates have been recovered from glacial ice from montane and polar habitats. These isolates possess psychrophilic growth profiles and represent a new yeast genus that will be formally described in a following report (de Garcia, personal communication). This mountain glacial/soil environment possesses a broad range of fungi adapted to low temperatures, freeze-thawing cycles and oligotrophic conditions, which is most probably of considerable ecological and functional significance.

## 5. Conclusions

The diversity of fungi in cold environments harbors microbial life much more diverse than previously thought. The patterns of distribution of the different classes were common to other studies of fungi inhabiting diverse cold environments. Chytridiomycota occurred at high relative abundance in the glacier. Additional studies are needed to understand the ecological role of chytrids within these and other extreme environments. For glacial environments in particular, the predominant group consisted of previously undescribed species related to psychrophilic yeasts. Future efforts will focus on developing new isolation strategies for their recovery and subsequent genetic and physiological characterization in order to better establish their taxonomy, level of specialization to extreme conditions, and ecological and biotechnological importance.

## Acknowledgements

We are grateful to Lic. M. Latorre and Dr. A. Trochine, for their support and collaboration in the sampling, to Lic. A. Carron and Lic. J. Eizaguirre for the statistical counseling. We also thank National Park Administration for giving us permission to work in a protected area (Permission N° 1305/15) and Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) for doctoral fellowship of Lic. R. Duo Saito. Financial support for this work was provided by grants: B171 (UNComahue), PIP 0392 CONICET from DL and PICT2014-2483 (FonCyT) from VdG. Finally, we will like to thank the reviewers for their careful reading of our manuscript and their helpful comments and suggestions.

## Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2018.07.006>.

## References

Anesio, A.M., Laybourn-Parry, J., 2012. Glaciers and ice sheets as a biome. *Trends Ecol. Evol.* 27 (4), 219–225.  
 Antranikian, G., Vorigas, C., Bertoldo, C., 2005. Extreme environments as a resource for microorganisms and novel biocatalysts. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 96, 219–262.  
 Arenz, B.E., Blanchette, R.A., Farrell, R.L., 2014. Fungal diversity in Antarctic soils. In: *Antarctic Terrestrial Microbiology*, first ed. Cowan, D. A. Springer, Berlin, Heidelberg, 35–5.  
 Barrett, J.E., Virginia, R.A., Wall, D.H., 2002. Trends in resin and KCl-extractable soil nitrogen across landscape gradients in Taylor Valley, Antarctica. *Ecosystems* 5, 289–299.

Bergauer, A., Fonteyne, P.A., Noland, N., Schinner, F., Margesin, R., 2005. Biodegradation of phenol and phenol-related compounds by psychrophilic and cold-tolerant alpine yeasts. *Chemosphere* 59, 909–918.  
 Boekhout, T., Fonseca, A., Sampaio, J.P., Bandoni, R.J., Fell, J.W., Kwon-Chung, K.J., 2011. Discussion of teleomorphic and anamorphic basidiomycetous yeasts. In: *The Yeasts: a Taxonomic Study*, fifth ed. Kurtzman, C. Elsevier, Amsterdam, pp. 1339–1374.  
 Branda, E., Turchetti, B., Diolaiuti, G., Pecci, M., Smiraglia, C., Buzzini, P., 2010. Yeast and yeast-like diversity in the southernmost glacier of Europe (calderone glacier, apennines, Italy). *FEMS Microbiol. Ecol.* 72, 354–369.  
 Brandão, L.R., Libkind, D., Vaz, A.B.M., Espírito Santo, L.C., Moliné, M., de Garcia, V., van Broock, M., Rosa, C.A., 2011. Yeasts from an oligotrophic lake in Patagonia (Argentina): diversity, distribution and synthesis of photoprotective compounds and extracellular enzymes. *FEMS Microbiol. Ecol.* 76 (1), 1–13.  
 Bridge, P.D., Newsham, K.K., 2009. Soil fungal community composition at Mars Oasis, a southern maritime Antarctic site, assessed by PCR amplification and cloning. *Fungal Ecol.* 2, 66–74.  
 Brown, S.P., Olson, B.J., Jumpponen, A., 2015. Fungi and algae co-occur in snow: an issue of shared habitat or algal facilitation of heterotrophs? *Arctic Antarct. Alpine Res.* 47 (4), 729–749.  
 Canganella, F., Wiegel, J., 2011. Extremophiles: from abyssal to terrestrial ecosystems and possibly beyond. *Naturwissenschaften* 98, 253–279.  
 Cantrell, S., Dianese, J.C., Fell, J., Gunde-Cimerman, N., Zalar, P., 2011. Unusual fungal niches. *Mycologia* 103, 1161–1174.  
 Capone, K.A., Dowd, S.E., Stamatias, G.N., Nikolovski, J., 2011. Diversity of the human skin microbiome early in life. *Invest Dermatol* 131 (10), 2026–2032.  
 Cecilia Mestre, M., Rosa, C.A., Safar, S.V., Libkind, D., Fontenla, S.B., 2011. Yeast communities associated with the bulk-soil, rhizosphere and ectomycorrhizosphere of a *Nothofagus pumilio* forest in northwestern Patagonia, Argentina. *FEMS Microbiol. Ecol.* 78 (3), 531–541.  
 Cole, S., McCarthy, L., 2018. Long-Term Warming Trend Continued in 2017. NASA, NOAA. <https://www.nasa.gov/press-release/long-term-warming-trend-continued-in-2017-nasa-noaa>.  
 Connell, L., Redman, R., Craig, S., Rodriguez, R., 2006. Distribution and abundance of fungi in the soils of Taylor Valley, Antarctica. *Soil Biol. Biochem.* 38, 3083–3094.  
 Connell, L., Redman, R., Craig, S., Scorzetti, G., Iszard, M., Rodriguez, R., 2008. Diversity of soil yeasts isolated from south victoria land, Antarctica. *Microb. Ecol.* 56 (3), 448–459.  
 Cox, F., Newsham, K.K., Bol, R., Dungait, J.A., Robinson, C.H., 2016. Not poles apart: Antarctic soil fungal communities show similarities to those of the distant Arctic. *Ecology Lett.* 19 (5), 528–536.  
 David-Palma, M., Libkind, D., Sampaio, J.P., 2014. Global distribution, diversity hot spots and niche transitions of an astaxanthin-producing eukaryotic microbe. *Mol. Ecol.* 23 (4), 921–932.  
 de Garcia, V., Brizzio, S., Libkind, D., Buzzini, P., Van Broock, M., 2007. Biodiversity of cold-adapted yeasts from glacial meltwater rivers in Patagonia, Argentina. *FEMS Microbiol. Ecol.* 59, 331–341.  
 de Garcia, V., Brizzio, S., van Broock, M.R., 2012. Yeasts from glacial ice of patagonian Andes, Argentina. *FEMS Microbiol. Ecol.* 82, 540–550.  
 de Garcia, V., Libkind, D., Moliné, M., Rosa, C.A., Giraudo, M.R., 2014. Cold-adapted yeasts in patagonian habitats. In: Buzzini, P., Margesin, R. (Eds.), *Cold-adapted Yeast, Biodiversity, Adaptation Strategies and Biotechnological Significance*, first ed. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp. 123–148.  
 de Garcia, V., Coelho, M.A., Maia, T.M., Rosa, L.H., Vaz, A.M., Rosa, C.A., Sampaio, J.P., Gonçalves, P., van Broock, M., Libkind, D., 2015. Sex in the cold: taxonomic reorganization of psychrotolerant yeasts in the order Leucosporiales. *FEMS Yeast Res.* 15 (4).  
 Dee, J.M., Dee, J.M., Mollicone, M., Longcore, J.E., Roberson, R.W., Berbee, M.L., 2015. Cytology and molecular phylogenetics of Monoblepharidomycetes provide evidence for multiple independent origins of the hyphal habit in the Fungi. *Mycologia* 107, 710–728.  
 Diaz, S., Camilión, C., Deferrari, G., Fuenzalida, H., Armstrong, R., Booth, C., Paladini, A., Cabrera, S., Casiccia, C., Lovengreen, C., Pedroni, J., Rosales, A., Zagarese, H., Vernet, M., 2006. Ozone and UV radiation over southern South America: climatology and anomalies. *Photochem. Photobiol.* 82 (4), 834–843.  
 Dowd, S.E., Sun, Y., Wolcott, R.D., Domingo, A., Carroll, J.A., 2008a. Bacterial tag-encoded FLX amplicon pyrosequencing, (bTEFAP) for microbiome studies: bacterial diversity in the ileum of newly weaned Salmonella-infected pigs. *Foodb. Pathog. Dis.* 5 (4), 459–472.  
 Dowd, S.E., Callaway, T.R., Wolcott, R.D., Sun, Y., McKeehan, T., Hagevoort, R., Edrington, T.S., 2008b. Evaluation of the bacterial diversity in the feces of cattle using 16S rDNA bacterial tag-encoded FLX amplicon pyrosequencing, (bTEFAP). *BMC Microbiol.* 8, 125.  
 Edgar, R.C., 2010. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics* 26, 2460–2461.  
 Edwards, A., Pachebat, J.A., Swain, M., Hegarty, M., Hodson, A.J., Irvine-Fynn, T.D.L., Rassner, S.M.E., Sattler, B., 2013. A metagenomic snapshot of taxonomic and functional diversity in an alpine glacier cryoconite ecosystem. *Environ. Res. Lett.* 8, 035003.  
 Eren, A.M., Zozaya, M., Taylor, C.M., Dowd, S.E., Martin, D.H., Ferris, M.J., 2011. Exploring the diversity of *Gardnerella vaginalis* in the genitourinary tract microbiota of monogamous couples through subtle nucleotide variation. *PLoS One* 6 (10), e26732.  
 Freeman, K.R., Martin, A.P., Karki, D., Lynch, R.C., Mitter, M.S., Meyer, A.F., Longcore, J.E., Simmons, D.R., Schmidt, S.K., 2009. Evidence that chytrids

- dominate fungal communities in high-elevation soils. *Proc. Natl. Acad. Sci. Unit. States Am.* 106, 18315–18320.
- Gadanh, M., Sampaio, J.P., 2009. *Cryptococcus ibericus* sp. nov., *Cryptococcus aciditolerans* sp. nov. and *Cryptococcus metallitolerans* sp. nov., a new ecoclade of anamorphic basidiomycetous yeast species from an extreme environment associated with acid rock drainage in São Domingos pyrite mine, Portugal. *Int J Syst Evol Microbiol.* 59, 2375–2379.
- Gleason, F.H., Letcher, P.M., McGee, P.A., 2004. Some Chytridiomycota in soil recover from drying and high temperatures. *Mycol. Res.* 108, 583–589.
- Gleason, F.H., Kagami, M., Lefevre, E., Sime-Ngando, T., 2008. The ecology of chytrids in aquatic ecosystems: roles in food web dynamics. *Fungal Biol. Rev.* 22 (1), 17–25.
- Gleason, F.H., Schmidt, S.K., Marano, A.V., 2010. Can zoosporic true fungi grow or survive in extreme or stressful environments? *Extremophiles* 14, 417–425.
- Godinho, V.M., Gonçalves, V.N., Santiago, I.F., Figueredo, H.M., Vitorelli, G.A., Schaefer, C.E., Barbosa, E.C., Oliveira, J.G., Alves, T.M.A., Zani, C.L., Junior, P.A., Murta, S.M.F., Romanha, A.J., Kroon, E.G., Cantrell, C.L., Wedge, D.E., Duke, S.O., Abbas, A., Rosa, C.A., Rosa, L.H., 2012. Diversity and bioprospection of fungal community present in oligotrophic soil of continental Antarctica. *Extremophiles* 19, 585–596.
- Gonçalves, V.N., Vaz, A.B., Rosa, C.A., Rosa, L.H., 2012. Diversity and distribution of fungal communities in lakes of Antarctica. *FEMS Microbiol. Ecol.* 82, 459–471.
- Goordial, J., Lamarche-Gagnon, G., Lay, C., Whyte, L., 2013. Left out in the cold: life in cryoenvironments. In: Seckbach, J., Oren, A., Stan-Lotter, H. (Eds.), *Poly-extremophiles: Life under Multiple Form of Stress*, first ed. Springer, New York, pp. 335–364.
- Gostinčar, C., Grube, M., De Hoog, S., Zalar, P., Gunde-Cimerman, N., 2009. Extremotolerance in fungi: evolution on the edge. *FEMS Microbiol. Ecol.* 71, 2–11.
- Gregorich, E.G., Carter, M.R., 2007. *Soil Sampling and Methods of Analysis*. CRC Press.
- Gutiérrez, M.H., Galand, P.E., Moffat, C., Pantoja, S., 2015. Melting glacier impacts community structure of bacteria, archaea and fungi in a Chilean Patagonia fjord. *Environ. Microbiol.* 17, 3882–3897.
- Hassan, N., Rafiq, M., Hayat, M., Shah, A.A., Hasan, F., 2016. Psychrophilic and psychrotrophic fungi: a comprehensive review. *Rev. Environ. Sci. Bio/Technol.* 15, 147–172.
- Hibbett, D.S., Binder, M., Bischoff, J.F., Blackwell, M., Cannon, P.F., Eriksson, O.E., Lumbsch, H.T., 2007. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycol. Res.* 111, 509–547.
- Higgins, P.A., Vellinga, M., 2004. Ecosystem responses to abrupt climate change: teleconnections, scale and the hydrological cycle. *Climatic Change* 64, 127–142.
- Karpov, S.A., Mamanazarova, K.S., Popova, O.V., Aleoshin, V.V., James, T.Y., Mamkaeva, M.A., Tsvetkova, V.S., Vishnyakov, A.E., Longcore, J.E., 2017. Monoblepharidomycetes diversity includes new parasitic and saprotrophic species with highly intronized rDNA. *Fungal Biol.* 121 (8), 729–741.
- Kirk, P.M., Canon, P.F., Mintery, D.W., Stalpers, J.A. (Eds.), 2008. *Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi*, tenth ed. International Mycological Institute, CAB International, Wallingford.
- Kumar, S., Stecher, G., Tamura, K., 2016. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evol.* 33 (7), 1870–1874.
- Libkind, D., Ruffini, A., van Broock, M., Alves, L., Sampaio, J.P., 2007. Biogeography, host-specificity, and molecular phylogeny of *Phaffia rhodozyma* and its sexual form, *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 1120–1125.
- Libkind, D., Gadanh, M., van Broock, M., Sampaio, J.P., 2009. Cystofilobasidium lacus-mascardi sp. nov., a basidiomycetous yeast species isolated from aquatic environments of the Patagonian Andes, and *Cystofilobasidium macerans* sp. nov., the sexual stage of *Cryptococcus macerans*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 59, 622–630.
- Libkind, D., Tognetti, C., Ruffini, A., Sampaio, J.P., Van Broock, M., 2011. *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*) on stromata of *Cyttaria harioitii* in Patagonian Nothofagus forests. *Rev. Argent. Microbiol.* 43, 226–232.
- Liu, X.Z., Wang, Q.M., Göker, M., Groenewald, M., Kachalkin, A.V., Lumbsch, H.T., Millanes, A.M., Wedin, M., Yurkov, A.M., Boekhout, T., Bai, F.Y., 2015. Towards an integrated phylogenetic classification of the Tremellomycetes. *Stud. Mycol.* 81, 85–147.
- Longcore, J.E., Simmons, D.R., 2001. Chytridiomycota. *ELS*.
- Margolin, R., Neuner, G., Storey, K.B., 2007. Cold-loving microbes, plants, and animals—fundamental and applied aspects. *Naturwissenschaften* 94, 77–99.
- Martinez, A., Cavello, I., Garmendia, G., Rufo, C., Cavalitto, S., Vero, S., 2016. Yeasts from sub-Antarctic region: biodiversity, enzymatic activities and their potential as oleaginous microorganisms. *Extremophiles* 20, 759–769.
- Marvanová, L., Suberkropp, K., 1990. *Camptobasidium hydrophilum* and its anamorph, *Crucella subtilis*: a new heterobasidiomycete from streams. *Mycologia* 82, 208–217.
- McLaughlin, D.J., Spatafora, J.W. (Eds.), 2014. *Systematics and evolution*, Part A, Second ed, Vol. 7. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- McLaughlin, D.J., Spatafora, J.W. (Eds.), 2015. *Systematics and evolution*, Part B, Second ed, Vol. 7. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- Naff, C.S., Darcy, J.L., Schmidt, S.K., 2013. Phylogeny and biogeography of an uncultured clade of snow chytrids. *Environ. Microbiol.* 15, 2672–2680.
- Oerlemans, J., 2001. *Glaciers and Climate*. A. A. Balkema Publishers, Rotterdam, pp. 148.
- Okalebo, J.R., Gathua, K.W., Woomer, P.L., 2002. *Laboratory Methods of Soil and Plant Analysis: a Working Manual*, second ed. Sacred Africa, Nairobi.
- Oksanen, J., Blanchet, F.G., Kindt, R., Legendre, P., O'Hara, R.B., Simpson, G.L., Solymos, P., Stevens, M.H.H., Wagner, H., 2011. *Vegan. Community ecology package*. <http://cran.r-project.org/web/packages/vegan/index.html>.
- Powell, M.J., Letcher, P.M., 2014. 6 Chytridiomycota, Monoblepharidomycota and neocallimastigomycota. In: *Mycota*, The (Ed.). In: McLaughlin, D., Spatafora, J.W. (Eds.), *Systematics and Evolution*, second ed., vol. 1. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 141–175.
- Rime, T., Hartmann, M., Frey, B., 2016. Potential sources of microbial colonizers in an initial soil ecosystem after retreat of an alpine glacier. *ISME J.* 1–17.
- Ruiz, L., Berthier, E., Masiokas, M., Pitte, P., Villalba, R., 2015. First surface velocity maps for glaciers of Monte Tronador, North Patagonian Andes, derived from sequential Pleiades satellite images. *J. Glaciol.* 61, 908–922.
- Sampaio, J.P., Gadanh, M., Bauer, R., Weiß, M., 2003. Taxonomic studies in the Microbotryomycetidae: *Leucosporidium golubevii* sp. nov., *Leucosporidiella* gen. nov. and the new orders Leucosporidiales and Sporidiobolales. *Mycol. Prog.* 2 (1), 53–68.
- Singh, P., Singh, S.M., 2012. Characterization of yeast and filamentous fungi isolated from cryoconite holes of Svalbard. *Arctic. Polar Biol.* 35, 575–583.
- Singh, P., Tsuji, M., Singh, S.M., Roy, U., Hoshino, T., 2013. Taxonomic characterization, adaptation strategies and biotechnological potential of cryophilic yeasts from ice cores of Midre Lovénbreen glacier, Svalbard, Arctic. *Cryobiology* 66 (2), 167–217.
- Sterflinger, K., Tesei, D., Zakharova, K., 2012. Fungi in hot and cold deserts with particular reference to microcolonial fungi. *Fungal Ecol.* 5, 453–462.
- Swanson, K.S., Dowd, S.E., Suchodolski, J.S., Middelbos, T.S., Vester, B.M., Barry, K.A., Nelson, K.E., Torralba, M., Henrissat, B., Coutinho, P.M., Cann, I.K.O., White, B.A., Fahey, G.C., 2011. Phylogenetic and gene-centric metagenomics of the canine intestinal microbiome reveals similarities with humans and mice. *ISME J.* 5, 639–649.
- Tedersoo, L., et al., 2014. Global diversity and geography of soil fungi. *Science* 346 (6213), 1256688.
- Thomas-Hall, S.R., Turchetti, B., Buzzini, P., Branda, E., Boekhout, T., Theelen, B., Watson, K., 2010. Cold-adapted yeasts from Antarctica and the Italian Alps—description of three novel species: *Mrakia robertii* sp. nov., *Mrakia blollopis* sp. nov. and *Mrakia niccombisii* sp. nov. *Extremophiles* 14, 47–59.
- Turchetti, B., Buzzini, P., Goretti, M., Branda, E., Diolaiuti, G., D'Agata, C., Smiraglia, C., Vaughan-Martini, A., 2008. Psychrophilic yeasts in glacial environments of Alpine glaciers. *FEMS Microbiol. Ecol.* 63, 73–83.
- Turchetti, B., Thomas Hall, S.R., Connell, L.B., Branda, E., Buzzini, P., Theelen, B., Müller, W.H., Boekhout, T., 2011. Psychrophilic yeasts from Antarctica and European glaciers: description of *Glaciozyma* gen. nov., *Glaciozyma martinii* sp. nov. and *Glaciozyma watsonii* sp. nov. *Extremophiles* 15, 573.
- Turchetti, B., Goretti, M., Branda, E., Diolaiuti, G., D'Agata, C., Smiraglia, C., Onofri, A., Buzzini, P., 2013. Influence of abiotic variables on culturable yeast diversity in two distinct Alpine glaciers. *FEMS Microbiol. Ecol.* 86, 327–340.
- Uetake, J., Kohshima, S., Nakazawa, F., Takeuchi, N., Fujita, K., Miyake, T., Narita, H., Aizen, V., Nakawo, M., 2011. Evidence for propagation of cold-adapted yeast in an ice core from a Siberian Altai glacier. *J. Geophys. Res. Biogeosci.* 116 (G1).
- Vaz, A.B., Rosa, L.H., Vieira, M.L., de Garcia, V., Brandão, L.R., Teixeira, L.C., Moliné, M., Libkind, D., van Broock, M., Rosa, C.A., 2011. The diversity, extracellular enzymatic activities and photoprotective compounds of yeasts isolated in Antarctica. *Braz. J. Microbiol.* 42, 937–947.
- Wang, Q.M., Yurkov, A.M., Göker, M., Lumbsch, H.T., Leavitt, S.D., Groenewald, M., Theelen, B., Liu, X., Boekhout, T., Bai, F.Y., 2015. Phylogenetic classification of yeasts and related taxa within Pucciniomycotina. *Stud. Mycol.* 81, 149–189.
- Wolfram, E., Salvador, J., Orte, F., D'Elia, R., Quel, E., 2012. Systematic ozone and solar UV measurements in the observatorio atmosférico de la Patagonia Austral, Argentina. *Revista Boliviana de Física* 20 (20), 13–15.
- Zalar, P., Gunde-Cimerman, N., 2014. Cold-adapted yeasts in Arctic habitats. In: Buzzini, P., Margolin, R. (Eds.), *Cold-adapted Yeast, Biodiversity, Adaptation Strategies and Biotechnological Significance*, first ed. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp. 49–74.
- Zhang, T., Wang, N.F., Zhang, Y.Q., Liu, H.Y., Yu, L.Y., 2015. Diversity and distribution of fungal communities in the marine sediments of Kongsfjorden, Svalbard (High Arctic). *Sci. Rep.* 5, 14524.