

Tesis Doctoral

Las thraustochytriales (labyrinthulomycetes, heterokonta): caracterización de su biodiversidad en humedales salinos de la Argentina mediante un enfoque multidisciplinario y diseño de un bioproceso para la producción de ácidos grasos omega 3

Rosa, Silvina Mariana

2010

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Rosa, Silvina Mariana. (2010). Las thraustochytriales (labyrinthulomycetes, heterokonta): caracterización de su biodiversidad en humedales salinos de la Argentina mediante un enfoque multidisciplinario y diseño de un bioproceso para la producción de ácidos grasos omega 3. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Rosa, Silvina Mariana. "Las thraustochytriales (labyrinthulomycetes, heterokonta): caracterización de su biodiversidad en humedales salinos de la Argentina mediante un enfoque multidisciplinario y diseño de un bioproceso para la producción de ácidos grasos omega 3". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2010.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental

**LAS THRAUSTOCHYTRIALES (LABYRINTHULOMYCETES,
HETEROKONTA): CARACTERIZACIÓN DE SU BIODIVERSIDAD
EN HUMEDALES SALINOS DE LA ARGENTINA MEDIANTE UN
ENFOQUE MULTIDISCIPLINARIO Y DISEÑO DE UN BIOPROCESO
PARA LA PRODUCCIÓN DE ÁCIDOS GRASOS OMEGA 3**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de
Buenos Aires en el área: **CIENCIAS BIOLÓGICAS**

Silvina Mariana Rosa

Director de tesis: Dr. Miguel Ángel Galvagno

Director Asistente: Dr. Carlos Guillermo Vélez

Consejeros de estudios: Dra. Visitación Conforti / Dr. Daniel Cabral

Lugares de trabajo: Instituto de Investigaciones Biotecnológicas (IIB-INTECH),
CONICET –UNSAM.

Laboratorio de Ficología y Cultivo Experimental de Microalgas.
DBBE, FCEN, UBA.

Buenos Aires, 2010

**LAS THRAUSTOCHYTRIALES (LABYRINTHULOMYCETES,
HETEROKONTA): CARACTERIZACIÓN DE SU BIODIVERSIDAD EN
HUMEDALES SALINOS DE LA ARGENTINA MEDIANTE UN ENFOQUE
MULTIDISCIPLINARIO Y DISEÑO DE UN BIOPROCESO PARA LA
PRODUCCIÓN DE ÁCIDOS GRASOS OMEGA 3**

RESUMEN

Se obtuvieron más de 140 cepas de traustoquitriales de muestras recolectadas en una amplia variedad de humedales salinos argentinos a partir del mejoramiento de la metodología de aislamiento, que incluyó la formulación de dos nuevos medios de cultivo. Se estudiaron los caracteres taxonómicos tradicionales (rasgos morfológicos observados en cultivos en agua y cebos) de las cepas así como la morfología de las colonias, los requerimientos para su cultivo, el perfil de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) y la secuencia del gen ARNr 18S. El reconocimiento de grupos monofiléticos que incluyeron a los aislamientos y a otras traustoquitriales previamente estudiadas permitió la identificación en el nivel genérico de la mayoría de las nuevas cepas en base a los criterios recientemente propuestos y dio elementos para proponer que algunas de ellas serían nuevas especies. Se observó también la morfología a nivel ultraestructural en cepas identificadas como representantes de los taxones más abundantes (*Ulkenia visurgensis*, *Schizochytrium* sp., *Thraustochytrium striatum*, *T. kinnei* y *T. aureum*); esto permitió obtener mayor detalle sobre la formación de estructuras reproductivas. Los estudios de producción de PUFAs omega 3 se realizaron con la cepa modelo *Aurantochytrium limacinum* SR21. Se diseñó un bioproceso en dos etapas, optimizándose las condiciones para la obtención de biomasa (primera fase) mediante una combinación de métodos estadísticos (Diseños Experimentales Estadísticos y Redes Neuronales Artificiales, entre otros). La utilización de esta biomasa en una segunda fase de producción permitió alcanzar una productividad máxima de 3.7 g de ácido docosahexaenoico l⁻¹ d⁻¹ en un biorreactor de 3,5 l.

Palabras clave: traustoquitriales, humedales salinos argentinos, aislamiento y cultivo, caracterización taxonómica, morfología, ultraestructura, filogenia molecular, ácidos grasos poliinsaturados, producción de ácidos grasos omega 3

**THRAUSTOCHYTRIDS (LABYRINTHULOMYCETES, HETEROKONTA):
CHARACTERIZATION OF THEIR BIODIVERSITY IN ARGENTINIAN
SALINE WETLANDS BY A MULTIDISCIPLINARY APPROACH AND
BIOPROCESS DESIGN FOR OMEGA 3 FATTY ACIDS PRODUCTION**

ABSTRACT

More than 140 thraustochytrid strains were obtained from samples collected in Argentinean saline wetlands, once isolation methodologies were improved, including the formulation of two new culture media. Traditional taxonomic characteristics (morphological features in pollen seawater cultures) of strains were studied as well as other alternative characters (colony morphology, culture requirements, polyunsaturated fatty acids composition and 18SrRNA gene sequence). The finding of monophyletic groups including local isolates and other previously studied thraustochytrids allowed to identify most of new strains at genus level (according to new taxonomical rearrangements) and supported the proposal that several of them would be new species. Morphology at ultrastructural level of isolates recognized as representatives of the most abundant taxons (*Ulkenia visurgensis*, *Schizochytrium* sp., *Thraustochytrium striatum*, *T. kinnei* and *T. aureum*) gave more details about reproductive structures development. Omega 3 fatty acids production studies were carried out with the model strain *Aurantiochytrium limacinum* SR21. A two-stage bioprocess was designed, and conditions for biomass propagation (first stage) were optimized by a combination of statistical methods (Statistical Experimental Designs and Artificial Neural Networks, among others). Obtained biomass was used in a second production stage, reaching a maximal productivity of 3.7 g docosahexaenoic acid l⁻¹ d⁻¹ in a 3.5 l biorreactor.

Key words: thraustochytrids, Argentinean saline wetlands, isolation and culture, taxonomic characterization, morphology, ultrastructure, molecular phylogeny, polyunsaturated fatty acids, production of omega 3 fatty acids

AGRADECIMIENTOS

Quisiera expresar mi agradecimiento a todas aquellas personas que hicieron que este trabajo fuera posible. El carácter multidisciplinario de esta tesis hizo imprescindible la colaboración de muchos especialistas y técnicos, que mencionaré brevemente. Por otro lado me ha dado la posibilidad de conocer a personas increíbles que no sólo han contribuido a mi formación científica sino que me han enriquecido enormemente en el aspecto personal.

En primer lugar y principalmente a mis directores, Dres. Miguel Ángel Galvagno y Carlos Vélez, por haber aceptado aventurarnos en un tema completamente nuevo, con más interrogantes que respuestas, y por haberme acompañado, apoyado y formado durante la búsqueda de estas respuestas. Por compartir sus conocimientos conmigo y por darme las herramientas para iniciarme en la labor científica.

Al Instituto de Investigaciones Biotecnológicas, al PRHIDEB y al Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental por permitirme utilizar sus instalaciones y equipamiento. A todo el personal científico y técnico, cuyas tareas han sido de suma contribución para poder realizar este trabajo. Muy especialmente a Andrea Romero, Silvia López, Susana Pereira, Leopoldo Ianonne, así como a Fernanda Peri, Teresa, Nelly, Federico, Miguel Flores, Néstor y Mirna.

Al CONICET por financiar la mayor parte del desarrollo de este trabajo. A las instituciones que me dieron la posibilidad de participar en cursos y congresos en el exterior: ASLO, CABBIO y SBPZ.

A mis consejeros de estudio, Dr. Daniel Cabral y Dra. Visitación Conforti, por su guía y apoyo. A los docentes de la Universidad que me dieron las herramientas teóricas necesarias para desarrollar este trabajo. Entre otros, quisiera a mencionar a José Dadón, Viviana Confalonieri, Susana Martínez, Andrea Romero, Nancy López, Julia Petinari y Gandhi Baptista.

A mis compañeros de laboratorio, los actuales y los que han estado anteriormente, por haber compartido esta parte de mi camino científico. A Ángela, Ceci, Teresita, Mewy, Claudia, Romi y las chicas más nuevas del laboratorio de Ficología. A Pablo y Flor, por su incondicional apoyo y sus sabios consejos. A Paulita, por compartir el entusiasmo en el estudio de las traustogitriales y por colaborar conmigo en todas las tareas involucradas en él. También a Ezequiel, Patricia, Diana y Maite.

Al laboratorio de la Dra. Martha Powell, por abrirme sus puertas, por permitirme introducirme en la microscopia electrónica y en la manipulación de ADN, y por la bibliografía aportada. Muy especialmente a Peter Letcher, por generar esta posibilidad, por haberme acompañado durante este aprendizaje y por su apoyo incondicional, invaluable en los momentos más difíciles.

Al Dr. Marcelo Soria por sus análisis estadísticos, su paciencia para explicármelos y por su participación en el diseño de estos experimentos.

A Isabel Farias, por la realización de los preparados para observación mediante microscopia electrónica y a Natalio De Vincenzo, por el manejo del microscopio.

A Enrique Rost y los miembros de su laboratorio, por las precisas mediciones de PUFAs. A Rubén Fernández por las determinaciones de DHA, y a Cristina Matulewicz y Cecilia Rodríguez por los primeros intentos para hacerlo.

A todos los miembros del laboratorio del Dr. Daniel Sánchez, por brindarme sus equipos, reactivos y conocimientos para obtener las secuencias del ARNr 18S. Muy especialmente a Georgina, María, Valeria, Lara y Nicolás.

A mis compañeros y amigos de docencia, y del Instituto, especialmente a Fabiana, que me apoyaron para que pudiera concluir este trabajo.

Finalmente, a quienes me han brindado su apoyo, su afecto y han compartido conmigo las alegrías y los fracasos de este trabajo. En primer lugar a mi familia, particularmente a mi hermana, mi mamá, y mi papá y mi tía Gra, que hubieran estado felices de compartir este momento conmigo. A mis amigos, Vale, Gabi, Male, Caro, Toli, Julio, Nati y Martín.

INDICE

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN GENERAL Y OBJETIVOS

1- INTRODUCCIÓN	
1.1- Labyrinthulomycetes: características generales	1
1.2- Ubicación taxonómica de los labirintulomicetes y de las traustoguitrales	3
1.3- Requerimientos fisiológicos de las traustoguitrales	4
1.4- Distribución y rol ecológico de las traustoguitrales	7
1.5- Los humedales salinos de la Argentina	8
1.6- Ácidos grasos poliinsaturados: nomenclatura y vías biosintéticas	10
1.7- Importancia biotecnológica de las traustoguitrales: producción de ácidos grasos omega 3	12
2- OBJETIVOS	14

CAPÍTULO II: AISLAMIENTO Y ESTUDIOS DE CULTIVO DE TRAUSTOGUITRALES DE HUMEDALES SALINOS DE ARGENTINA APLICANDO PROCEDIMIENTOS CONVENCIONALES Y ALTERNATIVOS

2.1- Resumen	17
2.2- Introducción	17
2.2.1-El estudio de la diversidad microbiana: técnicas de cultivo & herramientas moleculares	17
2.2.2- Aislamiento de Thraustochytriales: metodología y medios de cultivo	19
2.2.3- Objetivos	22
2.3- Materiales y Métodos	23
2.3.1- Recolección de muestras y descripción de los ambientes estudiados	23
2.3.1.1- Litoral marítimo patagónico	23
2.3.1.2- Caleta Potter, Antártida Argentina	26
2.3.1.3- Albufera Mar Chiquita	26
2.3.1.4- Marisma de Punta Rasa, Bahía de Samborombón	27
2.3.1.5- Estuario de Bahía Blanca	28
2.3.1.6- Marisma de San Antonio Oeste, Bahía de San Antonio	29
2.3.1.7- Laguna La Salada	30
2.3.1.8- Laguna Vilama	30
2.3.2- Aislamiento y medios de cultivo	31
2.3.3- Estudios en cultivo	32
2.3.3.1- Efecto de la composición del medio de cultivo	32
2.3.3.2- Efecto de la concentración de agar	33

2.3.3.3- Obtención de biomasa	34
2.3.4- Análisis estadístico	34
2.4- Resultados	34
2.4.1- Aislamiento de cepas de traustoguitrales de la Argentina	34
2.4.1.1- Aislamientos de la marisma de Punta Rasa y laguna continental La Salada (Buenos Aires, 2004)	35
2.4.1.2- Aislamientos del litoral marítimo antártico (Caleta de Potter, Isla 25 de Mayo, 2005)	35
2.4.1.3- Aislamientos de la albufera Mar Chiquita (Buenos Aires, 2005)	36
2.4.1.4- Aislamientos del litoral marítimo y estuarios de la Patagonia, y sur de la provincia de Buenos Aires (2006-7)	37
2.4.1.5- Aislamientos de la laguna hipersalina Vilama (Jujuy) y del estuario de Bahía Blanca (2008)	39
2.4.1.6- Aislamientos del litoral marítimo de Santa Cruz (2009)	40
2.4.2- Composición del medio y crecimiento de las cepas	40
2.4.3- Efecto de la concentración de agar y de la actividad agua sobre el crecimiento	41
2.4.4- Selección de las condiciones de cultivo de las cepas aisladas	42
2.5- Discusión	43
2.5.1- Presencia de traustoguitrales en humedales de la Argentina	43
2.5.2- Mejoramiento de la metodología de aislamiento	46
2.5.3- Estudios en Cultivo	49
2.6- Conclusiones	51

CAPITULO III: CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE LA BIODIVERSIDAD DE TRAUSTOGUITRALES DE ARGENTINA

3.1- Resumen	54
3.2- Introducción	54
3.2.1- Géneros tradicionales de la familia Thraustochytriaceae	55
3.2.2- Géneros excluidos	57
3.2.3- Limitaciones de la taxonomía tradicional	58
3.2.4- Objetivos	60
3.3- Materiales y Métodos	60
3.4- Resultados	61
3.5- Discusión	71
3.5.1- Valor taxonómico de los caracteres morfológicos	71
3.5.2- Morfología de colonia y perfil de crecimiento en medio de cultivo como herramientas complementarias	77
3.5.3- Distribución de traustoguitrales en los humedales argentinos	79
3.6- Conclusiones	82

CAPITULO IV: CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA Y MOLECULAR DE LOS AISLAMIENTOS

4.1- Resumen	85
4.2- Introducción	85
4.2.1- Nuevos criterios para la identificación de traustoguitrales	85
4.2.2- Objetivos	87
4.3- Materiales y Métodos	88
4.3.1- Cepas seleccionadas y preparación de muestras	88
4.3.2- Determinación de ácidos grasos (FAs)	88
4.3.3- Secuenciación del gen ARNr 18S	89
4.3.4- Análisis filogenético	90
4.4- Resultados	90
4.4.1- Composición de FAs	90
4.4.2- Caracterización bioquímica: perfil de PUFA	91
4.4.3- Filogenia molecular	93
4.5- Discusión	95
4.5.1- Caracterización de las cepas de <i>Ulkenia</i> sensu lato	95
4.5.2- Caracterización de las cepas de <i>Schizochytrium</i> sensu lato	97
4.5.3- Caracterización de las cepas de <i>Thraustochytrium</i>	98
4.5.4- El aporte de los distintos caracteres a la sistemática de las traustoguitrales	100
4.6- Conclusiones	103

CAPITULO V: ULTRAESTRUCTURA DE AISLAMIENTOS SELECCIONADOS

5.1- Resumen	105
5.2- Introducción	105
5.2.1- La ultraestructura como herramienta	105
5.2.2- Ultraestructura de las traustoguitrales	106
5.2.3- Objetivos	109
5.3- Materiales y Métodos	110
5.3.1- Cepas estudiadas	110
5.3.2- Microscopía electrónica de transmisión	110
5.3.3- Microscopía electrónica de barrido	111
5.4- Resultados	111
5.4.1- Microscopía electrónica de transmisión	111
5.4.2- Microscopía electrónica de barrido	113

5.5- Discusión	114
5.5.1- Estructuras típicas de las traustoguitrias	114
5.5.2- Estructuras particulares de las cepas examinadas	115
5.5.3- Aporte de la ultraestructura al estudio de la biología de las traustoguitrias	117
5.6- Conclusiones	118

CAPITULO VI: DISEÑO DE UN BIOPROCESO PARA LA OPTIMIZACION DE LA PRODUCCIÓN POR FERMENTACIÓN DE ÁCIDO DOCOSAHEXAENOICO UTILIZANDO LA CEPA *AURANTIOCHYTRIUM LIMACINUM* SR21

6.1- Resumen	120
6.2- Introducción	120
6.2.1- Mercado de los PUFAs	121
6.2.2- Fuentes tradicionales de obtención de PUFAs	122
6.2.3- Aceites microbianos (SCO)	123
6.2.4- Producción de PUFAs empleando traustoguitrias	126
6.2.5- Bioquímica de la acumulación de PUFAs	127
6.2.6- Metodologías estadísticas para la optimización de bioprocesos	129
6.2.7- Objetivos	131
6.3- Materiales y Métodos	132
6.3.1- Cepa y mantenimiento	132
6.3.2- DOEs, ANN, GA y análisis de datos	132
6.3.3- Condiciones de cultivo	134
6.3.4- Determinaciones analíticas	135
6.4- Resultados	136
6.4.1- Cinética de crecimiento en medios con diferente relación C:N	136
6.4.2- Diseños de selección	137
6.4.3- Análisis de datos para el proceso de optimización	139
6.4.4- Validación	140
6.4.5- Condiciones para la producción de DHA mediante un bioproceso de dos etapas	141
6.5- Discusión	142
6.6- Conclusiones	145

CAPITULO VII: CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

7.1- Prefacio	147
7.2- Conclusiones	147
7.3- Perspectivas	153

TABLAS	156
---------------	-----

FIGURAS	182
----------------	-----

APÉNDICE

1. Publicaciones	205
2. Tablas	206
3. Figuras	211

BIBLIOGRAFIA	214
---------------------	-----

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN GENERAL Y OBJETIVOS

En este primer capítulo se presenta la información introductoria general, básica y necesaria para poner en contexto las distintas aproximaciones al estudio de las traustoguitriales que se abordaron en este trabajo de tesis, comenzando por sus características biológicas, su posición en el ámbito de los seres vivos, sus requerimientos fisiológicos y su distribución y ecología. Luego se expone una descripción de los ambientes que habitan (los humedales salinos), mencionando las particularidades de los mismos en la Argentina. Finalmente se incluye una reseña sobre los ácidos grasos poliinsaturados, con énfasis en los omega 3, cuya producción constituye la más interesante faceta biotecnológica de estos organismos. A partir de dicha información general se proponen los objetivos de este trabajo: aislamiento, cultivo, estudio de su morfología y desarrollo, de su taxonomía tradicional (necesaria para apreciar su biodiversidad y distribución en ambientes argentinos), de las relaciones filogenéticas de las cepas obtenidas, y estudios de producción de ácidos grasos omega 3.

1- INTRODUCCIÓN

1.1- Labyrinthulomycetes: características generales

Los labirintulomicetes son microorganismos heterotróficos, absorptivos, comunes en la microflora marina y estuarial, que también pueden encontrarse en ambientes salinos continentales (Johnson & Sparrow 1961, Amon 1978). Considerados tradicionalmente hongos primitivos (Sparrow 1960), han mostrado estar emparentados con las algas heterocontas (diatomeas, feofíceas, etc.) y los oomicetes (Cavalier-Smith et al. 1994, Kirk et al. 2001), con los que comparten características ultraestructurales como la presencia de crestas mitocondriales tubulares, el aparato de Golgi formado por múltiples cisternas achatadas y la acumulación de β 1-3 y β 1-6 glucanos como sustancias de reserva (Alexopoulos et al. 1996). Otro rasgo distintivo de estos organismos es la producción de zoosporas heterocontas, es decir, células móviles con un flagelo anterior más desarrollado, provisto de pelos tubulares tripartitos, y otro posterior liso (Lee 1999).

Los labirintulomicetes presentan un atributo particular: el desarrollo de una distintiva y característica red ectoplasmática producida a partir de organelas especializadas denominadas “sagenogenos” o “botrosomas” (fig. 1.1, Perkins 1972). Esta red ectoplasmática adhiere las células a las superficies y contiene enzimas hidrolíticas que son liberadas al medio para degradar la materia orgánica y absorber los compuestos resultantes (Coleman & Vestal 1987). La pared celular está formada por escamas sin ornamentación que se sintetizan y son secretadas por el aparato de Golgi, depositándose y acoplándose adyacentes a la cara externa de la membrana celular. Su composición química es inusual, habiéndose encontrado L-galactosa como el carbohidrato mayoritario en dos especies estudiadas (*Schizochytrium aggregatum* y *Thraustochytrium motivum*) (Darley et al. 1973), galactanos sulfatados en tres especies de *Thraustochytrium* (Chamberlain 1980) y fucosa en especies de *Labyrinthuloides* (Bahnweg & Jäckle 1986). El resto de las organelas presentes en el citoplasma son las típicas de una célula eucariota (fig. 1.1). Un tratamiento más detallado de los rasgos ultraestructurales de estos organismos se describe en el capítulo V.

La reproducción es básicamente asexual (fig. 1.2), e involucra la formación de zoosporas a partir del clivaje progresivo de la célula vegetativa (devenida en zoosporangio). Las zoosporas liberadas nadan hasta encontrar un sustrato adecuado, sobre el que se fijan, y se diferencian en una célula vegetativa la cual madurará en un nuevo zoosporangio. En algunos casos, las células una vez fijadas al sustrato pueden también dividirse vegetativamente dando origen a agregados celulares (Porter 1990). La única evidencia que indicaría la ocurrencia de reproducción sexual en estos organismos es el registro de una típica profase meiotica en un aislamiento no identificado de *Labyrinthula* (Perkins & Amon 1969).

Estudios recientes de filogenia molecular sugieren que los labirintulomicetes comprenden tres clados genéticamente distintivos, correspondientes a tres grupos morfológicos (fig. 1.3): labirintulales, aplanoquitriales y traustoquitriales (Leander y Porter 2000 y 2001, Leander et al. 2004). Las labirintulales poseen células con forma de huso, las cuales se deslizan dentro de la red ectoplasmática que las envuelve completamente. Traustoquitriales y aplanoquitriales, por su parte, poseen esporangios globosos unidos al sustrato mediante los delicados filamentos ramificados de la red ectoplasmática (que no los rodea completamente), y se diferencian entre sí en que los

primeros forman zoosporas, y los segundos aplanosporas que se desplazan deslizándose sobre el sustrato.

1.2- Ubicación taxonómica de los labirintulomicetes y de las traustoquitriales

La taxonomía de los labirintulomicetes ha sido históricamente confusa, probablemente debido a que se los ha interpretado en el contexto de las clasificaciones botánicas y zoológicas tradicionales (Dick 2001). Considerados en principio como hongos zoospóricos (Dick 1973) o protistas (Olive 1975), su identificación taxonómica se basó tradicionalmente en los atributos morfológicos, los cuales no sólo presentan numerosos inconvenientes en cuanto a su variabilidad bajo diferentes condiciones nutricionales (Gaertner 1972) sino que además en ciertos casos carecen de correlación con los linajes filogenéticos, según se desprende de los estudios de filogenia molecular (Honda et al. 1999). Por estos motivos, la determinación taxonómica de los labirintulomicetes es conflictiva y pobremente resuelta.

La revisión taxonómica más reciente en base a caracteres morfológicos ha sido realizada por Dick (2001). Trabajos posteriores han sugerido modificaciones principalmente en el nivel genérico, basándose en la combinación de estudios morfológicos, bioquímicos (perfiles de ácidos grasos poliinsaturados y carotenoides), y de filogenia molecular (Yokoyama & Honda 2007, Yokoyama et al. 2007, Leander et al. 2004). Como resultado de estas contribuciones se ha propuesto la creación de cinco nuevos géneros y la enmienda de otros cuatro. En la Introducción de los capítulos III y IV se provee una síntesis detallada de cada uno de estos aportes. En este contexto, y basándose en los trabajos previamente mencionados, se presenta a continuación, y se adopta en este trabajo, la siguiente clasificación de los labirintulomicetes (se indica entre paréntesis el número de especies de cada género):

Reino: Straminipila

Phylum: Heterokonta

Clase: Labyrinthulomycetes

Orden: Labyrinthulales

Familia: Labyrinthulaceae

Géneros: *Labyrinthula* (12 especies)

Orden: Aplanochytriales

Familia: Aplanochytriaceae

Géneros: *Aplanochytrium* (8 especies)

Orden: Thraustochytriales

Familia: Thraustochytriaceae

Géneros: *Thraustochytrium* (16 especies)

Schizochytrium (sensu stricto, 1 especie)

Aurantiochytrium (2 especies)

Oblongichytrium (3 especies)

Ulkenia (sensu stricto, 3 especies)

Botryochytrium (1 especie)

Parietichytrium (1 especie)

Sicyoidochytrium (1 especie)

Japonochytrium (1 especie)

Althornia (1 especie)

Los géneros indicados como “sensu stricto” han sufrido escisiones recientemente. Debido a que constituyen taxones clásicos dentro de las traustoquitriales y a lo reciente de esta modificación taxonómica, en este trabajo también se hace referencia a los mismos en sentido amplio (“sensu lato”), es decir, al género antes de que fuera enmendado.

1.3- Requerimientos fisiológicos de las traustoquitriales

Comenzando por las condiciones fisicoquímicas, estos microorganismos no requieren de luz para crecer, aunque hay algunos casos puntuales en los que se ha mostrado que dicho factor puede tener un efecto tanto estimulante (Goldstein 1963c, Singh & Ward 1997a) como inhibitorio (Alderman y Jones 1971). Si bien las

traustoguitriales han sido reconocidas como aerobios estrictos (Porter 1990), hay referencias en la literatura que mencionan la existencia de algunos representantes anaerobios (Goldstein 1973, Luo et al. 2005, Stoeck et al. 2003). Respecto a la temperatura óptima de crecimiento, para la mayoría de las traustoguitriales de regiones templadas es de 25°C (Jones 1976). El rango de los valores óptimos es muy variable según las especies, ubicándose entre 25-30°C para las cepas utilizadas con fines de producción (Perveen et al. 2006, Burja et al. 2006, Yokochi et al. 1998). Los aislamientos de regiones antárticas y subantárticas exhiben óptimos más bajos, generalmente entre 0-9°C y no proliferan a temperaturas superiores a 17°C (Bahnweg & Sparrow 1974). El rango de tolerancia al pH es amplio y generalmente abarca de 4 a 9 unidades, aunque algunas especies son más sensibles a los cambios de este factor (Fan et al. 2002).

Las traustoguitriales son primariamente marinas (Raghukumar 2004). Vishniac (1960), en un estudio realizado con 49 cepas, concluyó que los niveles de NaCl necesarios por estos microorganismos para que su crecimiento sea máximo son los característicos del mar. La salinidad del agua de mar promedio es de 35 g l⁻¹ o ups (unidades prácticas de salinidad), manteniéndose constante la proporción de sus componentes en los distintos ambientes del mundo (principio de Forchhammer, Garrison 2008). La composición promedio de la sal de mar se presenta en la tabla 1.1, siendo su componente principal el NaCl (Millero 1996). El rango de tolerancia a la salinidad es variable según las especies, pero en general es amplio (5 a 35 g l⁻¹). Si bien algunas cepas pueden prosperar a salinidades tan bajas como 2 g l⁻¹ (Burja et al. 2006), los mejores valores de crecimiento se registraron entre los niveles de 15 a 35 g l⁻¹ (Fan et al. 2002), que corresponden al 50-100 % de la concentración del agua de mar. Los aislamientos provenientes de manglares, donde hay gran fluctuación de los parámetros fisicoquímicos, muestran niveles óptimos de salinidad más bajos y en general una tolerancia más amplia (Raghukumar 2008).

En lo concerniente a los requerimientos nutricionales, los monosacáridos (glucosa, fructosa, xilosa), los ácidos orgánicos (ácido málico, ácido fumárico, ácido pirúvico) y el glicerol son la fuente de carbono preferida por las traustoguitriales (Burja et al. 2006). Contrariamente, los disacáridos y polisacáridos producen bajos niveles de crecimiento, aunque algunas cepas pueden prosperar con celobiosa, maltosa y almidón

soluble (Goldstein 1963c, Bajpai et al. 1991a). Entre la variedad de compuestos aprovechables por las traustquitriales se incluyen el glicerol crudo como el proveniente de la industria del biodiesel (Chi et al. 2007) y los hidrocarburos (Raikar et al. 2001), motivo que hace aún más interesante a estos microorganismos como potenciales biorremediadores.

Muy pocas traustquitriales pueden emplear fuentes inorgánicas de nitrógeno como el amonio o el nitrato (Barclay 1994). Entre las fuentes orgánicas, la mayor parte de las cepas estudiadas presentaron niveles óptimos de crecimiento con glutamato, que podría ser aprovechado también como fuente de carbono (Iida et al. 1996, Raghukumar 2008). El hidrolizado de gelatina también ha sido empleado con buenos rendimientos, aunque presenta bajas concentraciones de metionina y aminoácidos aromáticos (Vishniac 1956). Por su parte, la urea no pudo ser metabolizada por ninguna de las cepas sobre las que hay referencias (Goldstein 1963a, Iida et al. 1996). Para los estudios de producción, las peptonas son las fuentes más difundidas (Raghukumar 2008).

La disponibilidad de fósforo afecta el crecimiento de las traustquitriales. Taoka y colaboradores (2008) mostraron que la adición de KH_2PO_4 al medio de cultivo basal incrementó significativamente el número de aislamientos obtenidos a partir de muestras de agua de Japón. Por su parte, Bongiorno y Dini (2002) encontraron que la densidad de traustquitriales en la columna de agua de las costas del Mediterráneo mostraba una fuerte correlación positiva con la concentración de fósforo. El efecto de este elemento ha sido estudiado en detalle en una cepa de *T. roseum* (Siegenthaler et al. 1967), para la que se observó que el ingreso de fosfato fue máximo entre valores de pH de 7,5 y 7,8. Finalmente, cabe mencionar que algunas, pero no todas las traustquitriales tienen un requerimiento obligado de una o más vitaminas hidrosolubles del grupo B (Vishniac 1956, Adair y Vishniac 1958, Goldstein 1963c, Raghukumar 2008). Para una información más detallada sobre los requerimientos fisiológicos de estos microorganismos pueden consultarse las revisiones de Goldstein (1973) y Raghukumar (2008).

1-4- Distribución y rol ecológico de las traustocitriciales

La presencia de traustocitriciales ha sido registrada a escala global y en una enorme variedad de hábitats (Raghukumar 2004). Las mayores densidades poblacionales se detectaron en sedimentos de zonas costeras y estuariales (en el orden de 10^5 células l^{-1} , Raghukumar & Gaertner 1980, Ulken 1986), aunque también están presentes en menor concentración en la columna de agua nerítica (10^3 células l^{-1} , Kimura et al. 1999) y oceánica (10^2 - 10^3 células l^{-1} , Raghukumar 1985), así como en el bentos de las profundidades marinas (Scheckenbach et al. 2010). En general se hallan asociadas a material vegetal en descomposición, especialmente algas y hojas de mangles, y probablemente cumplan una importante función como saprobios, en virtud de su condición de heterótrofos absorptivos, mediante la producción de enzimas extracelulares (celulasas, amilasas y proteasas) (Raghukumar 2002). También pueden encontrarse como componentes de los films microbianos marinos (Raghukumar et al. 2000) y en precipitados fecales de tunicados, los cuales constituyen una importante fuente de materia orgánica particulada en el océano y son fundamentales en el transporte de nutrientes a las profundidades (Raghukumar & Raghukumar 1998). Algunas pocas especies pueden causar enfermedades en animales, particularmente en moluscos (Polglase 1980, McLean & Porter 1982), y otras podrían establecer relaciones no parasíticas (mutualistas y comensalistas), tanto con invertebrados (Ellis & Bishop 1989) como con algas (Sathe-Pathak et al. 1993).

El importante rol ecológico de las traustocitriciales en la dinámica de la descomposición de materia orgánica es avalado por crecientes evidencias (Raghukumar 2004), especialmente si se tiene en cuenta su abundancia relativa respecto a otros microorganismos degradadores. Por ejemplo, en la columna de agua marina pueden alcanzar una biomasa comparable a la de las bacterias (0,41 a 7,44 $pg\ C\ l^{-1}$, 0,039 a 0,71 $pg\ N\ l^{-1}$) mientras que la presencia de hongos filamentosos resulta escasa (Kimura et al. 1999). Esta función, redundaría en el mejoramiento de la calidad nutricional de la materia orgánica muerta (especialmente la recalcitrante, como celulosa y quitina) por aumento de su contenido proteico, resultando un factor particularmente importante para la nutrición de otros organismos detritívoros (v.g. animales) (Mann 1988). En tal sentido, las traustocitriciales podrían ser una importante fuente no sólo de C y N, sino

también de ácidos grasos poliinsaturados (Raghukumar 2004), compuestos que resultan esenciales para otros eslabones de la cadena trófica, desde microcrustáceos, pasando por peces y hasta mamíferos marinos (Harrison 1990).

1.5- Los humedales salinos de la Argentina

Habiéndose descrito brevemente el tipo de hábitat en que es frecuente el hallazgo de traustoquitriles, se presenta entonces una breve reseña de los ambientes argentinos en los que potencialmente podrían habitar estos organismos.

Existen muchas definiciones del término humedales, algunas basadas en criterios principalmente ecológicos y otras más orientadas a cuestiones vinculadas a su manejo. La Convención sobre los Humedales (Ramsar, Irán 1971) los define en forma amplia como: *"las extensiones de marismas, pantanos y turberas, o superficies cubiertas de agua, sean éstas de régimen natural o artificial, permanentes o temporales, estancadas o corrientes, dulces, salobres o saladas, incluidas las extensiones de agua marina cuya profundidad en marea baja no exceda de seis metros"*. En esta definición quedan incluidos todos los ambientes acuáticos continentales, los estuarios y la zona costera marina. Los grandes humedales son en su conjunto, uno de los bancos más importantes de biodiversidad, reclutamiento y productividad. Además desempeñan funciones tales como el control de inundaciones, reposición de aguas subterráneas, estabilización de costas, protección contra tormentas, retención y exportación de sedimentos y nutrientes, mitigación del cambio climático y depuración de las aguas (Málvarez 1999).

Se estima que cerca del 23% de la superficie de la República Argentina está ocupada por humedales (Kandus et al. 2008). La participación de nuestro país en la Convención sobre los Humedales se inició en el año 1991 a través de la sanción de la Ley 23.919, y actualmente hay 19 sitios nacionales incluidos en la Lista de Humedales de Importancia Internacional (denominados sitios RAMSAR), que totalizan una superficie de más de 50.000 km² (Secretaría de Ambiente y Desarrollo Sustentable de la Nación, <http://www.ambiente.gov.ar>). Se mencionan a continuación las principales características de los tres tipos de humedales salinos que están representados en el territorio argentino: las lagunas salinas continentales, los estuarios y el litoral marítimo.

Las lagunas salinas continentales son cuerpos de agua que pueden experimentar un amplio rango de restricciones dinámicas y energéticas. Las perturbaciones aparecen como episodios de alta salinidad y/o desecación que suceden con un grado de predictibilidad variable (Comín et al. 1991). Las comunidades biológicas que habitan en ellas varían de acuerdo con los cambios físicos y químicos del agua y de las fluctuaciones climáticas (Alcorlo 2004). En la Argentina, se presentan principalmente en las regiones pampeana (Complejo Laguna Salada Grande, la Cuenca de Chasicó y las Lagunas Encadenadas del Oeste) y en la Puna (Lagunas de Pozuelos, de Guayatayoc y complejo de Lagunas de Vilama en la Provincia de Jujuy, y Lagunas Grande, La Alumbra y Purulla, en la Provincia de Catamarca) (Canevari et al. 1998).

Un estuario puede definirse como un “cuerpo de de agua costero semicerrado con una conexión libre con el mar dentro del cual el agua de mar se diluye significativamente con el agua dulce proveniente del drenaje terrestre” (Pritchard 1967). Estos ecosistemas son cuerpos de agua someros y de volúmenes variables dependiendo de las condiciones locales climáticas e hidrológicas. Tienen temperaturas y salinidades variables, fondos predominantemente fangosos, alta turbidez y características topográficas y de superficie irregulares. La biodiversidad que los habita presenta un alto grado de adaptaciones a las fluctuantes condiciones ambientales y su origen es, confluyentemente, marino, dulceacuícola y terrestre (Yañez-Arancibia & Day 1982). Adicionalmente contribuyen en forma significativa a la productividad marina costera por la producción de detritus y como áreas de crianza. La mayoría de los estuarios incluye humedales intermareales: marismas (praderas de *Spartina* spp.) en zonas templadas y manglares en zonas tropicales (Spivak 1997).

Las costas templadas del Atlántico sudoccidental están caracterizadas por dos tipos de estuarios: estuarios de planicie costera y lagunas costeras (Ringuelet 1962). Las lagunas costeras, también conocidas como albuferas, son depresiones de la zona costera por debajo del promedio mayor de las mareas más altas, que tienen una comunicación con el mar permanente o efímera y están protegidas por algún tipo de barrera (Lankford 1977). Estos dos tipos de ambientes se encuentran representados dentro del territorio nacional. Pertenecen a la primera categoría los estuarios de Bahía de San Borombón, Bahía Blanca, San Antonio Oeste y aquellos que se ubican en las zonas de la

desembocadura de los ríos patagónicos. Por su parte, la albufera más importante del país es la laguna de Mar Chiquita (provincia de Buenos Aires).

La costa atlántica argentina es uno de los ecosistemas marítimos templados más ricos y de más alta producción del mundo, extendiéndose a lo largo de 4.497 km entre el Río de la Plata y el estrecho de Magallanes. Geológica y geomorfológicamente puede dividirse en dos áreas, una al norte y la otra al sur del Río Colorado, considerado el límite norte de la Patagonia. Las costas de la región pampeana son arenosas y bajas mientras que las de la región patagónica son rocosas y en general acantiladas. Las características oceanográficas que afectaron a la costa están marcadas por el comportamiento de las olas y las mareas. Al norte de los 42° S, el rango de mareas es de aproximadamente 2 m mientras que al sur de dicho paralelo, en el litoral patagónico, tanto la amplitud de la marea como de la altura de las olas van incrementándose, y en algunos lugares el rango de mareas supera los 10 m. De ahí que las costas bonaerenses estén dominadas por la acción de las olas, mientras que las patagónicas por la acción de las mareas (Cavalloto 2008).

Finalmente, el litoral marítimo del Sector Antártico Argentino es un área comprendida entre los meridianos 74° O y 25° O y el paralelo 60° S y el Polo Sur e incluye a la península antártica y varios archipiélagos (Islas Sándwich del Sur, Islas Orcadas del Sur, Islas Georgias del Sur e Islas Shetland del Sur). Las costas de la península antártica son muy accidentadas, abundando los fiordos, rías y bahías, tanto por la actividad erosiva glaciaria como por la presencia de vulcanismo activo (Armada Argentina, <http://www.ara.mil.ar>). Constituye una de las pocas áreas libres de hielo durante el verano (Bockheim & Hall 2002) y representa uno de los ecosistemas más productivos del planeta (Holdgate 1964).

1.6- Ácidos grasos poliinsaturados: nomenclatura y vías biosintéticas.

Los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) son cadenas carbonadas lineales de 18 o más átomos de carbono con dos o más dobles enlaces y un extremo carboxilo (COO⁻) terminal. Según la ubicación del primer doble enlace a partir del extremo metilo (CH₃),

en la posición 3, 6 o 9, pueden clasificarse en la familia omega 3, omega 6 u omega 9, respectivamente (fig. 1.4). La presencia de dobles enlaces en la estructura del ácido graso, referidas como insaturaciones, no permite la rotación de enlace e introduce una curva rígida en la cadena, impidiendo el empaquetamiento con otros ácidos grasos vecinos. Como consecuencia, los ácidos grasos insaturados tienen menores temperaturas de fusión que aquellos saturados con el mismo número de carbono, razón por la cual son líquidos a temperatura ambiente (Anderson & Wynn 2001)

La nomenclatura de los ácidos grasos puede parecer confusa debido a que un mismo compuesto puede recibir tres nombres diferentes: el común, el sistemático y la designación numérica. La tabla 1.2 muestra los tres tipos de nombres para los PUFAs omega 3 y 6 más comunes. En la nomenclatura sistemática los dobles enlaces se numeran desde el extremo COO⁻. Si bien este sistema es preciso, resulta poco práctico para aquellos que no están familiarizados con la bioquímica de los lípidos y en consecuencia su aplicación está poco difundida. La designación numérica tiene el beneficio de la simplicidad y además denota la estructura del compuesto, ya que antes de los dos puntos se indica el número de carbonos de la cadena y luego el número de insaturaciones, aclarando entre paréntesis la posición del primer doble enlace luego del prefijo “n” (u omega) (Anderson & Wynn 2001).

En los eucariotas los ácidos grasos son sintetizados en el citosol o en los cloroplastos mediante un complejo enzimático multiproteico denominado sintetasa de ácidos grasos (FAS) que presenta siete sitios activos. Este proceso culmina con la producción de ácido palmítico (16:0) a partir del cual a través una serie de elongaciones y desaturaciones sucesivas en el retículo endoplasmático liso, se sintetizan los PUFAs (Nelson & Cox 2000). Este mecanismo se ilustra en la figura 1.5. Los dobles enlaces son introducidos (siempre en la configuración *cis*) por enzimas llamadas desaturasas, que requieren el aporte de O₂ y NADPH. La posición y el orden en que se insertan los dobles enlaces son muy rigurosos: el primer doble enlace es insertado entre los carbonos 9 y 10 (desde el extremo COO⁻) por la $\Delta 9$ desaturasa y los siguientes se adicionan en forma consecutiva dejando un carbono saturado entre ellos mediante la acción de $\Delta 12$ y $\Delta 15$ desaturasas. De este modo se originan los precursores de las series n-9, n-6 y n-3 respectivamente, los cuales experimentan posteriores y sucesivas reacciones de desaturaciones y elongaciones para dar lugar a cada uno de los PUFAs de estas familias

(Radledge 2004). La conversión de PUFAs n-6 en n-3 para compuestos de 18 C tiene lugar en plantas y algunos microorganismos, mientras que para compuestos de 20 C sólo fue documentada en *Mortierella alpina* y en *Saprolegnia diclina* (Pereira et al. 2004). Los animales (incluido el hombre) son capaces de sintetizar ácidos grasos saturados y pueden llevar a cabo las desaturaciones y elongaciones posteriores, pero carecen de las $\Delta 12$ y $\Delta 15$ desaturasas, y por lo tanto los ácidos linoleico, 18:2(n-6), y α -linolenico, 18:3(n-6), resultan esenciales para su metabolismo (Anderson & Wynn 2001).

1.7- Importancia biotecnológica de las traustoguitriales: producción de ácidos grasos omega 3

Los efectos benéficos de los PUFAs sobre la salud humana han sido reconocidos por numerosos estudios e incluyen la prevención o tratamiento de una variedad de enfermedades como la arteriosclerosis (Mehta et al. 1987), trombosis (Norday & Hansen 1994), artritis (Kremer et al. 1985) y algunos tipos de cáncer (Braden & Carroll, 1986). Adicionalmente, el ácido docosahexaenoico (DHA) es esencial para el desarrollo del sistema nervioso en infantes (Lauritzen et al. 2001). Como el organismo humano carece de la habilidad para sintetizarlos *de novo*, estos compuestos o sus precursores de 18 C deben ser provistos en la dieta (Meyer et al. 1999). Sin embargo, las dietas de las sociedades occidentales resultan desbalanceadas respecto a las proporciones de PUFAs recomendadas, ya que contienen concentraciones de ácidos grasos omega 6 mucho más elevadas que de omega 3 (Mataix 2002). Por tal motivo, a partir de 1990, los gobiernos y las principales consultoras nutricionales y de la salud recomiendan la utilización de DHA y ácido araquidónico (ARA) como suplemento dietario, particularmente en fórmulas infantiles (Ward & Singh 2005).

El aceite de pescado ha sido la fuente comercial tradicional de ácidos grasos omega 3, pero presenta numerosos inconvenientes como su inestabilidad frente a la oxidación, olor y gusto poco agradables, variaciones geográficas y estacionales en la calidad (Varela et al. 1990), así como los altos costos que implica su purificación, y se espera que en el futuro sea insuficiente para satisfacer su demanda mundial creciente

(Tacon 1995). En consecuencia, y considerando además el incremento de la contaminación de los ambientes marinos, su producción en condiciones confinadas y controladas mediante el cultivo de microorganismos aparece como una fuente alternativa potencial de estos ácidos grasos, especialmente para el caso de productos de alta calidad constante (Ratledge 2004). Otras ventajas adicionales del aceite microbiano (también llamado SCO, Single Cell Oil) respecto al aceite de pescado incluyen la presencia de una mayor concentración de PUFAs (en general, de un tipo en particular y no una mezcla), una mayor estabilidad oxidativa (lo que facilita su almacenamiento) y la posibilidad de producirlo a partir de materias primas sustentables, por ejemplo glicerol crudo como fuente de C (Sijtsma & de Swaaf 2004).

Las traustochytriales se han establecido en los últimos años como una de las fuentes microbianas más prometedoras de PUFAs, dado su alta tasa de crecimiento, su alto rendimiento en biomasa, la alta proporción de lípidos en la biomasa, y de PUFAs/lípidos totales de algunas cepas en cultivo (Lewis et al. 1999). Cabe citar el ejemplo de la cepa *Aurantiochytrium* (anteriormente *Schizochytrium*) *limacinum* SR21, la cual se ha propuesto como modelo para la producción comercial de DHA (Raghukumar 2008) debido a que se han obtenido con ella elevados valores de este aceite en numerosos trabajos de investigación, tanto en frasco agitado (4.2 g l^{-1} , Yokochi et al. 1998) como en fermentadores (4.9 g l^{-1} , Chi et al. 2007; $13, 3 \text{ g l}^{-1}$, Yaguchi et al. 1997). Si bien el DHA de algunas especies del género *Schizochytrium* sensu lato se utiliza actualmente en productos de alto valor agregado, como suplemento dietario en el mercado de los alimentos y bebidas, en alimentación animal y en acuicultura, así como en nutraceuticos (Ward & Singh 2005), su costo aún no es competitivo frente al del aceite de pescado. En este contexto, para su efectiva comercialización, resulta crucial disminuir los costos de producción, mediante el hallazgo y optimización del cultivo de cepas productoras de altos porcentajes de omega 3, así como el desarrollo de estrategias de fermentación que aumenten la eficiencia de producción de los SCO (Sijtsma & de Swaaf 2004).

La optimización de un proceso biotecnológico puede llevarse a cabo por "ingeniería del medio de fermentación", que tradicionalmente involucra el cambio de

una variable independiente manteniendo las otras en un cierto nivel constante (estrategia de “uno a la vez”). Esto es laborioso y consume mucho tiempo, además de ser incapaz de alcanzar un verdadero valor óptimo dada la existencia de interacciones entre las variables del proceso, un hecho concreto en cualquier proceso de fermentación. Actualmente el método de los Diseños Estadísticos Experimentales (DOEs) provee una alternativa racional para optimizar bioprocesos (Strobel & Sullivan 1999), constituyendo una importante estrategia experimental para encontrar las condiciones óptimas en un sistema multivariable. Sin embargo, a pesar de estas características y de las mejoras introducidas con los años, hay situaciones donde los modelos tradicionales de DOEs no satisfacen los requerimientos que surgen durante el proceso de optimización. Las redes neuronales artificiales (ANNs) son una estrategia alternativa, o a veces complementaria, de los DOEs al momento de optimizar un proceso, cuya ventaja reside en que trabajan mejor con gran cantidad de datos, no requieren una descripción del sistema y tienen mayor valor predictivo para modelos no lineales, como es el caso del diseño de medios de cultivo (Kennedy & Krouse 1999).

2- OBJETIVOS

La búsqueda de cepas nativas de traustoguitriales es relevante por varias razones. En primer lugar, se presenta como un punto de partida para el conocimiento de la biodiversidad de estos microorganismos para la Argentina y de genotipos utilizables industrialmente. El litoral costero argentino representa uno de los ecosistemas marítimos templado-fríos más ricos y de más alta producción del mundo, y por lo tanto es esperable encontrar una gran biodiversidad de organismos saprobios. Por otra parte, la búsqueda de cepas que proliferan en ambientes fríos puede conducir tanto al aislamiento de nuevas especies así como a la obtención de cepas que diversifiquen el tipo de lípidos producidos. Otro aspecto interesante de la obtención de aislamientos de ambientes de bajas temperaturas es que ha sido demostrado que estas cepas contienen mayores porcentajes de PUFA's que aquellas provenientes de ecosistemas cálidos, aunque en general su concentración de biomasa en cultivo es menor (Bowles et al. 1999). Finalmente, cabe destacar que la estrategia de construir bancos (o ceparios) de microorganismos salvajes con potencial interés biotecnológico es reconocida mundialmente como muy valiosa.

El objetivo general de esta tesis es **aislar cepas de traustoguitrales de humedales salinos argentinos que permitan hacer una primera aproximación al conocimiento de su biodiversidad en el país y diseñar un bioproceso para producción de ácidos grasos omega 3 utilizando estos microorganismos.**

Se presentan a continuación los **objetivos específicos**:

1. Aislar y cultivar cepas de traustoguitrales a partir de muestras recolectadas en ambientes salinos continentales, estuarios y el litoral marítimo de Argentina.

Las actividades involucradas para el cumplimiento de este objetivo involucran la toma de muestras durante campañas de recolección y la aplicación de procedimientos convencionales y alternativos para el aislamiento de traustoguitrales. La búsqueda de estos microorganismos en los distintos tipos de materiales y ambientes muestreados representa el primer intento por establecer su presencia en los humedales salinos de la Argentina. El ajuste de la metodología de aislamiento, en base a los requerimientos específicos de las cepas locales, incluye la formulación de nuevos medios de cultivo y la realización de estudios en cultivo a fin de seleccionar las mejores condiciones para futuros aislamientos.

2. Realizar el primer estudio de la biodiversidad de traustoguitrales en la Argentina, mediante la caracterización morfológica, bioquímica, molecular y ultraestructural de las cepas aisladas

Considerando que la identificación taxonómica de las traustoguitrales esta en revisión actualmente y que requiere del análisis conjunto de varios tipos de estudios, las actividades propuestas para caracterizar las cepas locales incluyen tanto el estudio de los caracteres taxonómicos tradicionales (rasgos morfológicos observados en cultivos en agua y cebos) como así también otros caracteres alternativos, entre ellos, la morfología de las colonias en medio sólido, las condiciones para su cultivo, los perfiles de PUFAS y las secuencias del gen que codifica el ARN de la subunidad ribosomal pequeña de 18S (ARNr 18S). A partir de la integración de los resultados obtenidos, se pretende discutir

el valor taxonómico de los rasgos estudiados. Para aquellas cepas que se hayan reconocido como taxones representativos de las traustoguitriales locales se prevé también observar su morfología celular a nivel ultraestructural como una herramienta más para su caracterización.

3. Identificar cepas productoras de ácidos grasos omega 3 y seleccionar estadísticamente las condiciones de cultivo óptimas para maximizar la producción de DHA a escala de laboratorio.

Este objetivo implica, en primer lugar, la selección de una cepa que al menos produzca 0,5-1,0 g l⁻¹ de DHA. Considerando la posibilidad de que los aislamientos locales presentaran niveles de producción de biomasa no compatibles con su aplicación biotecnológica, se prevé la utilización de una cepa modelo, como *A. limacinum* SR21. En segundo lugar, se propone determinar las variables independientes de cultivo de esta cepa que incidan muy significativamente ($P < 0,01$) en la producción de biomasa y de DHA mediante ensayos en frascos agitados y en biorreactores a escala de laboratorio (hasta 5 l) utilizando las técnicas estadísticas de los DOEs y las ANN. A partir de los resultados obtenidos se busca plantear un bioproceso que mejore las productividades de DHA para traustoguitriales referidas en la literatura en condiciones de cultivo similares

CAPITULO II: AISLAMIENTO Y ESTUDIOS DE CULTIVO DE TRAUSTOQUITRIALES DE HUMEDALES SALINOS DE ARGENTINA APLICANDO PROCEDIMIENTOS CONVENCIONALES Y ALTERNATIVOS

2.1- Resumen

Se encontraron traustoitriales en prácticamente todos los humedales salinos muestreados. Debido a que la mayor parte de ellas colonizaron los cebos adicionados a las muestras pero no prosperaron al ser transferidas a los medios nutritivos tradicionales, se ensayaron nuevas formulaciones. De dichos ensayos resultaron dos nuevos medios nutritivos de los que se investigó el efecto de su composición y de la concentración de agar sobre el crecimiento de las cepas patagónicas comparando con otros medios utilizados habitualmente. Estos ajustes metodológicos resultaron en la obtención de más de 140 aislamientos locales, de los cuales 63 están depositados en la colección de cultivos de la FCEN (UBA), como material de referencia y disponible para docencia e investigación. En base a estos resultados se propone una metodología general para mejorar el éxito de aislamiento de traustoitriales de ambientes fríos y templados. Se analizan también las condiciones requeridas para la obtención de biomasa.

2.2- Introducción

2.2.1- El estudio de la diversidad microbiana: técnicas de cultivo y herramientas moleculares

Los microorganismos (procariotas, hongos y protistas, incluyendo las microalgas) representan la mayor proporción de la biodiversidad de la Tierra, encontrándose en prácticamente todos los tipos de ambientes. Sin embargo, sólo una pequeña fracción de ellos ha sido identificada y es conocida para la ciencia (Colwell 1997). Esto se debe en parte a que su identificación taxonómica es dificultosa por la ausencia de rasgos morfológicos conspicuos (Massana et al. 2002) y a que las técnicas de cultivo tradicionales permiten acceder tan solo a una parte de la amplia diversidad que se infiere está presente en un determinado ambiente (Rappe & Giovanoni 2003). En contraposición, el aislamiento, clasificación y conservación de la mayor variedad

posible de microorganismos es necesario tanto para entender su función en los distintos ambientes como para acceder a sus aplicaciones en biotecnología (Bull et al. 2000).

La comprensión sobre la diversidad microbiana ha cambiado radicalmente a partir del análisis de las poblaciones de microorganismos a nivel de los ácidos nucleicos. Este tipo de investigaciones, conocidas como “metagenómica”, involucran la extracción de material genético directamente de muestras ambientales, la amplificación de secuencias genéticas (en general fragmentos de los genes que codifican el ARNr) y su posterior clonado en vectores para producir “bibliotecas”. La información de estas bibliotecas genómicas puede ser utilizada para determinar la diversidad de una comunidad, la presencia de ciertos organismos o vías metabólicas o simplemente para la búsqueda de genes individuales (Steele & Streit 2005). El uso de estas técnicas moleculares ha sido ampliamente aplicado en procariotas, revelando un alto porcentaje de organismos no cultivables. A modo ilustrativo, Torsvik y colaboradores (1990) detectaron un número de genomas bacterianos en suelos 200 veces mayor que el correspondiente a la diversidad de las cepas aisladas.

Las comunidades de protistas han sido abordadas desde la metagenómica, aunque en menor grado que las bacterianas. Este tipo de estudios ha revelado la presencia de un gran número de organismos no representados en las colecciones de cultivo, que pertenecerían a nuevos grupos taxonómicos (Dawson & Hagen 2009). Para el caso de las comunidades de pequeños eucariotas marinos, estos linajes filogenéticos completamente nuevos se ubicarían en su mayoría dentro de los reinos Stramenopila y Alveolata (Diez et al. 2001). El análisis de “librerías” provenientes de una gran variedad de ecosistemas marinos (la costa, las aguas abiertas y las profundidades del océano) ha mostrado que estos clones novedosos de estramenópilos forman clados independientes dentro de las ramas basales (Massana et al. 2002, 2004). Respecto a los ambientes acuáticos anóxicos, los estudios metagenómicos han señalado también a los estramenópilos como uno de los grupos predominantes, y han encontrado además que algunos clones resultaron monofiléticos con miembros del phylum Labyrinthulomycota (Luo et al. 2005, Stoeck et al. 2003, Scheckenback et al. 2010).

El abordaje metagenómico provee nuevas perspectivas acerca de la diversidad microbiana en la naturaleza, pero, cómo ya se ha expresado, su principal limitación es

que no permite obtener a los organismos para su investigación y en algunos casos no permite detectar todos los taxones presentes (Bull et al. 2000). Esto refuerza la necesidad de encontrar nuevas herramientas para lograr hacer crecer aquellos microorganismos que hasta el presente no han podido ser cultivados (Cameotra 2007). Los estudios que comparan estas dos metodologías han señalado que las técnicas de enriquecimiento directo seleccionan las poblaciones que mejor se adecuan a las condiciones elegidas y que pueden ser numéricamente no representativas de la comunidad natural (Bull et al. 2000).

Aunque el desafío de aislar incluso una pequeña fracción de esos organismos no cultivables parece insuperable, aún hay oportunidad para las mejoras, por ejemplo, la aplicación de métodos de cultivo basados en modificaciones de los enfoques tradicionales ha permitido el aislamiento de microorganismos considerados previamente recalcitrantes (Tyson & Banfield 2005). El éxito de estos enfoques depende del hallazgo de una combinación específica adecuada de varios factores y sus interacciones, entre los que cabe mencionar, aquellos físicos (temperatura, agitación, etc.), la composición del medio de cultivo, la presencia de factores de crecimiento, el tiempo de incubación o la interacción con otros microorganismos (Kamagata & Tamaki 2005).

La conservación de la diversidad microbiana es fundamental como reserva de los recursos genéticos globales, particularmente ante el actual deterioro de muchos ambientes naturales (Colwell 1997), y como potencial recurso para el desarrollo biotecnológico. Adicionalmente, el mantenimiento en cultivo (*ex situ*) de estos materiales biológicos es esencial para asegurar su disponibilidad para propósitos científicos e industriales, siendo esta la principal tarea de las Colecciones de Cultivo. Las mismas se encargan de proveer cepas de referencia, para estudios académicos, para exploración de características biotecnológicas y para producción, asegurando su estabilidad, su pureza y la reproducibilidad de las investigaciones (Hunter-Cevera & Belt 1996).

2.2.2- Aislamiento de Thraustochytriales: metodología y medios de cultivo

Los procedimientos para el aislamiento de traustoquitriales fueron desarrollados durante la década del 50 y desde ese entonces prácticamente no han experimentado

modificaciones sustanciales. Los primeros esfuerzos por obtener cultivos puros corresponden a S. W. Watson y H. S. Vishniac, quienes formularon varios medios de cultivo para *Labyrinthula*, agente causante de enfermedades en pastos marinos (v.g. *Zoostera marina*) (Vishniac & Watson 1953, Vishniac 1955). La metodología propuesta por Watson y Ordal (1957), que constaba básicamente en la siembra de material (hojas con el patógeno) en un medio sólido conteniendo 0.9 % m/v de agar y 10 % v/v de suero de caballo y posteriores transferencias, permitió la obtención del primer cultivo puro de *Labyrinthula*. A este medio de cultivo lo denominaron SSA (Serum Seawater Agar, ver tabla 2.1) y verificaron que también era efectivo para el crecimiento de una cepa de *Thraustochytrium*. Por su parte Vishniac (1956) formuló otro medio de cultivo para poder desarrollar estudios ecológicos. Dicho medio contenía glucosa (0,1% m/v), hidrolizado de gelatina (0,1% m/v), extracto de hígado (0,02% m/v), una solución de vitaminas del grupo B y agar (1,5% m/v) en agua de mar. La siembra de muestras de agua de mar sobre el mismo permitió el aislamiento de un importante número de colonias de hongos zoospóricos, entre ellos traustoquitriales. Años más tarde, Fuller y colaboradores (1964) propusieron una serie de modificaciones de este medio, como algunos ajustes en las concentraciones de los componentes y el reemplazo de la solución de vitaminas del grupo B por extracto de levadura y lo denominaron “Medio Vishniac Modificado” o KMV (ver composición en tabla 2.1).

Una alternativa de uso común a la siembra directa de la muestra en medios nutritivos es la adición de granos de polen de pino como cebo en la muestra con agua de mar (Sparrow 1936). Después de ser colonizados, los cebos con traustoquitriales son sembrados en el medio agarizado, donde desarrollan nuevas colonias que luego son transferidas sucesivamente hasta obtener cultivos puros (Porter 1990). Sin embargo, algunas traustoquitriales no prosperan sobre el polen de pino y entonces deben aplicarse otros cebos, como en el caso de *Ulkenia amoeboides* que requirió larvas de *Artemia salina* estériles (Bahnweg & Sparrow 1974). La piel de las serpientes, los pelos, las escamas de peces, las exuvias de insectos y los fragmentos de algas pueden mencionarse entre los cebos que también pueden emplearse para el aislamiento de traustoquitriales (Goldstein 1973). Por otro lado, una técnica de enriquecimiento frecuentemente utilizada es el filtrado de agua de mar a través de membranas con un tamaño de poro de 0,4 a 0,8 μm y la posterior siembra de las mismas en medio nutritivo agarizado (Honda et al. 1998).

Independientemente de cual de los tipos de variantes se adopte, las primeras colonias de traustoguitriales se pueden encontrar a las 24 h y hasta una semana después de que el material haya sido sembrado, y luego los cultivos son en general completamente invadidos por otros microorganismos contaminantes. Para disminuir el crecimiento bacteriano, los antibióticos que frecuentemente se adicionan a los medios de aislamiento son penicilina G sódica y sulfato de estreptomicina, en concentraciones de 250-500 mg l⁻¹ cada uno (Porter 1990). La temperatura recomendada de incubación es de 18-20°C (Vishniac 1956), aunque este rango es en la práctica más amplio. Otro factor crítico para el aislamiento de las traustoguitriales es la humedad del medio de cultivo agarizado teniendo que prestarse especial atención a que las placas no se sequen excesivamente (Vishniac 1956). Esta sensibilidad a la humedad ha sido considerada por Watson y Ordal (1957), al agregar unas gotas de agua de mar estéril sobre los bordes de la muestra sembrada en medio sólido, estimulando así la zoosporulación de la cepa de *Thraustochytrium* en aislamiento y facilitando su dispersión.

A partir del interés que las traustoguitriales han adquirido como productoras de ácidos grasos omega 3, varios grupos de investigación se abocaron al aislamiento de cepas de estos microorganismos y para ello implementaron sus propios medios de cultivo. La composición de algunos de estos medios se muestra en la tabla A.1 del Apéndice, mientras que la de los más adoptados, GPY y H (Honda et al. 1998), se presenta en la tabla 2.1.

El potencial biotecnológico de las traustoguitriales ha focalizado la investigación en el diseño de medios de cultivo que optimicen la producción de PUFA's y entonces ha habido muy pocos esfuerzos por establecer la eficiencia de los medios agarizados sobre el aislamiento de estos microorganismos. El más reciente aporte que puede mencionarse al respecto es el de Taoka y colaboradores (2008), quienes mostraron que el agregado del Tween 80, jugo de tomate comercial y KH₂PO₄ al medio basal de aislamiento promovió la formación de colonias de traustoguitriales. La inclusión de nuevos componentes en los medios de cultivo que puedan actuar como factores de crecimiento resulta una vía invalorable para acceder a parte de la biodiversidad que las metodologías actuales no permiten conocer, tal como lo señalaran Vishniac y Watson (1953) a partir del aislamiento de una cepa de *Labyrinthula* auxótrofa para esteroides.

2.2.3- Objetivos

Los humedales salinos de nuestro país representan una gran variedad de ambientes potenciales para explorar la presencia de traustoguitriales y hacer un primer relevamiento de la biodiversidad de estos organismos para la Argentina. Así mismo, la obtención de aislamientos locales plantea la posibilidad de constituir un cepario con organismos disponibles tanto para estudios académicos como para la búsqueda de aislamientos productores de PUFAs con posibles aplicaciones biotecnológicas.

Durante los primeros intentos para estudiar la diversidad local de traustoguitriales, se adoptó en nuestro laboratorio la metodología estándar del cebado con granos de polen y siembra de los cebos en medio agarizado GPY (Rosa et al. 2006). Sin embargo, muchos de los microorganismos detectados microscópicamente, tanto en las muestras como en los cebos, no lograban ser aislados. Considerando las diferencias entre los ambientes fríos y templados de nuestro país respecto a las regiones tropicales y subtropicales de las que provenían los aislamientos previos, especialmente manglares (Raghukumar 2002), se planteó la necesidad de ajustar algunos aspectos metodológicos a fin de aislar las traustoguitriales locales, que parecían ser “elusivas” a los procedimientos estándares. Adicionalmente, el hallazgo de condiciones de cultivo que permitieran la propagación de las especies locales fue un primer paso necesario no sólo para disponer en forma permanente de estos microorganismos, sino también para obtener la biomasa para las determinaciones analíticas requeridas para su caracterización. De acuerdo con esto, los objetivos de este capítulo son:

- Verificar por primera vez la presencia de traustoguitriales en los humedales salinos de la Argentina.
- Ajustar las condiciones de cultivo para incrementar la eficiencia de aislamiento de representantes de traustoguitriales de ambientes templados y fríos.
- Establecer las condiciones de cultivo de las cepas aisladas para la obtención de biomasa para las posteriores determinaciones analíticas y como una primera evaluación de su potencialidad biotecnológica como productoras de ácidos grasos omega 3.

2.3- Materiales y Métodos

2.3.1- Recolección de muestras y descripción de los ambientes estudiados

Las muestras de agua con materia orgánica en descomposición se recolectaron en recipientes plásticos estériles de 50 ml. Los datos de recolección se detallan en la tabla 2.2. Las características más salientes de los sitios estudiados se describen a continuación, mostrando su distribución dentro del territorio nacional argentino en la figura 2.1.

2.3.1.1- Litoral marítimo patagónico

Los ambientes costeros muestreados en el litoral patagónico abarcan una franja que va desde el Golfo de San Matías (provincia de Río Negro) hasta el Canal de Beagle (Tierra del Fuego). Las aguas costeras de la plataforma continental argentina son de origen subantártico, diluidas por descargas continentales y modificadas por intercambios de masa y calor con la atmósfera. El agua subantártica ingresa a la plataforma principalmente entre las Islas Malvinas y Tierra del Fuego y es modificada por el aporte de aguas del Estrecho de Magallanes (Piola & Rivas 1997). El rango de temperatura media del agua costera oscila entre 6,5°C a 21°C, dependiendo de la latitud y de la estación del año. Las aguas superficiales más frías se encuentran en el extremo sur, en las inmediaciones del estrecho de Magallanes, registrándose un progresivo aumento de la temperatura hacia el norte. La salinidad, con registros menores que 33.7 ups, no presenta variaciones estacionales. Este parámetro aumenta de la costa hacia la plataforma exterior y del sur al norte, entre los paralelos 50° S y 36° S. Los valores más bajos se han registrado en la desembocadura del estrecho de Magallanes (hasta 32,5 ups), mientras que los más altos en el Golfo de San Matías (superiores a 34 ups) (Guerrero & Piola 1997). El carbono orgánico total y nitrógeno total presentan valores de 0.25% a 2.00% y de 0.06% a 0.20% respectivamente (Premuzic et al. 1982); la abundancia y calidad nutritiva de la materia orgánica está relacionada con la baja actividad biológica impuesta por las bajas temperaturas (Fernández et al. 2007).

La plataforma continental argentina tiene una cobertura de sedimentos recientes originados en el continente y llevados al mar a través de diferentes procesos de transporte y deposición. Los sedimentos predominantes (65%) son arenas, mayoritariamente bioclásticas finas a medianas, con fracciones gruesas y muy finas subordinadas. En las inmediaciones de los ambientes litorales semiprotegidos (Río de la Plata, Bahía Blanca, Golfos San Matías y San Jorge) abundan las arenas muy finas en transición a limos. En algunos sitios, como el sector comprendido entre Bahía Blanca y Golfo San Matías, las arenas constituyen dunas. Las conchillas y las gravas forman el segundo tipo dominante, y entre ambas constituyen el 25% de la cobertura sedimentaria. Los fangos (limos y arcillas) cubren un 8% de la superficie de la plataforma, limitándose en su distribución a las áreas costeras vecinas a estuarios, bahías y golfos, particularmente en los ámbitos de Bahía Blanca, golfos San Matías, San José y Nuevo, San Julián, Bahía Grande y San Sebastián. Estos sedimentos contienen generalmente altas concentraciones de materia orgánica (Cavalloto 2008).

Respecto a las particularidades de los sitios muestreados, el balneario de Las Grutas, ubicado en el Golfo San Matías y a 15 km de la ciudad de San Antonio Oeste, es el más importante de la Patagonia. Presenta acantilados activos, con alturas de 8 a 10 m, al pie de los cuales pueden encontrarse playas de arena y plataformas de abrasión marina (constituidos por rocas sedimentarias y volcánicas que son erosionadas por las olas, Cavalloto 2008). Las temperaturas de sus aguas son las más cálidas del litoral marítimo, con medias en verano de 23°C, pudiendo alcanzar en algunos sectores los 27°C. Las mareas arrastran una gran cantidad de macroalgas, las cuales se acumulan en la playa.

Los balnearios de Puertos Pirámides y Puerto Madryn se encuentran en el Golfo Nuevo y sus costas se caracterizan por ser acantiladas con playas principalmente arenosas dentro de las bahías, encontrándose en algunos sectores depósitos de cantos rodados y plataformas de abrasión marina (Cavalloto 2008). Puerto Pirámides es el único núcleo urbano de la Península Valdés, declarada Patrimonio Natural Mundial por la UNESCO en 1999. Su principal actividad durante todo el año es el turismo. Puerto Madryn es la tercera ciudad más importante de la provincia de Chubut; los tres grandes pilares de su economía son el parque industrial, la actividad pesquera y el turismo. Las playas adyacentes a la ciudad son bajas y arenosas con abundancia de macroalgas

arrastradas por la marea, al igual que en Las Grutas. Avanzando hacia el sur, a la altura de Punta Indio, la playa presenta plataformas de abrasión marina, que se continúan en el sector de Punta Este, zona de escasa intervención humana debido a sus costas acantiladas de difícil acceso.

Comodoro Rivadavia es la ciudad más importante de Chubut y se ubica en el centro del Golfo San Jorge. El Golfo San Jorge es una cuenca semiabierto del Mar Argentino, ubicado en la latitud 45° y 47° S y el meridiano 65°30' O y la costa, que ocupa una superficie de 39.340 km². Este sector es de gran importancia económica ya que en él se localizan las mayores concentraciones de langostinos que sustentan la pesquería del litoral patagónico (Fernández et al. 2007) y además conforma la cuenca más prolífica productora de petróleo de la Argentina, ubicándose sus reservas en segundo lugar tras de la Cuenca Neuquina (Sylwan 2001). La ciudad de Comodoro Rivadavia forma un aglomerado que se extiende hasta Caleta Córdova, puerto de embarque de petróleo, (a 16 km) al norte y Rada Tilly (a 12 km) al sur, siendo esta última localidad el balneario más austral de América. Respecto a la geomorfología de sus costas, Caleta Córdova es una entrada de unos 2 km de ancho limitada por dos salientes, de constitución rocosa bordeada por restingas, con presencia de una playa de gravas en el centro de la misma. Entre Comodoro Rivadavia y Rada Tilly se extienden acantilados marinos, que alcanzan alturas de hasta 40 m. Rada Tilly está limitada por dos salientes: Punta Piedras y Punta Marqués, al norte y al sur, respectivamente. Internamente está contorneada por un acantilado inactivo, ubicado a 700 m o más de la costa actual. Las playas comprendidas entre Comodoro Rivadavia y Punta Márquez son de arena fina con pendientes muy suaves, y se interrumpen en los sectores con planicies de abrasión de olas (Cavalloto 2008). Otros dos cuerpos de agua de la zona de los que se tomaron muestras fueron el arroyo La Mata (Comodoro Rivadavia) y la laguna Rada Tilly. Ambos se hallan altamente perturbados por la actividad antropogénica: el primero de ellos trae las aguas residuales de la cuenca que conforma el antiguo yacimiento El Tordillo mientras que el segundo se encuentra muy próximo a la planta de tratamiento de efluentes de la ciudad homónima

Puerto Deseado y Puerto San Julián son dos ciudades portuarias de la provincia de Santa Cruz. Sus costas presentan playas casi ininterrumpidas compuestas por rodados de gravas, con mayor contenido de arena en los sectores con acantilados y

plataformas de abrasión (Cavalloto 2008). Finalmente, la bahía de la Estancia el Túnel se encuentra en la zona norte del canal de Beagle, a 13 km de la ciudad de Usuahia. En este sector las playas son bajas y de pedregullo (Cavalloto 2008). La temperatura del agua en invierno es de unos 2-4°C mientras que en verano puede llegar a 8-10°C.

2.3.1.2- Caleta Potter, Antártida Argentina

La Caleta Potter (62° 14' S; 58° 39' O), se encuentra en la Península de Potter en la Isla 25 de Mayo (también conocida como “King George Island”) perteneciente a las Islas Shetland del Sur dentro del sector antártico argentino. En esta zona se emplazan varias bases militares y científicas, entre ellas, la base nacional Jubany. La Caleta Potter es una ensenada próxima a la entrada de la Bahía de Maxwell, uno de los dos fiordos principales de la Isla. Las temperaturas del agua varían entre -2.0° a 1.4°C y la salinidad promedio es de 33.9 ups. Presenta tres tipos de sustratos diferentes: fondos duros dominados por rocas sólidas en la zona más externa, depósitos de canto rodado y grava en la zona interior norte, y fondos blandos de limo y arcilla en la zona interior sur (Sahade et al. 2004). La Península de Potter es una de las pocas áreas que permanece descubierta de hielo durante el verano. En las zonas cercanas a la costa hay macroalgas, principalmente rodófitas y feofitas, y una gran cantidad de fauna béntica, incluyendo bivalvos y poliquetos (Riffenburgh 2007). Las diatomeas son el componente mayoritario del fitoplancton. Respecto al zooplancton, el krill, cuyo principal representante es *Euphausia superba*, es particularmente abundante y juega un rol vital en la cadena alimentaria por ser el sustento de peces, aves y ballenas (Ingole & Parulekar 1993)

2.3.1.3- Albufera Mar Chiquita

La laguna costera Mar Chiquita, situada en la provincia de Buenos Aires, está ubicada entre los 37° 32' - 37° 45' S y los 57° 19' - 57° 26' O. Esta laguna, que cubre un área de 46 km², es de forma alargada e irregular, su ancho varía entre 500 y 4500 m, la longitud alcanza los 25 km y tiene una profundidad máxima de 1,2 m por encima de las mareas más bajas. Puede ser dividida en una parte norte ancha y una parte sur angosta que se abre al mar. El agua de mar ingresa con las mareas altas, dependiendo su volumen de la dirección e intensidad de los vientos. Recibe el aporte de varios arroyos y

canales artificiales, tales como el arroyo de las Gallinas, el arroyo Grande, el arroyo Vivorotá, el arroyo Dulce, el Canal 5 y el Canal 7, que contribuyen con abundantes caudales en los períodos de grandes lluvias (Olivier et al. 1972). Existe un gradiente horizontal de salinidad: en las inmediaciones de la boca las aguas son mixo-eurihalinas (± 34 ups), hacia el interior mixo-mesohalinas (± 22 ups), y en las proximidades de la desembocadura de arroyos y canales, mixo-oligohalinas ($\pm 2-3$ ups) (Rivera Prisco et al. 2001). Tanto las menores temperaturas ($6,6^{\circ}\text{C}$), condición de invierno, como las máximas ($25,5^{\circ}\text{C}$), condición de verano, fueron registradas en las dos zonas más alejadas de la desembocadura (Fasano et al. 1982).

La laguna está rodeada por una delgada planicie de mareas sin vegetación, formada por arena fina, limo y arcilla aportados por arroyos y canales. Por fuera de las planicies de marea, se extienden praderas de *Spartina densiflora*. En las proximidades de la boca existen playas arenosas. En gran parte de la laguna se encuentran arrecifes formados por los tubos calcáreos del poliqueto serpúlido *Ficopomatus enigmaticus* (Fasano et al. 1982, Spivak 1997). La albufera Mar Chiquita fue declarada Reserva Mundial de Biosfera “Parque Atlántico Mar Chiquito” por la UNESCO en abril de 1996. En febrero de 1999 fue a su vez declarada Reserva Natural de Uso Múltiple por el gobierno provincial (Partido de Mar Chiquita, <http://www.marchiquitadigital.com.ar>). Se tomaron muestras en seis microambientes de la zona sur de la albufera (tabla 2.2), cuya salinidad se indica entre paréntesis: los arroyos afluentes Viborata (5 ups) y Cangrejos (4 ups), un cangrejal aledaño al arroyo Cangrejos en la zona urbana (5 ups), el litoral de la albufera a la altura del puente del Celpa (19-24 ups), la marisma (10-20 ups), y el litoral marítimo (29 ups).

2.3.1.4- Marisma de Punta Rasa, Bahía de Samborombón

El humedal mixohalino de Bahía de Samborombón es el de mayor superficie de la Argentina (2.440 km^2) y se extiende a lo largo de 150 km sobre la costa occidental del estuario del Río de la Plata, desde Punta Piedras ($35^{\circ} 27' \text{ S}$; $56^{\circ} 45' \text{ O}$) hasta Punta Rasa ($36^{\circ} 22' \text{ S}$; $56^{\circ} 35' \text{ O}$). Constituye una zona de mezcla entre las aguas del Río de la Plata y el Océano Atlántico y tiene como característica distintiva la presencia de una entramada red de canales de marea (Volpedo et al. 2005).

La amplitud de mareas no supera 1 m, y existen importantes efectos de los vientos que producen mezcla o estratifican (Boschi 1988) y controlan la salinidad superficial. La salinidad presenta altos gradientes horizontales, con isolíneas de 5-10 ups en las zonas internas y de 25-30 ups en las zonas externas, registrándose los valores más elevados en el verano. La temperatura de las aguas es de 20-22°C en verano y de 10-12°C en invierno (Guerrero et al. 1997). Los sedimentos están constituidos predominantemente por arcillas y en la zona de Punta Rasa hay una importante influencia de la deriva litoral con altos porcentajes de fracción de arena. Si bien estos suelos son pobres, su contenido de materia orgánica permanece constante debido a la particular distribución de la biota en el sustrato (Bértola & Morosi 1997).

Punta Rasa es el límite exterior del Río de La Plata y punto exacto donde se mezclan sus aguas con las del Océano Atlántico. Además de ser considerada como sitio RAMSAR por ser parte de la Bahía de Samborombón, ha sido declarada reserva natural municipal y provincial (Reserva Natural Punta Rasa, <http://www.puntarasa.com.ar>). Es un ambiente de marismas conformado por planicies de mareas (cangrejales), canales de mareas, médanos fósiles y la costa marina. La vegetación de los canales de marea está constituida por especies tolerantes a altos tenores salinos, siendo las más representativas *Spartina alterniflora*, *Spartina densiflora* y *Salicornia ambigua* (Vervoost 1967). Por su parte, los cangrejales poseen una zonación ecológica dada por la presencia de tres especies de cangrejos: *Chasmagnathus granulata*, *Uca uruguayensis* y *Cryptograpsus angulatus* (Boschi 1988). Se tomaron muestras también en una laguna aledaña al cangrejal a la que no fue posible detectarle la salinidad utilizando un refractómetro Aquafauna, Bio-Marine Inc., USA, por lo que se presume que su origen es pluvial.

2.3.1.5- Estuario de Bahía Blanca

El estuario de Bahía Blanca está ubicado entre los 38° 40' y 39° 45' S y 61° 03' y 63° 00' O presenta una longitud aproximada de 100 km y abarca una superficie de 2.300 km². Se trata de un estuario mesomareal, con un rango de variaciones de la marea entre 2 y 4 m, de planicie costera conformado por canales de marea (740 km²), por amplias planicies de marea (1.150 km²), marismas saladas bajas e islas (410 km²) dispuestas entre los canales (Angeles 2001). Debido a las diferencias existentes en cuanto a su física, su química y a su biología, este estuario puede ser dividido en dos zonas: una

interna donde las características abióticas son marcadamente fluctuantes (entre la localidad de Villarino y Puerto Ingeniero White) y otra externa donde las condiciones ambientales se hacen mucho más estables acercándose a las del ambiente marino (desde Puerto Ingeniero White, hasta una línea imaginaria que une Punta Laberinto y Faro Monte Hermoso) (Mianzan & Sabatini 1985).

Las planicies de marea del estuario de Bahía Blanca son amplias superficies subhorizontales limo-arcillosas, de escasa pendiente, que soportan condiciones subaéreas y subacuáticas relacionadas con el ascenso y descenso de las mareas (Melo et al. 2003). El aporte de agua dulce es despreciable frente al volumen de agua incorporado en cada ciclo de mareas, y por lo tanto su salinidad fluctúa apenas entre 31 y 36 ups. La temperatura del agua varía anualmente entre 6 y 23°C y en la zona interna está fuertemente condicionada por la temperatura ambiente. Las concentraciones de nutrientes son sumamente elevadas y fluctúan durante las estaciones del año (Freije & Marcovecchio 2004).

Desde un punto de vista socioeconómico, Bahía Blanca presenta núcleos industriales y uno de los más importantes sistemas portuarios profundos. Todos ellos descargan sus efluentes al estuario con distintos grados de tratamiento, generando diferentes impactos sobre el ambiente. Respecto a las zonas muestreadas, el puerto Ingeniero White es un área de gran desarrollo industrial, por lo que constituye un ambiente muy modificado y con grandes aportes de materia orgánica de origen antropogénico. Por su parte Puerto Rosales es el puerto más externo del estuario y por ser sólo apto para el ingreso de embarcaciones de pequeño calado se encuentra menos perturbado (Perillo et al. 2001).

2.3.1.6- Marisma de San Antonio Oeste, Bahía de San Antonio

La bahía San Antonio posee 160 km² de superficie y está delimitada por dos espigas en sus márgenes (punta Delgado y península Villarino). Las amplias mareas dejan al descubierto diariamente extensos intermareales de hasta 7 m. San Antonio Oeste se encuentra en el sector norte, donde la bahía está bordeada por una planicie baja, conformada por espigas de rodados y arenas que se entremezclan con las planicies de marea. Son en su mayor parte, llanuras de fango intermareal densamente pobladas

por cangrejos sobre las que se observa una densa red de canales de marea (Carbone et al. 2007). La vegetación en los márgenes está compuesta principalmente por plantas halófitas como *Spartina* sp. y *Salicornia* sp. (Yorio et al. 1988). Las aguas del canal del puerto de San Antonio Oeste presentan las salinidades y temperaturas más elevadas de la bahía, pudiendo superar los 36,5 ups y los 23°C en verano respectivamente. Los registros de salinidad son mayores en las aguas que egresan del canal que en las aguas que ingresan, probablemente por la alta tasa de evaporación favorecida por la baja profundidad y el alto tiempo de estadía. La concentración de nitratos y amonio así como de materia orgánica en los sedimentos presenta valores elevados que podrían estar asociados a la descomposición de materia orgánica proveniente de la ciudad, la cual no posee tratamiento de aguas servidas (Esteves et al. 1996)

2.3.1.7- Laguna La Salada

La Salada es una laguna salina continental ubicada en el partido de Villarino a 7 km de la localidad de Pedro Luro. Abarca aproximadamente 400 km², su profundidad puede alcanzar hasta 6 m y tiene como afluentes al canal San Adolfo y al río Colorado. Su fondo es arenoso con cristales de yeso intercalados en los sedimentos. Sus aguas son claras, carecen de sedimentos suspendidos y tienen como principales componentes al sodio y al cloro, seguidos por el azufre. Los valores de temperatura media oscilan entre 8°C y 21°C, la salinidad es de aproximadamente 23 ups y el pH de 7.8. Sus costas son bajas con algunos declives pronunciados y manchones aislados de plantas vasculares, acumulándose algas en ciertos sectores (García 1993). Es considerada como un área turística local, siendo su mayor atractivo la pesca recreativa.

2.3.1.8- Laguna Vilama

Las lagunas de Vilama (22° 30' S; 66° 55' O) están ubicadas en el altiplano de la Provincia de Jujuy a 4.500 m de altura. La morfología predominante es de grandes conos y planicies de lavas e ignimbritas sobre la que se ubican cientos de pequeñas, y algunas grandes, lagunas. Las lagunas pequeñas a medianas son de agua dulce y más profundas, mientras que las dos mayores, Vilama y Palar, son muy someras, con alta evaporación y concentración de sales y un gran aporte de sedimentos volcánicos, presentando fluctuaciones de nivel. La zona de Vilama se caracteriza por su aridez, con

precipitaciones menores a 200 mm anuales, una temperatura media anual inferior a 6°C y grandes amplitudes térmicas diarias. Además del ambiente riguroso y la gran altitud, la región es de difícil acceso y casi no existen huellas para recorrerla. Estas lagunas son un patrimonio con protección internacional y provincial: han sido declaradas como sitio Ramsar y forman parte de la Reserva Provincial Altoandina de la Chinchilla.

La laguna Vilama tiene una extensión de aproximadamente 46 km² en la estación húmeda. Esta laguna hipersalina presenta grandes variaciones en las concentraciones de sales a lo largo del año. Por ejemplo, los valores de cloruros y de sodio en la estación húmeda son de 30 y 60 mg l⁻¹, mientras que en la estación seca los registros corresponden a 50000 y 48000 mg l⁻¹ respectivamente. También se han documentado altas concentraciones de arsénico (3,1 mg l⁻¹ en la estación seca). Este humedal es altamente alcalino, no presenta macrófitas y en sus aguas predomina las diatomeas y cianofitas, siendo pobre en zooplancton (Caziani & Derlindati 1999).

2.3.2- Aislamiento y medios de cultivo

Una porción del material recolectado (aproximadamente 15 ml) se dispuso en placas de Petri (90 mm de diámetro) y se agregaron como cebo granos de polen (*Pinus* sp o *Liquidambar* sp) y/o larvas de *Artemia persimilis* muertas con calor (ca. 100°C durante 5 min), así como antibióticos (penicilina 4 x 10⁵ U l⁻¹ y estreptomicina 250 mg l⁻¹). Una vez que los cebos fueron colonizados, éstos se transfirieron a medio agarizado suplementado con antibióticos en la concentración indicada previamente. La composición de los medios utilizados se detalla en la tabla 2.1. El medio GPY se empleó para las muestras de los sitios I y II (tabla 2.2), mientras que los medios MC, TMPP (formulados en este trabajo) y SSA para las muestras de III a XVII. El pH de los medios MC y TMPP se ajustó con NaOH (5 N) en 6.0 unidades antes de autoclavar. Se utilizaron reactivos analíticos, exceptuando el Macerado de Maíz (Corn Steep Liquor, CSL), provisto por Productos del Maíz S.A. (Argentina) y la sal de mar artificial (Crystal Sea Marinemix, Marine Enterprises International, USA).

Las colonias individuales de traustquitriales obtenidas luego de 4-7 días de incubación, se transfirieron sucesivamente a los mismos medios hasta obtener cultivos puros. En aquellas muestras en las que se había observado más de un tipo morfológico

de traustoguitria sobre los cebos, se aislaron varias colonias que pudieran diferir en alguno de sus rasgos. También se realizaron varios aislamientos para una misma muestra cuando se reconocieron distintos tipos de colonias en medio sólido

La pureza de los aislamientos se verificó observando el aspecto de las colonias (color, elevación, superficie, tamaño celular) en medio sólido bajo una lupa binocular Arcano (20X) y el proceso de zoosporulación en agua de mar y cebos utilizando un microscopio Karl Zeiss (400X). En todos los casos, se incubó a $25^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$, salvo los materiales de la Antártida (4°C). Los ajustes metodológicos particulares que se aplicaron en algunas muestras a fin de incrementar la eficiencia de aislamiento se detallan en la sección de Resultados.

Para la denominación de las cepas se utilizó un prefijo indicador del origen de las mismas, seguido del número de muestra del que fueran obtenidas; cuando se observó más de un tipo morfológico de traustoguitria en la muestra o se aislaron varias colonias similares a partir de ella, se adicionó un sufijo para diferenciarlas. Por ejemplo, la cepa MC4A se obtuvo de una (A) de las varias colonias (A, B, C, etc.) desarrolladas luego de sembrar la muestra 4 de la albufera Mar Chiquita (MC) en medio agarizado. Las cepas obtenidas se encuentran depositadas en la Colección de Cultivos de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (BAFCcult.), Universidad de Buenos Aires, manteniéndose criopreservadas a -70°C , dado el corto tiempo de vida de los cultivos (entre dos y tres semanas desde el repique). Para ello se colocó una pequeña porción de agar colonizado en tubos eppendorf con 1 ml de medio líquido adicionado con glicerol (10% v/v).

2.3.3- Estudios en cultivo

2.3.3.1- Efecto de la composición del medio de cultivo

Se comparó el efecto de la composición de los nuevos medios de cultivo formulados (MC y TMPP) y de otros utilizados frecuentemente para traustoguitriales (KMV, SSA, H y GPY) sobre el crecimiento de los aislamientos en placas de Petri (90 mm de diámetro). Para estos ensayos se utilizaron las cepas aisladas de las muestras del litoral marítimo y estuarios de la Patagonia (V-XIII, ver tabla 2.2). Se excluyeron las

cepas S8, S50B y S50Sch por problemas de contaminación, S27 por discontinuidad mientras que S26A, S32, S48cmc y S49cmc se omitieron por presentar rasgos muy similares a los de otras cepas provenientes de los mismos sitios (lo que podría resultar en una redundancia de especies). Adicionalmente y con fines comparativos, se incluyó la cepa comercial *Aurantochytrium limacinum* SR21, que presenta altas tasas de crecimiento y se encuentra ampliamente estudiada en cultivo (Yokochi et al. 1998).

Para inocular, una porción de SSA de 0.25 cm² con colonias de una semana se colocó sobre la superficie de cada medio de cultivo y se arrastró hasta observar la separación de las células bajo lupa binocular (40X). Diez días después, los cultivos se examinaron bajo microscopio óptico (100X) para asignarles “valores de crecimiento relativos” (VCRs) de acuerdo a una escala arbitraria semicuantitativa basada en las características de las colonias. La figura 2.2 ilustra los VCRs establecidos: 0-1, cuando las células no proliferaron o proliferaron sólo una vez, respectivamente; 2, en el caso de formación de colonias bidimensionales, pequeñas y planas; 3, para colonias de mayor tamaño, resultantes de la división celular en varios planos; y 4, para cultivos confluentes. El VCR para cada cepa en cada medio representa la moda de tres ensayos independientes. Para estimar el éxito de cultivo de los aislamientos en los medios comparados, los VCR 0-1 fueron considerados malos, el VCR 2 bueno y los VCR 3 y 4 muy buenos. La “eficiencia para cultivo” (EC) de cada medio se definió como el porcentaje de cepas que al ser crecidas en dicho medio alcanzaron un VCR mayor o igual a 2.

2.3.3.2- Efecto de la concentración de agar

Para estudiar el efecto de la concentración de agar sobre el crecimiento, se eligieron los diez aislamientos del ensayo anterior que habían mostrado mayores limitaciones para proliferar en cultivos sólidos que contenían 3% m/v de agar. Se registraron los VCRs de estas cepas en los medios MC, TMPP, SSA y H con 1, 2 y 3% m/v de agar (USB Corporation, USA) luego de 10 días de incubación. Para cada una de estas combinaciones se midió, antes de inocular, el porcentaje de humedad (estimado como $(\text{peso fresco} - \text{peso seco}) \times \text{peso fresco}^{-1} \times 100$) y la actividad agua (medida con un equipo AquaLab Water Activity Meter, Decagon Devices, Inc., con un sensor de punto de rocío).

Los cultivos de los ensayos 2.3.3.1 y 2.3.3.2 se incubaron en oscuridad a 25°C.

2.3.3.3- Obtención de biomasa

Se estudió el crecimiento de las cepas en frascos agitados de 100 ml conteniendo 20 ml del medio de cultivo de aislamiento. Los cultivos se incubaron a 100 rpm y 25° ±1°C durante dos semanas. En aquellos casos en los que no se registró crecimiento, se ensayaron condiciones alternativas, como agitación horizontal (100 opm, oscilaciones por minuto) o temperaturas de incubación inferiores (ver resultados) así como el empleo de los otros medios de cultivo indicados en la tabla 2.1.

2.3.4- Análisis estadístico

Se utilizó un ANOVA de dos vías para evaluar estadísticamente el efecto de los tratamientos aplicados (medio de cultivo, cepa, porcentaje de agar) y sus interacciones sobre el crecimiento de las cepas (cuantificado como VCRs). Para los factores significativos medio de cultivo (ensayo 2.3.3.1) y porcentaje de agar (ensayos 2.3.3.2) se compararon las medias de los VCRs mediante un contraste de rangos múltiples (método de Fisher). Se estudió la dependencia lineal de la actividad agua y del porcentaje de humedad de los medios de cultivo respecto al porcentaje de agar mediante un análisis de regresión, ajustando los datos al modelo lineal $Y = a + b \times X$. Para todos estos análisis estadísticos se empleó el programa StatGraphics Plus versión 5.1, verificando los supuestos en cada caso.

2.4- Resultados

2.4.1- Aislamiento de cepas de traustogitriales de la Argentina

Se detallan a continuación, para cada evento de recolección, el número de cepas obtenidas y disponibles actualmente (tabla 2.3) así como los ajustes metodológicos particulares aplicados para su aislamiento.

2.4.1.1- Aislamientos de la marisma de Punta Rasa y laguna continental La Salada (Buenos Aires, 2004)

Durante estos primeros aislamientos se aplicó la metodología convencional, utilizando granos de polen (*Pinus* sp.) como cebo y el medio GPY. En todas las muestras obtenidas durante la primera campaña de recolección de material en la marisma de Punta Rasa, se observaron traustquitriales con similares características morfológicas al desarrollarse sobre los cebos. Se aislaron dos cepas a partir de detritus, restos vegetales y sedimentos acumulados en las pozas de marea del cangrejal y una cepa desde fragmentos de tallos y raíces de plantas vasculares sumergidas en el margen de una laguna pluvial aledaña al cangrejal (tabla 2.3). Las colonias de las cepas provenientes del cangrejal presentaron diferencias morfológicas (indicadas con un código numérico distinto en la tabla 2.4), resultando una de ellas similar a la cepa de la laguna. El patrón observado en los tres casos fue el que se denominó “mosaico”, que consta de células de diferentes tamaños y formas con muy poco espacio entre ellas (fig. 2.3 A).

En la única muestra proveniente de la laguna salina continental La Salada, constituida principalmente por fragmentos del alga *Chara* sp., se encontraron tres tipos morfológicos de traustquitriales sobre los cebos adicionados. A partir de este material, se obtuvieron 4 cepas, una de las cuales (LSA4) sólo pudo mantenerse en cultivo durante el primer mes (tabla 2.3). Las colonias de los tres restantes aislamientos no pudieron diferenciarse morfológicamente entre sí ni con respecto a las de otras dos cepas obtenidas de la marisma de Punta Rasa (tabla 2.4).

2.4.1.2- Aislamientos del litoral marítimo antártico (Caleta Potter, Isla 25 de Mayo, 2005)

En las dos muestras legadas del litoral marítimo antártico argentino, dominadas principalmente por fragmentos de algas y con restos microscópicos de crustáceos, se observaron traustquitriales con más de una variante morfológica. Como no lograron prosperar en los granos de polen de pino adicionados, se utilizaron larvas de *Artemia persimilis* como cebos, las cuales resultaron efectivamente colonizadas y se sembraron en medio agarizado GPY, en el cual no se observó desarrollo de colonias. Por tal

motivo, los cebos colonizados se transfirieron sucesivamente a nuevos cebos (*A. persimilis*) en agua de mar hasta obtener cultivos con un solo tipo de traustoquitrial. Se aislaron así 2 cepas de cada muestra (tabla 2.3), que pudieron diferenciarse luego por el tipo de colonia desarrollada en medio SSA (tabla 2.4); dos de los aislamientos presentaron colonias con una red ectoplasmática particularmente prominente. Otra particularidad en el tratamiento de estos materiales fue la incubación a 4°C de todas las muestras y los cultivos.

2.4.1.3- Aislamientos de la albufera Mar Chiquita (Buenos Aires, 2005)

Se registró la presencia de traustoquitriales en 39 de las 42 muestras de la albufera Mar Chiquita incubadas con granos de polen de *Pinus* sp. y *Artemia persimilis*, descartándose las otras 3, que consistían en fragmentos de hojarascas y de *Salicornia* sin signos visibles de descomposición. Como la mayoría de los organismos observados no prosperaban en medio agarizado GPY, se formuló el medio de cultivo MC (tabla 2.1), con el que se lograron obtener 89 cepas. Otra de las mejoras introducidas durante esta serie de aislamientos fue un mayor control del crecimiento de microorganismos contaminantes implementando el agregado de 5 mg l⁻¹ del antimicótico metil-1(butilcarbamoil)-2-bezimidazolecarbamato (benomyl®, Davidse 1986) a las muestras con restos de plantas vasculares, y la utilización de 0,1 g l⁻¹ de cloranfenicol en los casos en que el crecimiento bacteriano no pudo ser detenido con los antibióticos utilizados habitualmente.

El gran número de cepas obtenidas a partir de estos materiales no sólo se debió al mejoramiento de las condiciones de cultivo (particularmente al éxito del medio MC), sino también a que para cada muestra sembrada en medio agarizado se aislaron varias colonias monoclonales. Esta elevada cantidad de cepas hizo necesario establecer un criterio para diferenciar réplicas de un mismo organismo y de este modo disminuir el número de cultivos a manejar. Con este fin, se procedió a caracterizar la morfología de las colonias en medio sólido, encontrándose algunos patrones particulares, que se muestran en la figura 2.3. Se observaron distintas variantes del patrón tipo “mosaico”, que fue el más difundido (fig. 2.3 A-D y H). Otros tipos registrados correspondieron a colonias con crecimiento tridimensional, que dieron origen a estructuras morfológicamente similares a una mórula (fig. 2.3 F-G), o a paquetes sarcinoides (fig.

2.3 I). También se encontró un tipo de colonias con arreglo celular tipo “mosaico” y crecimiento tridimensional sólo en las zonas centrales, al que se denominó “mayólica” (fig. 2.3 E), por recordar la regularidad de este tipo de cerámicas.

En base a estos resultados, los aislamientos de cada muestra se agruparon como se muestra en la tabla 2.4. De este modo, las cepas de Mar Chiquita constituyeron en total 33 grupos diferentes. En general, para cada una de las muestras solamente se obtuvo un tipo de colonia, aunque para unas pocas (2, 5, 6, 12, 46), que contenían principalmente restos vegetales y fragmentos de algas, pudieron aislarse dos formas de colonias distintas (MC2A y MC2H, por ejemplo, en la mencionada tabla). El morfotipo observado con mayor frecuencia (en 15 grupos) fue aquel de color naranja (o rosa-anaranjado), en general convexo (o elevado), con superficie húmeda y patrón celular en “mosaico” (indicado en la tabla 2.6 bajo el código 1). También se registraron en más de un grupo colonias con el patrón en “mosaico”, pero de color naranja-amarillo, convexas y con superficie muy húmeda (código 4), o de color naranja, pulvinadas y con superficie de aspecto seco (código 8). Otro tipo de colonia común a varios grupos fue el caracterizado por el color crema-amarillo, gran elevación (pulvinadas), superficie de aspecto seco y patrón celular tipo “mórula” (código 2). Finalmente, 6 cepas (MC5C, MC9B, MC12A2, MC15A, MC32B-C, MC46B) desarrollaron colonias con rasgos particulares, que permitieron diferenciarlas del resto.

2.4.1.4- Aislamientos del litoral marítimo y estuarios de la Patagonia, y sur de la provincia de Buenos Aires (2006-7)

La presencia de distintos tipos morfológicos de traustequitiales se observó en 42 de las 45 muestras obtenidas durante la tercera campaña de recolección realizada en una amplia variedad de ambientes acuáticos salinos de la Patagonia Argentina y el extremo sur de la provincia de Buenos Aires (VI a XII), y en los materiales legados de Las Grutas (V) y del Canal de Beagle (XIII). Las únicas tres muestras en las que no se encontró signo de traustequitiales correspondieron a restos animales secos y agua con cristales de sal más allá de la línea de deposición del intermareal en la zona de Comodoro Rivadavia; en el último caso, tampoco se observó la presencia de ningún otro microorganismo. Se realizaron 35 aislamientos, que representaron toda la diversidad registrada en los cebos y los ambientes muestreados. El único sitio del que

no pudieron obtenerse representantes fue el litoral marítimo de la zona de la ciudad de Puerto Madryn (VIIa), por problemas de contaminación fúngica durante el proceso de aislamiento. Para evitar la redundancia de aislamientos, se eligió un único representante de aquellos que provinieran de materiales de un mismo lugar y cuyas colonias presentaran rasgos morfológicos no distinguibles. Las muestras 2, 19, 26, 33, 34, 41, 48, 49 y 50, consistentes mayormente en restos de algas o detritus provenientes de cangrejales, resultaron fuente de más de un tipo morfológico de traustoguitrial (en medio sólido y cebos) (tabla 2.3).

Los rasgos morfológicos de las colonias de las cepas aisladas permitieron diferenciar 21 grupos, que se identifican con un código numérico en la tabla 2.4. Entre los patrones particulares puede mencionarse el caso de las cepas S1 y S19Sch, cuyas colonias fueron tan pequeñas que se designaron bajo el nombre de “punteadas”. Por su parte, las de la cepa S34r desarrollaron redes ectoplasmáticas tan prominentes que pudieron ser fácilmente observadas bajo lupa binocular (20X). Otro tipo particular fue el denominado “cerebroide” (cepas S44, S48cmc y S49cmc), por presentar elevaciones y depresiones similares a las circunvoluciones y surcos de la corteza cerebral.

Los aspectos metodológicos que se ajustaron para obtener estos cultivos puros se resumen en las siguientes líneas. En primer lugar, se amplió sistemáticamente la diversidad de cebos empleados. Se encontró que los granos de polen de *Liquidambar* sp. resultaron más colonizados por las traustoguitriales que los de pino, aunque ambos fallaron como cebos en algunas muestras, particularmente en aquellas dominadas por restos animales (por ejemplo para la cepa S3). En esos casos, el empleo de larvas de *A. persimilis* muertas por calor resultó más exitoso. Durante una primera serie de aislamiento, los cebos colonizados se sembraron en placas con el nuevo medio formulado MC, obteniéndose 17 nuevas cepas (tabla 2.3). Las primeras colonias de las traustoguitriales se detectaron bajo lupa binocular generalmente 4 días después de la siembra, fueron transferidas a medio fresco y se cubrieron con una gota (30 µl) de agua de mar estéril. Luego de una semana, las tareas de aislamiento se dificultaron debido a la proliferación de otros microorganismos, exceptuando el caso de los cultivos sin contaminación, en los cuales las colonias de traustoguitriales pudieron continuar apareciendo hasta 30 días después de haber inoculado con los cebos colonizados.

Se llevó a cabo una segunda serie de aislamientos para obtener colonias puras de aquellas traustoguitrias que no pudieron ser aisladas en una primera instancia. En esta etapa se empleó una variante del medio MC denominada TMPP y se obtuvieron 7 cepas diferentes entre sí y respecto a las anteriores (tabla 2.3). Las traustoguitrias presentes en cebos que no pudieron proliferar en ninguno de estos dos medios de cultivo se transfirieron a nuevas placas de Petri con agua de mar y cebos estériles hasta obtener cultivos puros según inspección microscópica, tal como se procediera con los aislamientos de la Antártida. De este modo se obtuvieron 11 cepas más, de las cuales 9 pudieron luego prosperar en medio SSA y 2 permanecieron en agua de mar con granos de polen (tabla 2.3) debido a una contaminación bacteriana persistente a pesar de la presencia de antibióticos en la concentración referida en la sección 2.3.2.

El estricto control de los microorganismos contaminantes fue otro de los aspectos fundamentalmente considerados durante la segunda serie de aislamientos, especialmente para aquellas cepas de crecimiento lento. El empleo de subcultivos sucesivos en agua de mar con cebos resultó un procedimiento general útil para disminuir la concentración de contaminantes. Respecto al crecimiento de hongos filamentosos, este se inhibió mediante la adición de 5 mg l⁻¹ de benomyl® en cultivos sucesivos en agua de mar y cebos. Por otro lado, para separar levaduras y otros protistas, se realizaron transferencias cíclicas entre cultivos en medio agarizado y en agua de mar con cebos. Finalmente, la proliferación bacteriana fue suprimida utilizando una combinación de cloranfenicol, kanamicina y tetraciclina (0,1 g l⁻¹ de cada uno) cuando el agregado previo de penicilina y estreptomina no había inhibido completamente el crecimiento de los organismos procariotas.

2.4.1.5- Aislamientos de la laguna hipersalina Vilama (Jujuy) y del estuario de Bahía Blanca (2008)

La presencia de un único tipo de traustoguitria fue observada en cada una de las dos muestras legadas durante el año 2008, una consistente en sedimentos y agua de la laguna hipersalina Vilama y la otra conteniendo fragmentos de *Spartina sp.* y de biodermas proveniente de la marisma de Bahía Blanca en la zona de Puerto Rosales. En el primer caso, ningún otro microorganismo fue detectado en la muestra. Se aislaron dos cepas (una de cada muestra, tabla 2.3) de crecimiento muy lento, registrándose las

primeras colonias a partir de las 2 semanas de haber inoculado las placas que contenían medio SSA.

2.4.1.6- Aislamientos del litoral marítimo de Santa Cruz (2009)

En una de las tres muestras de fragmentos de algas legadas provenientes del litoral marítimo de Santa Cruz, tomada en la reserva de Cabo Blanco, el agua del material presentó una coloración rojiza y no se detectó proliferación de traustoguitrales ni de ningún otro microorganismo luego de agregar los cebos. En aquella originaria de la zona de Puerto San Julián se encontraron al menos 3 tipos de traustoguitrales con rasgos morfológicos diferenciados sobre los granos de polen mientras que en la correspondiente a la zona de Puerto Deseado se observó un solo tipo morfológico. Utilizando el medio de cultivo MC, se obtuvieron 3 cepas en el primer caso y 1 en el segundo; otro aislamiento diferente pudo realizarse a partir del material de Puerto San Julián empleando el medio SSA en una segunda instancia (tabla 2.3). Los rasgos de las colonias de estas cepas en medio sólido permitieron separarlas en 3 grupos morfológicos (tabla 2.4).

2.4.2- Composición del medio y crecimiento de las cepas

Se seleccionaron 27 cepas del litoral marítimo patagónico con diferentes características morfológicas y sitio de origen y la cepa *A. limacinum* SR21 para comparar su crecimiento en los nuevos medios de cultivo formulados (MC y TMPP) y en otros utilizados frecuentemente para traustoguitrales (KMV, SSA, H y GPY), a fin de verificar la efectividad de los medios propuestos en este trabajo para el cultivo de la mayoría de los aislamientos locales. Para esto, y considerando que algunas de las cepas (como S1, S19Sch o S41sp) tenían una velocidad específica de crecimiento muy baja en medio sólido y que su proliferación no pudo ser detectada en cultivos líquidos, se diseñó una metodología alternativa que permitiera medir el crecimiento de acuerdo a una escala arbitraria basada en las características morfológicas de las colonias (ver el ítem 2.3.3.2 de Materiales y Métodos).

Los resultados del estudio comparativo de crecimiento de los aislamientos en los medios agarizados ensayados se muestran en la tabla 2.5. De acuerdo a ellos, las

traustoquitriales estudiadas pudieron separarse en 3 grupos. Por un lado, el Grupo 1, que incluye los aislamientos con VCRs de hasta 2 en todos los medios de cultivo (21,4 % del total). Por otro lado, el Grupo 3, que contiene aquellas cepas con VCRs de 3 y 4 en prácticamente todos los medios (32,1 % del total y *A. limacinum* SR21). Finalmente, con características intermedias, el Grupo 2, que abarca los aislamientos restantes (46,4 %); ellos presentaron VCRs de 0-2 en GPY, 2-3 en KMV, H y SSA, y 3-4 en MC y TMPP.

El Análisis de Varianza mostró que tanto la cepa como el medio de cultivo tuvieron un efecto estadísticamente significativo sobre el crecimiento ($P < 0,0001$ y $P = 0,0003$ respectivamente, ver tabla A.2 en el Apéndice). El medio GPY presentó la Eficiencia para Cultivo (EA) y la media de los VCRs de las cepas que crecen en él ($\bar{X}_{VCR}$) más bajas (tabla 2.5). Si bien el medio SSA también tuvo una baja $\bar{X}_{VCR}$, su EA fue la más elevada. Respecto a los medios H y KMV, estos presentaron $\bar{X}_{VCR}$ intermedias y altas EA. Finalmente, en los medios MC y TMPP, se registraron EA altas y las $\bar{X}_{VCR}$ más elevadas. La comparación de las $\bar{X}_{VCR}$ obtenidas para los medios de cultivo ensayados mediante un análisis de contraste múltiple de rangos identificó tres grupos homogéneos que presentaron diferencias estadísticas significativas ($P < 0,0001$) entre ellos: GPY-SSA, H-KMV y KMV-MC-TMPP (tabla A.3 en el Apéndice).

2.4.3- Efecto de la concentración de agar y de la actividad agua sobre el crecimiento

Se seleccionaron 10 de las cepas utilizadas en el ensayo anterior en base a su proliferación acotada en medio con agar 3% m/v con el fin de estudiar el efecto de la concentración de dicha sustancia sobre el crecimiento de las colonias. Los VCRs registrados en los medios MC, TMPP, H y SSA con 1, 2 y 3 % m/v de agar se presentan en la tabla 2.6. Si bien los VCRs de algunas cepas no variaron al modificar la concentración de agar (como S3), para la mayor parte de ellas, se encontró que los VCRs disminuyeron al incrementarse la concentración de dicho compuesto; estas variaciones resultaron más marcadas en MC y TMPP que en H y SSA. El análisis de varianza de los datos (tabla A.4 en el Apéndice) indicó que el crecimiento fue significativamente diferente según la cepa ($P < 0,0001$), el medio de cultivo ($P <$

0,0001) y el porcentaje de agar ($P = 0,0025$), y que las interacciones porcentaje de agar $\times$ medio de cultivo y cepa $\times$ medio de cultivo también resultaron significativas ($P = 0,0001$ y $P < 0,0001$ respectivamente). Finalmente, el análisis de contraste múltiple de rangos reveló que las cepas crecieron en forma significativamente diferente en medio con 3 % de agar respecto a 1 y 2 % (tabla A.5 en el Apéndice).

De acuerdo a los resultados obtenidos, se verificó si la concentración de agar, o más probablemente las pequeñas moléculas acarreadas como impurezas en él, podía afectar la disponibilidad de agua. El análisis de regresión entre el porcentaje de agar y la actividad agua (a_w) de los medios de cultivo mostró que estas variables tienen una relación lineal negativa moderadamente fuerte (fig. 2.4 A), con un coeficiente de correlación de $-0,618771$, y un valor de P del modelo $< 0,0001$. El porcentaje de humedad del medio de cultivo se comportó del mismo modo que la a_w en relación al porcentaje de agar (fig. 2.4 B), registrándose, en este caso, un coeficiente de correlación de $-0,801158$, y un valor de P del modelo $< 0,0001$.

2.4.4- Selección de las condiciones de cultivo de las cepas aisladas

La tabla 2.7 presenta las condiciones de cultivo seleccionadas para la obtención de biomasa de cada una de las cepas aisladas. El medio de cultivo elegido fue MC para el 80,0% de los aislamientos, KMV para el 10,0%, KMV 10X para el 1,7% y SSA para el 8,3 %. Respecto a la agitación, el 55,0% de las cepas prosperó a 100 rpm, el 23,3% sólo lo hizo con agitación horizontal (100 opm) y el 21,7% restante requirió condiciones estáticas. La temperatura de incubación seleccionada fue 25°C para la mayoría (81,6%), excepto para algunas cepas (11,7%), que sólo prosperaron a 18°C, y para las de la Antártida (4°C). Es importante destacar que ninguna de los aislamientos, aún en las condiciones ensayadas establecidas preliminarmente como las más adecuadas para la obtención de biomasa, alcanzó valores mayores o iguales a 5 g l^{-1} de peso seco luego de dos semanas de incubación.

2.5- Discusión

2.5.1- Presencia de traustoitritiales en humedales de la Argentina

La presencia de traustoitritiales fue registrada para una amplia variedad de humedales salinos de la Argentina, desde las lagunas salinas altamente irradiadas de Jujuy hasta el litoral marítimo antártico, observándose representantes en todos los ambientes muestreados, incluso en aquellos en los que no se detectara salinidad (como la laguna de origen pluvial de Punta Rasa). Si bien la caracterización morfológica sobre cebos se presenta en el próximo capítulo, estos rasgos fueron meticulosamente observados durante el proceso de aislamiento, a fin de identificar los organismos que se buscaba obtener puros en cultivo. A partir de estas observaciones pueden esbozarse algunas tendencias acerca de la ubicua presencia de estos microorganismos para la Argentina, y sobre su preferencia por diferentes tipos de sustratos.

Respecto a los pocos materiales en los que no se encontró signo de traustoitritiales (10% del total), en algunos de ellos tampoco se observó ningún otro tipo de organismo, como en la muestra con agua de mar con coloración rojiza proveniente de Cabo Blanco (que probablemente contuviera algún pigmento algal inhibidor del crecimiento microbiano) o en las dos muestras con depósitos de sal de la zona de Comodoro Rivadavia. Otros materiales en los que no fue posible detectar traustoitritiales fueron los restos vegetales aún sin degradar obtenidos en la zona de Mar Chiquita. Estas observaciones pueden explicarse considerando que la abundancia de los traustoitritiales es escasa durante los primeros estadios de descomposición vegetal, debido a sustancias inhibitorias del crecimiento producidas por las plantas (Raghukumar 2002).

Las muestras en las que se encontró más de un tipo morfológico de traustoitritial fueron aquellas que contenían detritus de cangrejales (como las de San Antonio Oeste) o fragmentos de varios tipos de algas en descomposición (como los arrastrados en el frente de marea en las zonas de Puerto Madryn, Puerto Pirámides y Las Grutas, o los acumulados en el margen de la laguna La Salada). Es interesante destacar que, tal como señalara Vishniac (1956) los materiales provenientes de zonas

contaminadas (y ricos en materia orgánica) presentaron mayor riqueza de traustoitritiales. El estuario de Bahía Blanca constituye un interesante ejemplo ilustrativo al respecto: en la muestra proveniente de la marisma de Puerto Rosales se encontró un solo tipo morfológico de traustoitritial, en muy baja concentración, mientras que a partir de la proveniente de la zona de descarga cloacal del Puerto Ingeniero White se obtuvieron 3 cepas diferentes.

El procesamiento del detritus marino ha sido ampliamente estudiado en relación a la actividad bacteriana, y aunque poco se sabe acerca de la contribución de los hongos y las traustoitritiales, se presume que ocuparían nichos ecológicos diferentes (Newell 1992). Las bacterias, que presentan velocidades de crecimiento más elevadas y alta afinidad por el sustrato, se encuentran principalmente en las superficies de la materia orgánica disuelta, mientras que los hongos filamentosos, con tasas de crecimiento más bajas pero con capacidad para penetrar las partículas, predominan en el detritus particulado de origen lignocelulolítico (Benner et al. 1984). Por su parte, las traustoitritiales parecen estar principalmente asociadas al material de origen algal; su mayor abundancia respecto a los hongos filamentosos podría deberse a que las algas se descomponen en general más rápido que las plantas vasculares, carecen de lignocelulosa y presentan una relación molar C:N baja, por lo que las traustoitritiales podrían, a través de la producción de zoosporas, colonizar y penetrar este sustrato más rápidamente (Raghukumar 2004). De acuerdo con lo anteriormente expuesto, la mayor parte de los aislamientos locales provinieron de muestras con fragmentos de algas.

En cuanto a los sustratos y ambientes en los que se ha explorado la presencia de traustoitritiales a escala global, un gran número de estos trabajos se ha realizado a partir de muestras de agua de mar de USA (Sparrow 1936, Goldstein 1963a y b, Goldstein & Belsky 1964), Europa (Gaertner 1968, Schneider 1969a y b, Ulken 1979, Gaertner & Raghukumar 1980, Bongiorno & Dini 2002), India (Raghukumar et al. 1990 y 2001) y Japón (Nakahara et al. 1996, Kimura et al. 2001, Huang et al. 2003) y sólo dos de ellos corresponden a lagunas salinas (Amon 1978, Barclay 1994) de USA. Respecto a los estuarios, los manglares constituyen prácticamente el único tipo estudiado, no habiéndose encontrado datos sobre la presencia de traustoitritiales para las marismas o lagunas costeras típicas de las costas templadas del Atlántico sudoccidental. Cabe finalmente mencionar que los únicos registros previos para

Latinoamérica fueron aportados por Ulken para manglares de Brasil (1966 y 1983) y Costa Rica (Ulken et al. 1990). En este contexto, los resultados de este trabajo suman información acerca de la ocurrencia de estos microorganismos en sitios poco caracterizados, como los estuarios templados o las lagunas salinas continentales. Algunos de ellos en los que se encontraron traustquitriales constituyen reservas naturales reconocidas internacionalmente (como Punta Rasa o Mar Chiquita) por lo que el conocimiento de su biodiversidad resulta de particular interés.

En lo que concierne a las lagunas salinas, estos humedales incluyen una gran heterogeneidad de ambientes debido a las variaciones de tamaño, profundidad, salinidad, origen de las aguas de recarga (nival, subterránea, subterránea termal, etc.) y sedimentos, los cuales suelen asociarse con altos grados de endemismos (Malvarez 1999). Algunas de las lagunas salinas de la Argentina han sido exploradas en esta tesis, encontrándose en todas ellas traustquitriales, incluso en la laguna hipersalina Vilama, que por sus condiciones extremas alberga escasa biodiversidad. Por otro lado, la laguna La Salada fue una de las zonas que presentó mayor diversidad de traustquitriales, que podrían asociarse en principio al importante aporte de macrófitas y macroalgas que recibe este cuerpo de agua templado. Los aislamientos provenientes de estos humedales ubicados en sitios alejados del mar podrían ser especies endémicas, y diferir de las restantes 4 cepas originarias de las otras lagunas (Ib, VIa y f) que han perdido más recientemente su conexión con el mar.

También se obtuvieron registros de traustquitriales en los tres tipos de costas de nuestro país (pampeanas, patagónicas y antárticas). El litoral patagónico sería un ambiente particularmente beneficioso para el desarrollo de estos microorganismos por presentar altas amplitudes de marea que dejan al descubierto un extenso intermareal con zonas de acumulación de material y por la riqueza de sus aguas de origen subantártico. Por su parte, el sector antártico argentino también resultaría un área favorable por encontrarse dentro de la región de más alta productividad (Antártida marítima) y porque sus aguas presentan altas concentraciones de crustáceos microscópicos (krill). La ocurrencia de traustquitriales en ambientes con meiofauna dominada por crustáceos en relación a la actividad quitinolítica de estos microorganismos ha sido comentada previamente por Ulken et al. (1990). Entre los registros previos de traustquitriales en ambientes antárticos puede citarse su hallazgo en la columna de agua (Bahnweg &

Sparrow 1974), en sedimentos anaerobios (Reimann & Scharage 1983) y en bacterias creciendo sobre mucus de diatomeas sobre el hielo flotante (Reimann & Schaumann 1993).

2.5.2- Mejoramiento de la metodología de aislamiento

El ajuste de los procedimientos estándares de aislamiento permitió la obtención de más de 140 nuevos aislamientos de traustquitriales de ambientes fríos y templados argentinos. Las tasas de crecimiento particularmente bajas y los requerimientos específicos de algunas de estas cepas sugerirían que podrían ser elusivas a ser aisladas siguiendo los procedimientos estándares.

La gran cantidad de muestras recolectadas en la laguna de Mar Chiquita y el meticuloso seguimiento de cada una de ellas planteó la necesidad de establecer un criterio para reducir la cantidad de cepas a manejar. Se propuso entonces comparar la morfología de las colonias para reconocer a los aislamientos provenientes de una misma muestra que pudieran ser redundantes, es decir réplicas de un mismo organismo. De este modo se pudo establecer que los 89 aislamientos de Mar Chiquita representarían no más de 33 organismos diferentes. Es importante aclarar que, si bien los rasgos morfológicos en polen para 21 de estos individuos se presentan en el próximo capítulo, diferentes tipos de colonias correspondieron a organismos con diferentes rasgos en cebos y viceversa. Este criterio resultó de suma utilidad durante las tareas de aislamiento siguientes al momento de seleccionar clones, especialmente en las muestras que contenían más de una especie. Adicionalmente, durante los ensayos en cultivo con las cepas patagónicas se encontró que el aspecto morfológico de las colonias de cada cepa (color, elevación, superficie y patrón celular, tabla 2.4) fue constante en todos los medios de cultivo ensayados. Estos resultados avalan la utilización de la comparación de los morfotipos coloniales como una herramienta simple y rápida para la caracterización preliminar de la diversidad de traustquitriales en una muestra, tal como ha sido aplicado previamente en otros microorganismos como los hongos (Watrud et al. 2006).

La caracterización morfológica preliminar (observaciones en cultivos con cebos y rasgos de las colonias en medio sólido) resultó útil para mostrar que los aislamientos

constituyen cepas individuales representantes de al menos gran parte de la biodiversidad de traustoguitriales de ambientes fríos y templados de la Argentina. El perfil de crecimiento diferencial en los medios ensayados avala este supuesto de individualidad genética. Es interesante notar que aquellas cepas que compartieron los rasgos morfológicos pero que provinieron de sitios diferentes podrían incluso no estar emparentadas cercanamente, especialmente si su origen corresponde a una zona con alto grado de endemismo (Rosa et al. 2006). De hecho, el concepto de especies cosmopolitas para la biota microbiana está actualmente en cuestionamiento (Logares 2006) dado que muchas especies que se habían reconocido tradicionalmente como tales son ahora consideradas como ensamblajes de especies crípticas de taxas restringidos regionalmente (Gómez et al. 2002).

De acuerdo a los resultados obtenidos, el uso de una diversidad de cebos sería el primer aspecto a considerar para mejorar el éxito en el aislamiento. Por ejemplo, aquellas traustoguitriales provenientes de muestras con detritus de origen animal, no prosperaron en granos de polen pero sí lo hicieron sobre larvas de *Artemia*. Este fue el caso de los aislamientos de la Antártida, en cuyas muestras se habían observado fragmentos de crustáceos. En este sentido, la elección del cebo adecuado en función del tipo material recolectado coincidiría con la propuesta de algunos investigadores de recrear las condiciones del ambiente natural para lograr el cultivo de organismos recalcitrantes (Kaerberlein et al. 2002). Otro procedimiento tendiente a imitar las condiciones naturales fue la cobertura de las colonias limpias con una gota de agua de mar, ampliamente difundido en otros “hongos” zoospóricos como las quitridiales (Fuller & Jaworski 1987). Para los aislamientos locales resultó muy útil al estimular la formación de zoosporas, facilitar la dispersión y como consecuencia mejorar el crecimiento de los clones en aislamiento. Finalmente, otro factor considerado fue la temperatura de incubación, adaptándose a los valores de los ambientes de los cuales proviniera el material, como en el caso de las muestras de la Antártida (4°C)

La incubación y observación de los cultivos durante períodos más prolongados, especialmente aquellos en los que se considera que en principio no hay signos visibles de crecimiento, es una de las claves para el éxito en el cultivo de aquellas cepas de crecimiento lento que nunca alcanzan altos rendimientos (Leadbetter 2003). Varias de las cepas locales requirieron períodos de incubación largos para desarrollar colonias, en

algunos casos de hasta 30 días luego se sembrar, como sucedió por ejemplo para LGII o S48Sch; en este sentido, podrían considerarse elusivas a las técnicas de aislamiento estándares, que sugieren conservar los cultivos por no más de 10 días. Estos resultados resaltan la importancia de mantener un estricto control de la contaminación como un aspecto fundamental para el aislamiento de aquellas traustoguitriales que parecieran ser “elusivas” debido a su baja tasa de crecimiento. El uso del fungicida benomil® y los antibacterianos (alternativos) cloranfenicol, kanamicina y tetraciclina suprimieron el crecimiento de hongos filamentosos y bacterias respectivamente sin modificar la proliferación de las traustoguitriales, exceptuando a las cepas de la Antártida y SCIV cuyo crecimiento se vio inhibido por el agregado de cloranfenicol en las concentraciones referidas. Para la contaminación con levaduras y con otros protistas (incluyendo representantes del género *Labyrinthula*), sus colonias pudieron ser separadas de las de las traustoguitriales en medio sólido luego de haber disminuido su concentración en sucesivas transferencias en cultivos con agua de mar y cebos.

La formulación de nuevos medios de cultivo fue otra de las estrategias efectivas para cultivar traustoguitriales “elusivas”, particularmente aquellas que no crecían o lo hacían defectuosamente en los medios estándares presentados en la literatura, como el GPY. El medio MC, diseñado en este trabajo, permitió la obtención de 89 aislamientos. Respecto a su composición, contiene la misma fuente principal de carbono y nitrógeno que el medio GPY, en una concentración diez veces menor, además de los nutrientes del medio KMV, ácido glutámico y macerado de maíz (CSL) (tabla 2.1). Estos dos últimos compuestos se incluyeron en el medio MC considerando las observaciones de Iida et al. (1996) y Yokochi et al. (1998), quienes encontraron respectivamente que, la adición de glutamato monosódico al medio GPY incrementó significativamente el crecimiento de una cepa de *T. aureum*, y que la utilización de CSL como fuente de nitrógeno resultó en niveles máximos de peso seco en la cepa *A. limacinum* SR21. Por su parte, el otro nuevo medio formulado, TMPP (que contiene iguales cantidades de MC y Caldo Cerebro Corazón, tabla 2.1), resultó efectivo para las traustoguitriales con preferencia por el detritus animal (esto es, aquellas cebadas en larvas de *Artemia*) que no habían podido ser aisladas en MC.

2.5.3- Estudios en Cultivo

Se comparó la efectividad de los nuevos medios formulados y otros de uso estándar para sostener el crecimiento de los aislamientos como una aproximación para establecer las condiciones más adecuadas de cultivo (y aislamiento) de nuevas cepas de traustoguitriales. La escala arbitraria basada en las características de las colonias que se propuso en este trabajo de tesis confirmó que no todas las cepas locales pudieron crecer exitosamente (esto es, alcanzar un $VCR \geq 2$) en todos los medios ensayados. El análisis estadístico de los resultados reveló que los medios estudiados podrían separarse en 3 grupos homogéneos de acuerdo a la media de los VCRs de las cepas que crecen en cada uno ($\bar{X}_{VCR}$). Los valores más bajos se obtuvieron en GPY y SSA por diferentes razones. El medio GPY fue adecuado para el cultivo de solamente unas pocas cepas, las pertenecientes al denominado “Grupo 3” (tabla 2.5), que alcanzaron altos VCRs en él. Aunque la $\bar{X}_{VCR}$ también fue baja para el medio SSA, éste tuvo la Eficiencia de Cultivo (EC) más elevada, dado que todos los aislamientos pudieron prosperar en él pero ninguno alcanzó un VCR mayor a 2. La mayoría de las cepas locales (ubicadas en el Grupo 2) presentaron los VCRs más elevados en los medios MC y TMPP.

De acuerdo a estos resultados, el medio de cultivo más adecuado entre los ensayados para el proceso de aislamiento sería el MC, formulado en este trabajo. Si bien el crecimiento de los aislamientos no fue significativamente diferente con respecto al registrado en el medio TMPP, este último es descartado frente a MC dado que su composición es más compleja. Aunque el medio sugerido no haya cubierto los requerimientos nutricionales de todas las cepas (por ejemplo, ninguna de las pertenecientes al Grupo 1 alcanzó valores de VCRs superiores a 1 en él), permitió un rápido desarrollo de la mayoría de las colonias, que pudieron ser manipuladas fácilmente. Para aquellas traustoguitriales que se observaran en los cebos y no pudieran ser aisladas en MC se recomienda el medio SSA como segunda opción, a pesar de que el crecimiento de las colonias es más pobre, y su manipulación es más dificultosa.

Se analizó además el efecto de la concentración del agente solidificante del medio sobre el crecimiento basándose en los comentarios de Vishniac (1956, ver ítem 2.2.2 de la Introducción) y en la observación de que algunas de las cepas se habían mostrado particularmente sensibles a este factor durante su aislamiento. La comparación

estadística de los datos sugiere que el aumento en la concentración de agar de 1-2% a 3% m/v tuvo un efecto negativo en el crecimiento de los aislamientos ensayados, el cual resultó dependiente del medio de cultivo. Se encontró además una relación lineal significativa estadísticamente entre el porcentaje de agar y las variables dependientes a_w y porcentaje de humedad del medio de cultivo. Esto sugiere que el porcentaje de agar, o más probablemente las impurezas acarreadas con él, podría influenciar el agua disponible y como consecuencia el crecimiento de las traustoquitriales en medio sólido. De hecho, en los medios MC con 3% de agar y TMPP con 2 y 3% de agar, condiciones con las a_w más bajas y porcentajes de humedad menores al 95%, se registró una disminución en el crecimiento de las cepas. Este efecto de la concentración de agar no pareciera ser restrictivo en medios más diluidos como H y SSA, en los cuales la a_w y el porcentaje de humedad permanecerían por encima del umbral requerido para la proliferación de estos microorganismos.

Finalmente respecto a las condiciones de cultivo seleccionadas para la obtención de biomasa de cada una de las cepas aisladas, se encontró que el medio MC y condiciones de temperatura de 25°C y agitación de 100 rpm resultaron adecuadas para la mayor parte de ellas, aunque algunas requirieron agitación aún más suave (100 opm). Aproximadamente un 20% de las cepas no mostró signos visibles de crecimiento en cultivos líquidos, hecho que dificulta considerablemente la obtención de material para los estudios analíticos necesarios para su identificación. Los bajos valores de peso seco obtenidos, coincidentes con aquellos registrados para otras cepas aisladas de ambientes fríos (Bowles et al. 1999) y muy inferiores a los reportados para otras cepas como *A. limacinum* SR21 en condiciones estándares similares (Yokochi et al. 1998), plantean una restricción en cuanto a la utilización de los aislamientos locales con fines biotecnológicos. Sin embargo, podrían resultar particularmente interesantes para otro tipo de estudios biológicos si se considera que este crecimiento limitado podría estar asociado a un nicho ecológico diferente al de la mayoría de las especies estudiadas previamente.

2.6- Conclusiones

Se aislaron más de 140 nuevas cepas de traustoguitriales, representativas de una gran parte de la biodiversidad presente en los humedales salinos de la Argentina, incluyendo lagunas salinas continentales, estuarios y el litoral marítimo. Estos aislamientos constituyen los primeros reportes de traustoguitriales para dichos ambientes, muchos de los cuales presentan condiciones muy particulares (como la laguna Vilama, la laguna La Salada o la albufera Mar Chiquita) y por tal motivo podrían albergar especies endémicas. Se encontraron representantes en todos los ambientes muestreados, registrándose más de un tipo morfológico en aquellos con mayor carga de materia orgánica, y particularmente en materiales provenientes de cangrejales o con abundante cantidad de algas en descomposición. La mayoría de estas cepas presentó requerimientos diferentes a los descriptos en la literatura, por lo que su cultivo requirió del ajuste de los procedimientos de aislamiento.

Las características de las colonias resultaron de suma utilidad para reconocer distintos tipos morfológicos de traustoguitriales y reducir el número de cepas redundantes durante las tareas de aislamiento. Esto fue particularmente útil al trabajar con un gran número de muestras, como las obtenidas en las campañas de la albufera de Mar Chiquita o de los estuarios y el litoral marítimo patagónicos. A partir de este criterio, el número de cepas diferentes (en cuanto a sitio de origen y rasgos morfológicos) se redujo a 86, de las cuales 63 se encuentran depositadas en una colección de cultivo (tabla 2.3). Su completa caracterización morfológica en cultivos de agua de mar y cebos se aborda en el capítulo siguiente.

La figura 2.5 presenta un diagrama de flujo en el que se integran los procedimientos tradicionales de aislamiento con las modificaciones adoptadas en este capítulo. Se propone la aplicación de tratamientos alternativos de acuerdo a la naturaleza de la muestra, las características de la traustoguitriales en aislamiento y la presencia de microorganismos contaminantes. En primer lugar, se podría seguir el camino que va de 1 a 6 (líneas continuas); las mejoras sugeridas en base a los resultados obtenidos (indicados con letra cursiva) incluyen, entre otras, el uso de más de un tipo de cebo y medio de aislamiento, la observación de los cultivos por al menos 30 días y la cobertura de las colonias transferidas con una gota de agua de mar. Se propone también

la observación de la morfología de la colonia como un método sencillo para identificar la pureza de los aislamientos (ramificación 6), considerando que esta característica resultó estable para todas las cepas durante los ensayos en cultivo. La ramificación 1' no ha sido ensayada en este trabajo de tesis, pero es sugerida en la literatura (Porter *op. cit.*). El empleo de subcultivos sucesivos en cebos y agua de mar se propone como una estrategia tanto para aislar aquellas cepas que presenten poco crecimiento en medio sólido (vía 3' a 3'') como para disminuir la concentración de contaminantes (vía 3' a 3 o ramificación 5'). Para solucionar problemas de contaminación, se sugiere también el uso de cloranfenicol, kanamicina, tetraciclina y benomil®, solos o combinados, según resulte necesario.

En base a los resultados de los estudios en cultivo con las cepas patagónicas, se propone el medio MC, formulado en este trabajo, como el más adecuado para aislar (ramificación 3 en la mencionada figura), y el medio SSA (Porter *op. cit.*) como una segunda alternativa. Los medios “más concentrados” (TMPP y GPY) no mejoraron el crecimiento relativo de las cepas, lo que sugiere que la limitación para el cultivo de los aislamientos locales podría deberse más a la calidad que a la cantidad de nutrientes, descartando la ocurrencia de problemas osmóticos. La concentración de agar habitualmente utilizada del medio de aislamiento no debería ser superior al 2% m/v, ya que este factor mostró estar directamente relacionado con el agua disponible (a_w) y el porcentaje de humedad del medio y tuvo un efecto significativo sobre el crecimiento de las cepas ensayadas; dicho efecto resultó más pronunciado en medios más concentrados. A fines prácticos, la formulación de nuevos medios para el aislamiento de traustquitriales requeriría considerar no sólo la calidad de los nutrientes, sino también la concentración de agar, que debiera ser lo suficientemente alta para facilitar la manipulación de las células y/o colonias, pero lo suficientemente baja para permitir la proliferación de estos microorganismos. La metodología propuesta aquí permitió acceder a nuevas cepas de traustquitriales de la Argentina, algunas de las cuales podrían ser “elusivas”, y podría ser aplicado para mejorar el aislamiento y el estudio de la biodiversidad oculta de este grupo de microorganismos en otros ambientes con similares características.

El medio líquido MC también resultó el más adecuado para la obtención de biomasa en cultivos con agitación para la mayoría de las cepas, aunque ninguna de ellas

presentó niveles de peso seco que puedan sustentar su aplicación con fines biotecnológicos. El crecimiento limitado de los aislamientos locales probablemente sea un reflejo de sus diferencias genéticas respecto a otras cepas estudiadas, y esto las vuelva particularmente interesantes para otro tipo de estudios fisiológicos, ecológicos y evolutivos. Sin embargo, la imposibilidad de algunos aislamientos para proliferar en medio líquido y su escaso crecimiento en medio sólido plantean una limitación en cuanto a la obtención de la biomasa que se requiere para las determinaciones analíticas, como el perfil de PUFA's o la secuencia del gen ARNr 18S actualmente utilizadas para la identificación taxonómica.

CAPITULO III: CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE LA BIODIVERSIDAD DE TRAUSTOQUITRIALES DE ARGENTINA

3.1- Resumen

Los aislamientos se caracterizaron morfológicamente como una primera aproximación al conocimiento de la biodiversidad de las traustoquitriales en los humedales salinos argentinos. La identificación taxonómica tradicional, basada principalmente en las características de la zoosporulación, permitió establecer que se trataba de representantes de los géneros *Ulkenia*, *Thraustochytrium* y *Schizochytrium*. Debido a lo problemático de la identificación taxonómica de estos organismos, no todas las cepas pudieron ser determinadas a nivel específico. Se discuten las discrepancias con las características morfológicas, de desarrollo y hábitats referidos en la literatura. Considerando estas limitaciones, las especies más ampliamente distribuidas en los humedales salinos del país fueron *U. aff. visurgensis*, *T. aff. striatum* y *T. aff. kinnei*. Como una herramienta adicional para la caracterización de la biodiversidad de las traustoquitriales, se analizó la utilidad de la morfología de las colonias y de las condiciones de cultivo para la diferenciación de los aislamientos. La información obtenida en este capítulo constituye un marco referencial para analizar la determinación taxonómica de las cepas desde un criterio más moderno, tal como se abordará en el próximo capítulo.

3.2- Introducción

Tal como se comentara brevemente en el capítulo I, los caracteres morfológicos tradicionales han sido seriamente cuestionados y se encuentran en revisión. La aplicación de otro tipo de información, principalmente bioquímica y molecular, ha permitido realizar rearrreglos taxonómicos, que incluyen la creación de nuevos géneros. Sin embargo, la mayor parte de la literatura taxonómica sobre estos organismos, así como los estudios de abundancia y distribución, se basan en su identificación a partir de los criterios tradicionales. Es decir que la observación de los rasgos morfológicos constituye el punto de partida para caracterizar nuevos aislamientos y poder hacer inferencias acerca de su diversidad en la naturaleza. Dentro de este complejo y cambiante escenario, la información que se trata en este capítulo se enfoca casi exclusivamente en los aspectos morfológicos, sin dejar de hacer las menciones

necesarias sobre aquella información bioquímica y molecular que resulte pertinente, la que se abordará con más en detalle en el capítulo IV.

3.2.1- Géneros tradicionales de la familia Thraustochytriaceae

La primera traustoquitrial descrita fue *Thraustochytrium proliferum*, encontrada sobre algas marinas de las aguas costeras atlánticas de los Estados Unidos. A partir de dicho hallazgo, otros géneros y especies de este grupo de microorganismos han sido sucesivamente reportados (tabla 3.1). La primera revisión de su clasificación, la realizó Gaertner (1972), quien propuso un método estándar para su identificación basado en el estudio de los rasgos morfológicos de las células en los diferentes estadios de los ciclos de vida, y observados en cultivos en granos de polen y agua de mar. En cuanto a las revisiones más recientes (Olive 1975, Moss 1986, Porter 1990), poco aportan a la taxonomía formal y no brindan claves taxonómicas, por lo que la identificación de nuevos aislamientos requiere en general de la consulta de las descripciones originales. Otros elementos de gran valor para estas tareas resultan la clave propuesta por Dick (2001) y las ilustraciones detalladas de Karling (1981). Basándose en estos trabajos, se describen a continuación los rasgos diagnósticos de los cinco géneros tradicionales y los criterios que se utilizan para diferenciar las especies.

En el género *Thraustochytrium* (fig. 3.1 A) el esporangio se desarrolla a partir de una célula vegetativa que experimenta sucesivas divisiones nucleares. Las zoosporas formadas por el clivaje del protoplasto multinucleado resultante, son liberadas a través de un poro, una fisura o la disolución parcial o total de la pared del esporangio. El esporangio puede eventualmente, y de acuerdo con las especies, retener uno o más fundamentos basales luego de la liberación de las zoosporas, los que pueden proliferar y formar un nuevo esporangio. Las especies de *Thraustochytrium* pueden dividirse, así, en dos grandes grupos: 1. holocárpicas (sin fundamentos basales) y 2. eucárpicas (con uno o más fundamentos basales). Hasta la fecha se han descrito diez especies eucárpicas: *T. proliferum* Sparrow, *T. multirudimentale* Goldstein, *T. motivum* Goldstein, *T. aureum* Goldstein, *T. kinnei* Gaertner, *T. rossii* Bahnweg et Sparrow, *T. kerguelensis* Bahnweg et Sparrow, *T. antarcticum* Bahnweg et Sparrow, *T. benthicola* Raghukumar, *T. gaertnerium* Jain, Raghukumar, Bongiorno et Aggarwal, y siete

especies holocárpicas: *T. globosum* Kobayashi et Ookubo, *T. pachydermum* Scholtz, *T. roseum* Goldstein, *T. aggregatum* Ulken, *T. striatum* Schneider, *T. arudimentale* Artemchuck y *T. caudivorum* Schärer, Knoflach, Vizoso, Reiger et Peintner (tabla 3.1). Otros rasgos que permiten distinguir a las especies son el grosor y la persistencia de las paredes del esporangio, la pigmentación de las colonias, los planos de clivaje del protoplasto en la zoosporogénesis y la movilidad de las zoosporas al momento de ser liberadas.

El género *Japonochytrium* incluye una única especie (*J. marinum* Kobayashi et M. Ookubo) y se diferencia de *Thraustochytrium* por la presencia de una apófisis endobiótica y por la liberación de las zoosporas a través del poro apical de la pared persistente del esporangio (fig. 3.1 B).

El género *Schizochytrium* se caracteriza por la formación de grupos de dos, cuatro, ocho, o una masa de gran número de células como resultado de la división vegetativa (i.e.: no zoosporogénica) de sus células (fig. 3.1 C). Las cinco especies descritas que lo constituyen (tabla 3.1) pueden reconocerse, en principio, según el tamaño del esporangio y el número de zoosporas que origina: 1 (*S. mangrovei* Raghukumar), 2 (*S. minutum* Gaertner), 8 (*S. octosporum* Raghukumar), 16-64 (*S. limacinum* D. Honda et Yokochi) o 32-64 (*S. aggregatum* Goldstein et Belsky). *S. limacinum* se diferencia del resto por presentar, además de las zoosporas, células ameboidales limaciformes. El reconocimiento de tres linajes filogenéticos dentro de este género por Yokoyama y Honda (2007) derivó en la enmienda del mismo y en la erección de dos nuevos géneros, *Aurantiochytrium*, al cual se transfirieron *S. limacinum* y *S. mangrovei*, y *Oblongiochytrium*, compuesto por *O. minutum* (Gaertner) R. Yokoyama et D. Honda, *O. octosporum* (Raghukumar) R. Yokoyama et D. Honda y *O. multirudimentale* (Goldstein) R. Yokoyama et D. Honda (antes *T. multirudimentale*). Los detalles sobre estos cambios taxonómicos se abordarán en el próximo capítulo.

El rasgo distintivo del género monotípico *Althornia* (*A. crouchii* E. B. G. Jones et D. J. Alderman), es la ausencia de red ectoplasmática y de sagenógeno. Dado que esta característica es diagnóstica de la clase Labyrinthulomycetes, su inclusión dentro de este grupo permanece tentativa, hasta tanto se lleven a cabo los necesarios estudios

moleculares. Sin embargo, muchos de sus rasgos ultraestructurales se corresponden con los de las traustochytriales (Perkins 1976).

El género *Ulkenia* fue removido de *Thraustochytrium* por Gaertner (1977) por presentar esporangios que liberan sus protoplastos, en forma de una única célula ameboidal que posteriormente se cliva y diferencia las zoosporas (fig. 3.1 D y E), es decir por presentar una zoosporogénesis exógena mediada por un estadio ameboidal. En cuatro especies (*U. visurgensis* Ulken, *U. sarkariana* Gaertner, *U. profunda* Gaertner y *U. radiata* Gaertner) el protoplasto ameboidal es multinucleado y se cliva directamente para formar zoosporas. En las otras dos especies (*U. amoeboides* Bahnweg & Sparrow y *U. minuta* Raghukumar) el protoplasto ameboidal se divide por bipartición sucesiva para producir soros secundarios o continua dividiéndose para formar zoosporas biflageladas. La presencia de fundamentos basales, la persistencia de la pared del esporangio y la manera en que se cliva el protoplasto ameboidal (regular en forma de estrella, o bien irregular, como se muestra en las fig. 3.1 D y E respectivamente) son caracteres que también se emplean para diferenciar a las 6 especies de *Ulkenia*. Recientemente Yokoyama y colaboradores (2007) reconocieron que las cepas reportadas para este género formaban separadamente cuatro grupos monofiléticos. Los autores asignaron estos grupos a cuatro géneros distintos. De este modo, *U. radiata*, *U. sarkariana* y *U. minuta* fueron escindidas y transferidas a los nuevos géneros *Botryochytrium*, *Parietychytrium* y *Scyoidochytrium* respectivamente, mientras que *U. visurgensis*, *U. amoeboides* y *U. profunda* permanecieron en el taxón *Ulkenia* sensu stricto.

3.2.2- Géneros excluidos

Las revisiones mencionadas anteriormente incluyen también a *Aplanochytrium* como un miembro de la familia Thraustochytriaceae. El rasgo diagnóstico de este taxón es el desarrollo de esporangios que producen aplanosporas en lugar de zoosporas. Durante muchos años incluyó un único representante, *A. kerguelensis* Bahnweg & Sparrow. *Labyrinthuloides*, descrito por Perkins (1973), es otro género que ha sido también considerado dentro de esta familia por algunos autores (Olive 1975, Porter 1990), y se caracteriza por su modo de locomoción, consistente en células que pueden arrastrarse sobre un sustrato o moverse sobre la red ectoplasmática que no las envuelve

completamente como en *Labyrinthula*. A partir de mediados de los ochenta, numerosas evidencias bioquímicas y morfológicas mostraron una fuerte relación entre *Labyrinthuloides* y *Aplanochytrium*, que sugirieron que podrían ser idénticos (Ulken et al. 1985). Estudios más recientes de filogenia molecular del grupo han demostrado que estos dos taxones son sinónimos; en base a estos resultados, se reconoció al epíteto genérico *Aplanochytrium* como prioritario, al cual se trasladaron las cinco especies de *Labyrinthuloides* y una especie de *Labyrinthula* (Leander & Porter 2000). La descripción de una nueva especie, *A. stocchinoi* Andreoli et Moro (2003), eleva el número de especies de aplanoquitriales a ocho. Tal como se mencionara en la sección 1.1 del capítulo I, las aplanoquitriales son actualmente reconocidas como uno de los tres clados comprendidos dentro de los labirintulomicetes (Leander y Porter 2001, Leander et al. 2004).

En la clave propuesta por Dick (2001) se mencionan otros dos géneros de asignación dudosa: *Elina* Artemchuk (1972) y *Diplophrys* Dykstra & Porter (1984). El primero de ellos presenta un esporangio con un sistema rizoidal similar al de las traustoquitriales, pero sus zoosporas sólo poseen un flagelo anterior, motivo por el cual otros autores (Karling 1981) lo ubican dentro de las Hyphochytriales. Por su parte, *Diplophrys* tiene células tróficas uninucleadas que se dividen mitóticamente, están rodeadas de varias capas de escamas y poseen una red ectoplasmática, pero carecen de sagenógeno y no producen zoosporas.

3.2.3- Limitaciones de la taxonomía tradicional

Como se refirió anteriormente, el valor diagnóstico de los caracteres morfológicos utilizados para la clasificación de las traustoquitriales ha sido cuestionado por varios autores. La tendencia de dichos rasgos a presentar variaciones graduales y que suelen solaparse dependiendo de las condiciones de cultivo (medio sólido o líquido, etc.) fue tempranamente documentada por Goldstein (1963a, b y c), Ulken (1965) y Booth & Miller (1968), entre otros. A partir de esto, Gaertner (1972), y con el objeto de estandarizar las condiciones observacionales, propuso la utilización de granos de polen en agua de mar como sustrato básico para los estudios morfológico-taxonómicos, ya que, tal como también se comentara en el punto anterior, en dicho medio expresan los caracteres básicos que se utilizan para identificarlos.

Sin embargo, la aplicación de este criterio no ha sido exitosa para la identificación de diversos aislamientos, particularmente en aquellos en que se ha registrado superposición de rasgos diagnósticos. Entre ellos puede mencionarse el caso de la cepa 70-2, que desarrolló simultáneamente dos tipos de esporangios (pequeños sin fundamentos basales y grandes con fundamentos basales) en granos de polen en agua de mar (Kazama et al. 1975), por lo que no fue posible determinar a que especie de *Thraustochytrium* pertenecería. Adicionalmente en presencia de bacterias se observaron células ameboidales, que es el carácter que se utiliza para asignar un material al género *Ulkenia* (Kazama et al. 1975). La formación de amebas fagotróficas también en *T. striatum* y *S. mangrovei* al ser co-cultivadas con bacterias sugiere que este sería un comportamiento común en las traustochytriales, que tendrían un rol bacterio-herbívoro en la naturaleza, además de participar en el reciclaje de materia orgánica (Raghukumar 1992). Otra especie en la que se ha observado solapamiento de rasgos diagnósticos es *T. gaertnerium*. Este organismo forma también, simultáneamente, dos tipos de esporangios: uno típico de *Thraustochytrium* con un fundamento basal, y otro que se desarrolla en células ameboidales como en *Ulkenia*. Dado que su caracterización molecular ubicó a este taxón en el mismo clado que *T. kinnei*, los autores la consideraron como una nueva especie de *Thraustochytrium* (Bongiorni et al. 2005).

La validez de algunos de los taxones tradicionalmente incluidos en las traustochytriales ha sido cuestionada por diferentes motivos. Tal es el caso del género *Japonochytrium*, cuyo rasgo distintivo (presencia de una apófisis en el esporangio) también ha sido observado en cultivos de especies de *Thraustochytrium* (Karling 1981). Otro ejemplo en el que la creación de un nuevo taxón se basó en caracteres que se registraron también en representantes de otros taxones es el de *T. aggregatum*. Esta especie se distingue por presentar células vegetativas con divisiones mitóticas formando agregados, por lo que podría haber sido incluida dentro de *Schizochytrium* (Porter 1990). Por otro lado, el límite de las especies puede resultar dudoso en aquellos casos en los que la información brindada por los autores al crearlas haya sido incompleta, como ocurre por ejemplo con *T. arudimentale*. La descripción original de la misma comprende ilustraciones tan pobres que ni siquiera resultan adecuadas para designar un lectotipo (Dick 2001) y que difícilmente puedan ser utilizadas para la identificación de un nuevo aislamiento.

3.2.4- Objetivos

La referida falta de resolución de la taxonomía tradicional de las traustochytriales a nivel genérico y específico, no puede inhibir la caracterización lo más completa posible de la morfología, desarrollo y otros aspectos biológicos de los aislamientos estudiados, lo cual, acorde con el actual estado de conocimiento sobre el grupo, constituye, verosímilmente, la primera información imprescindible para establecer su diversidad, más allá de que su asignación a un taxón particular haya sido posible o no. Teniendo esto en cuenta, los objetivos de este capítulo son:

- Realizar una detallada caracterización de la biología y morfología, en cultivos en agua y cebos, de los aislamientos locales de traustochytriales de acuerdo a lo propuesto por Gaertner (op. cit.).
- A partir de la información obtenida realizar un primer y sustancial aporte al conocimiento de la biodiversidad de las traustochytriales aisladas de humedales argentinos.
- Proveer información referencial sobre la morfología de las traustochytriales locales que pueda ser luego reevaluada e integrada con los datos obtenidos del análisis de otro tipo de caracteres (nutricionales, bioquímicos, ultraestructurales y moleculares) con fines sistemáticos.

3.3- Materiales y Métodos

Para observar la morfología de las células vegetativas y el proceso de formación de zoosporas, las cepas se sembraron en agua de mar con cebos (granos de polen de *Pinus* sp. o *Liquidambar* sp. y/o larvas de *Artemia persimilis* muertas con calor) y se incubaron a 25°C (excepcionalmente 4°C para los aislamientos de la Antártida). Para la clasificación se siguió el criterio de Dick (2001), considerando únicamente las especies pertenecientes a los géneros *Thraustochytrium*, *Japonochytrium*, *Schizochytrium* sensu lato, *Althornia* y *Ulkenia* sensu lato. Las dimensiones indicadas en las diagnósis

originales se señalan entre paréntesis. Las observaciones se realizaron con un microscopio Karl Zeiss Axioskop equipado con una cámara digital Olympus C5060WZ y con un microscopio Leica modelo DM500.

Se analizaron todas las cepas depositadas en la colección BAFCcult, excepto aquellas que se discontinuaron (S8, S27, S50Sch). También se incluyeron el aislamiento LSA4, representantes de otros 10 grupos de cepas de Mar Chiquita (MC2A, MC2H, MC3D, MC6B, MC6H, MC21D', MC45E, MC46A, MC50A, MC12A2) y 8 aislamientos redundantes del mismo sitio (MC4A, MC46A2, MC46B2, MC47C, MC48A, MC50B2, MC50F2, MC50I2). De este modo, 79 cepas fueron evaluadas en estos estudios.

3.4- Resultados

Se detallan a continuación las características de los aislamientos y su determinación taxonómica. Debido a lo problemático de la identificación en el nivel de especie, las determinaciones, en aquellos casos en que fue posible, se presentan con el estatus de *affinis*. La tabla 3.2 aporta un mayor detalle de la distribución y de los rasgos de las cepas. Para aquellos aislamientos en los que los estudios de filogenia molecular y bioquímicos (mostrados en el próximo capítulo) indicaron su asignación a alguno de los nuevos géneros propuestos para las traustochytriales (no considerados en este capítulo), se hace una breve mención acerca de su filiación.

Straminipila

Heterokonta

Labyrinthista (Labyrinthulomycetes)

Thraustochytriales

Thraustochytriaceae

1. *SCHIZOCHYTRIUM* S. Goldstein et M. Belsky, American Journal of Botany 51: 72. 1964.

Talo epi y endobiótico, con paredes delgadas, globoso, que se divide sucesivamente en díadas, tríadas o tétradas, o deviene en una masa amorfa de células, cada una de las cuales funciona como un segmento que produce zoosporas (esporangio). Sistema pseudorizoidal endo-interbiótico, ramificado y emergente de cada segmento. Zoosporas lateralmente biflageladas, liberadas asincrónicamente a través de una fisura irregular en la pared del esporangio. Esporas de resistencia no observadas.

1.1. *S. aff. octosporum* S. Raghukumar, Trans. Br. Mycol. Soc. 90: 273. 1988a. Fig. 3.2.

Talo eucarpico, epi y endobiótico, sésil o libre, al principio estadios unicelulares de 8-10 (4,0-5,0) μm de diámetro, globosos. Grupos de más de 100 células que se forman por divisiones vegetativas binarias continuas de díadas, tétradas u octadas. Díadas de 8-9 $\times$ 9-10 (4-6 $\times$ 6-7) μm diám; tétradas de 11-13 $\times$ 12-14 (8 $\times$ 12) μm diám. y grupos celulares de (16 $\times$ 40) μm diám. La red ectoplasmática puede ser producida por cualquiera de las células. Esporangios producidos a partir de cualquiera de las células maduras; cada esporangio produce ocho zoosporas biflageladas heterocontas. Zoosporas reniformes, 4 (3,5-5,0) $\times$ 3 (1,5-2,5) μm ; flagelos insertados lateralmente, con flagelo anterior de mayor longitud.

Material examinado: Cepa A11. Otro rasgo compartido con los materiales originales (no mencionado en la diagnosis) es la desintegración gradual y completa de la pared del esporangio al liberar las zoosporas. La temperatura óptima de incubación fue de 25°C (a pesar de provenir de ambientes antárticos), resultando la proliferación más lenta a temperaturas inferiores.

1.2. *Schizochytrium* sp. a. Cepa AA1.

La especie de esta cepa, también proveniente de materiales antárticos, no pudo ser elucidada debido a que no se encontraron esporangios, sino sólo divisiones

vegetativas, luego de numerosas inspecciones de los cultivos. La temperatura óptima de incubación fue de 25°C, resultando la proliferación más lenta a temperaturas inferiores.

1.3. *Schizochytrium* sp. b. Cepas AA3 y AA5, fig. 3.3.

Esporangios globosos, 15-20 µm de diám., que formaron de 32 a 64 zoosporas. Pared del esporangio delgada, no persistente. Zoosporas globosas, 3 µm diám, con un flagelo posterior marcadamente reducido (3 µm) y un flagelo anterior de mayor longitud (8 µm).

Estos organismos, provenientes de ambientes antárticos, colonizaron masivamente los cebos a temperaturas de 4°C y 10°C, pero no pudieron hacerlo y sus células presentaron mal aspecto a 16°C y 25°C. Además mostraron una exclusiva preferencia por el sustrato animal (colonizaron y consumieron completamente las larvas de *Artemia* adicionadas como cebo, fig. 3.3 C). En dicha condición, acumularon gran cantidad de lípidos, tal como revela la tinción con Sudan IV (fig. 3.3 D y E).

Observación: Los estudios de filogenia molecular y el perfil de PUFA's indicaron la asignación de estas cepas al género *Oblongichytrium*.

1.4. *Schizochytrium* sp. c. Cepa MC2H, fig. 3.4 A-C.

Esporangios globosos, 8-10 µm de diám., que formaron en general 4 zoosporas, aunque en algunos casos llegaron a registrarse 8. Pared del esporangio delgada, parcialmente persistente. Zoosporas reniformes, 3 × 5 µm, con el flagelo anterior de mayor longitud.

1.5. *Schizochytrium* sp. d. Cepas MC6H, MC21D' y MC50 (A, B2, F2, I2), fig. 3.4 D-G.

Esporangios globosos, 10-18 µm de diám., que formaron por clivaje centrípeto 8, 16 o 32 zoosporas. Pared del esporangio delgada, parcialmente persistente. Zoosporas reniformes, 3,5 × 6-7 µm, con el flagelo anterior de mayor longitud.

1.6. *Schizochytrium* sp. e. Ceba MC15A

Esporangios globosos, 10-13 μm de diám., que formaron 8 o 16 zoosporas. Pared del esporangio delgada, no persistente. Zoosporas reniformes, 3 $\times$ 5 μm , con el flagelo anterior de mayor longitud.

1.7. *Schizochytrium* sp. f. Ceba MC46B, fig. 3.4 H.

Crecimiento muy lento tanto en medio sólido como en agua de mar y cebos. Células tróficas 3-4 μm de diám. Zoosporas de tamaño también muy reducido (2 $\times$ 2,5 μm). No fue posible observar esporangios a pesar de las numerosas inspecciones a los cultivos.

1.8. *Schizochytrium* sp. g. Ceba S34r.

Esporangios globosos, 13-18 μm de diám., que formaron 4, 8 o 16 zoosporas. Pared del esporangio delgada, no persistente. Zoosporas reniformes, 3 $\times$ 5 μm , con una gútula conspicua en su interior, flagelo anterior de mayor longitud. Células vegetativas que desarrollaron una prominente red ectoplasmática.

1.9. *Schizochytrium* sp. h. Ceba LGII, fig. 3.5 A-C.

Esporangios globosos, 5-7 μm de diám., que formaron 4 o 8 zoosporas. Pared del esporangio delgada, no persistente. Zoosporas reniformes, 3-4 $\times$ 4-5 μm , flagelo anterior de mayor longitud. Células vegetativas de reducido tamaño (5-7 μm de diám.).

1.10. *Schizochytrium* sp. i. Cepas S44, S48cmc y S49cmc, fig. 3.5 D-H.

Esporangios globosos, 15-25 μm de diám., que formaron generalmente 16 zoosporas. Pared del esporangio delgada, parcialmente persistente. Zoosporas reniformes, 3 $\times$ 5 μm , con el flagelo anterior de mayor longitud.

1.11. *Schizochytrium* sp. j. Cepas S19Sch, S33C, S48Sch, J, B5 y SCIII.

Crecimiento muy lento tanto en medio sólido como en cebos, lo que imposibilitó distinguir sus esporangios luego de repetidas inspecciones a los cultivos. Las células vegetativas nunca superaron los 5 μm . Estas cepas se pueden diferenciar según el aspecto de sus colonias en medio sólido (tabla 3.2), por lo que probablemente representen distintas especies.

Observación: Los estudios de filogenia molecular y el perfil de PUFA's indicaron la asignación de la cepa B5 al género *Aurantiochytrium*.

2. *THRAUSTOCHYTRIUM* Sparrow emend Johnson, in Johnson & Sparrow, Fungi in oceans and estuaries: 331. 1961.

Esporangios usualmente globosos, epibióticos, de paredes delgadas o gruesas, lisas, con o sin fundamento basal proliferativo (porción no esporógena que regenera el esporangio). Sistema rizoidal (o red ectoplasmática) endobiótico, simple o ramificado, con o sin apófisis. Zoosporas con dos flagelos de inserción lateral, móviles o inmóviles al momento de ser liberadas a través de una fisura irregular de la pared del esporangio parcialmente delicuescente. Esporas de resistencia, cuando conocidas, epibióticas, esféricas, lisas y conteniendo una única gútula central o excéntrica de aceite.

2.1. *T. aff. antarcticum* Bahnweg & Sparrow, Amer. J. Bot. 61: 760. 1974. Fig. 3.6 A-D.

Esporangios globosos, 19-22 (18-25) μm diám, de paredes delgadas, incoloras, con un único fundamento basal. Sistema rizoidal monoaxial, ramificado. Zoosporas elipsoidales a reniformes, 3-4 (3) μm diám. $\times$ 4-5 (5) μm long., con el flagelo anterior de mayor longitud. Descarga de las zoosporas en un grupo compacto, simultánea a la desintegración completa de la pared esporangial. Luego de liberadas, las zoosporas adquieren movilidad en forma prácticamente instantánea y nadan en busca de un sustrato.

Material examinado: Cepa LSA4. Este aislamiento no pudo ser conservado en sucesivos repiques.

2.2. *T. aff. aureum* Goldstein, Arch. Mikrobiol. 45: 102. 1963. Fig. 3.6 E-F.

Esporangios proliferativos a partir de 1 fundamento basal, de paredes delgadas, globosos o subglobosos, 10-18 (8-17) μm diám., de color amarillo pálido a amarillo-anaranjado. Sistema rizoidal basal, endobiótico, simple o ramificado. Las zoosporas se forman y nadan libremente dentro del esporangio, puntuando la porción distal de su pared y emergiendo de a una a varias al momento en que la apertura se incrementa de tamaño. Zoosporas elipsoidales, 3 (2-2,5) μm diám. $\times$ 5 (3-4) μm long., lateralmente biflageladas, con el flagelo anterior de mayor longitud. Fundamento basal globoso a subgloboso, 4-5 (4-8) μm diám.

Material examinado: Cepas MC18A, MC28C y SCIV. Entre los rasgos particulares de estos aislamientos pueden mencionarse las gruesas paredes (2 μm o más) de MC18A y MC28C, que en algunos casos retuvieron a las zoosporas (fig. 3.6 E-F) y la sensibilidad de SCIV al antibiótico cloranfenicol (0,1 g l⁻¹).

2.3. *T. aff. globosum* Kobayashi & Ookubo, Bull. Nat. Sci. Mus. Tokyo 33: 60. 1953. Fig. 3.6 G-H.

Esporangios gregarios sobre las células huésped, sésiles, globosos o elipsoidales, a veces cónicos en la base, de pared delgada, hialinos, 10-15 (5-20) μm diám. $\times$ 10-15 (5-10) μm long., conteniendo 8 a numerosas (8-24-30) zoosporas, que a la madurez impactan contra la porción superior de la pared del esporangio irregularmente y son liberadas. Sistema rizoidal único y simple. Zoosporas reniformes, 3 (2,5) $\times$ 5 (3-4) μm , con 2 flagelos laterales.

Material examinado: Cepas MC12A2 y S7. Los esporangios de MC12A2 desarrollaron en su interior generalmente 8 zoosporas (fig. 3.6 G-H), mientras que este número fue variable para S7. Las paredes de los esporangios de ambos aislamientos fueron parcialmente persistentes.

2.4. *T. aff. kinnei* Gaertner, Veröff. Inst. Meeresforsch. Bremerh. 15: 185. 1967. Fig. 3.7 N-S.

Esporangios con un fundamento basal, sésiles, piriformes, (14-17) μm diám. $\times$ (17-19) μm long., con el extremo basal insertado en el sustrato al cual se adhiere mediante un sistema pseudorizoidal endobiótico; paredes rugosas y engrosadas en los esporangios viejos. Zoosporas delimitadas en el esporangio, liberadas por desintegración de la porción apical de su pared, o emergiendo de la zona próxima a la base en los esporangios de paredes gruesas; reniformes, 3 (2,5-3) $\times$ 5 (4,5-4,8) μm , con 2 flagelos laterales. Fundamento basal de (10) μm diám. que se desarrolla en un esporangio secundario que contiene a su vez un fundamento basal secundario.

Material examinado: Cepas S6, S13, S14, S26A, S26B, S29, S41b, S50B y TF. En estos aislamientos se observaron además otros dos rasgos que se ilustran en la descripción original de la especie pero que no se mencionan en la diagnosis: la formación de zoosporas por clivaje radial y su desplazamiento hacia la periferia aparentemente por efecto de una vacuola central, así como la persistencia de la zona basal cónica de la pared del esporangio rodeando al fundamento basal luego de que las zoosporas fueron liberadas.

2.5. *T. aff. striatum* Schneider, Kieler Meeresforsch.. 23: 19. 1968. Fig. 3.7 A-E, H-K.

Esporangios globosos, 13-30 (14,6-22,0) μm diám., con pared delgada o levemente gruesa, hialina y lisa, una gran vacuola central y protoplasma estriado que se cliva en sectores radiales. Pseudorizoides endobióticos ramificados. Zoosporas delimitadas dentro del esporangio y dispuestas alrededor de la vacuola central, que incrementa su tamaño y forma una esfera hueca de zoosporas; adquieren movilidad dentro del esporangio mientras la pared se disuelve, elipsoidales, 3 (2,0-3,7) $\times$ 5 (3,4-6,7) μm , con 2 flagelos laterales.

Material examinado: Cepas MC7D y MC26A (subgrupo a), S2rc, S33A y S49sp (subgrupo b), S2sp, S32, S34sp y S50sp (subgrupo c). Los esporangios de las cepas de

los subgrupos a y b (15-30 μm $\times$ 15-30 μm diám.) presentaron paredes moderadamente gruesas (1-2 μm) aunque no persistentes (tabla 3.2). La movilidad de las zoosporas al momento de la liberación fue variable en el subgrupo b (completamente móviles al disolverse la pared en los esporangios de menor tamaño & inicialmente inmóviles en aquellos de mayores dimensiones).

2.6. *Thraustochytrium* sp. a. Cepa S12, fig. 3.7 F-G.

Esporangios globosos, 9-12 μm de diám., que formaron por clivaje irregular 8 zoosporas (fig. 3.7 Ñ). Pared del esporangio delgada, parcialmente persistente. Zoosporas reniformes, 3 $\times$ 5 μm , con el flagelo anterior de mayor longitud, móviles al momento de ser liberadas. Células vegetativas que eventualmente formaron tétradas (fig. 3.7 O).

2.7. *Thraustochytrium* sp. b. Cepa S19T

Esporangios globosos con un fundamento basal (visible luego de liberadas las zoosporas), 15-25 μm de diám. Pared del esporangio moderadamente gruesa (1-2 μm) aunque no persistente. Zoosporas reniformes, 3 $\times$ 5 μm , con el flagelo anterior de mayor longitud.

2.8. *Thraustochytrium* sp. c. Cepa S48T, fig. 3.7 L-M.

Esporangios globosos con un fundamento basal (visible luego de liberadas las zoosporas), 13-22 μm de diám. Pared del esporangio delgada, parcialmente persistente. Zoosporas reniformes, 3 $\times$ 5 μm , con el flagelo anterior de mayor longitud, con una fase inmóvil al ser liberadas.

3. *ULKENIA* A. Gaertner, Veröff. Inst. Meeresforsch. Bremerh. 16: 141. 1977.

Talo epi- y endobiótico, interbiótico, de pared delgada durante el crecimiento activo, con un sistema rizoidal endo- o interbiótico. Talo globoso, subgloboso o piriforme, muy variable en diámetro y contenido celular durante el desarrollo. En la

madurez la pared celular puede ser persistente o desaparecer parcial o totalmente, liberándose del esporangio el protoplasto desnudo, ameboidal. Luego de la liberación el comportamiento ameboidal del protoplasto se incrementa, cambiando perceptiblemente de forma. Seguidamente se divide en zoosporas, las cuales luego de un período de inactividad se vuelven móviles en forma sucesiva debido a la formación de dos flagelos de diferente longitud.

3.1. *U. aff. minuta* Raghukumar, Veröff. Inst. Meeresforsch. Bremerh. 16: 160. 1977. Fig. 3.8.

Esporangios primarios epibióticos, sésiles, globosos, 10-12 × 13-15 (6,2-10,5) µm diám., con contenido granular y pseudorizoides delicados y ramificados; paredes delicuescentes que liberan el protoplasto desnudo el cual cambia de forma como una ameba y se divide por constricción y estiramiento en 4-20 esporangios secundarios globosos de 6-8 (4,2-7,3) µm diám. El contenido del esporangio secundario emerge por delicuescencia de la pared y se comporta como una ameba secundaria que se divide en 4-12 zoosporas inicialmente no flageladas (amebosporas), las cuales luego de desarrollan dos flagelos de diferente longitud y se alejan nadando; elipsoidales, 2-3 (1,0-1,5) µm diám. × 3-4 (1,5-2,5) µm long.

Material examinado: Cepas S26-1 y S41sp. Los esporangios fueron ligeramente piriformes. En coincidencia con las imágenes mostradas en la diagnosis de la especie, el protoplasto ameboidal primario formó por bipartición sucesiva amebosporas secundarias, las cuales, en algunos casos, luego se diferenciaron en zoosporas.

Observación: El perfil de PUFAs indicó la asignación de estas cepas al género *Sicyoidochytrium*.

3.2. *U. aff. radiata* A. Gaertner, Veröff. Inst. Meeresforsch. Bremerh. 16: 149. 1977. Fig. 3.9 A-H.

Esporangios globosos, 8-20 (8-18) µm diám, de paredes delgadas. En la madurez la pared desaparece y el protoplasto ameboidal liberado adquiere forma de estrella.

Seguidamente, las zoosporas se forman por división centrípeta del protoplasto en porciones aproximadamente cónicas, quedando adheridas entre sí por su extremo delgado durante un lapso variable. A continuación se forman los flagelos, y el contacto en el centro se pierde. Zoosporas inicialmente cónicas, luego reniformes, 2-3 (3-4) μm diám. $\times$ 3-4 (5-8) μm long.

Material examinado: Cepas SB4A, SB6B, SB1D y LSA3. Estos aislamientos difirieron en cuanto al tamaño de sus esporangios y el aspecto de sus colonias (ver tabla 3.2). Algunos de los protoplastos ameboidales de LSA3 de mayores dimensiones presentaron clivaje irregular. La cepa SB4A se diferenció del resto por el tipo de colonia en medio sólido.

Observación: Los estudios de filogenia molecular y el perfil de PUFA's indicaron la asignación de la cepa SB4A al género *Parietichytrium*.

3.3. U. aff. visurgensis (A. Ulken) A. Gaertner, Veröff. Inst. Meeresforsch. Bremerh. 16: 141. 1977. *Thraustochytrium visurgense* A. Ulken, Veröff. Inst. Meeresforsch. Bremerh. 9: 290. 1965. Figs. 3.9 I-N y 3.10.

Esporangios globosos, 13-20 (15-20) μm diám. En la madurez la pared desaparece y el protoplasto liberado adquiere comportamiento ameboidal, de forma cambiante, emitiendo pseudopodios lobulados. Seguidamente se produce el clivaje irregular del protoplasto y se individualizan las zoosporas, las cuales yacen juntas por un tiempo, para luego alejarse nadando solas o en grupos. Zoosporas reniformes, 2-4 (2,5-3,5) μm diám. $\times$ 2,5- 4,5 (4-5,5) μm long.

Material examinado: Cepas LSA1, LSB, MC2A, MC3D, MC4A-B, MC6B, MC11F, MC34A, MC45E, MC46 (A, A2, B2), MC47 (C, D), MC48 (A, B), S1, S3, SCI, SCII y SCV. El único aislamiento en el que se encontraron esporangios con paredes gruesas como en los materiales originales fue en S3. La cepa S1 se diferenció por sus células vegetativas con abundante contenido lipídico y una red ectoplasmática prominente; sus esporangios alcanzaron mayor tamaño (15-25 μm $\times$ 15-25 μm). Las zoosporas de MC4A presentaron gránulos refringentes mientras que las de MC46A2 tuvieron flagelos

más gruesos. En los materiales de MC2A, MC3D, MC4A-B, MC6B, MC11F, MC34A, MC45E, MC46 (A, A2, B2), MC47 (C, D) y MC48 (A, B) también se encontraron, en menor proporción, amebas pequeñas con clivaje radial.

3.5- Discusión

3.5.1- Valor taxonómico de los caracteres morfológicos

El estudio de los rasgos morfológicos de las células vegetativas, esporangios y proceso de zoosporulación mostró que los aislamientos locales de traustochytriales pertenecerían a los géneros *Ulkenia*, *Schizochytrium* y *Thraustochytrium*. No se encontraron organismos que presentaran una apófisis endobiótica (rasgo diagnóstico de *Japonochytrium*) o con ausencia de red ectoplasmática (típico de *Althornia*). La asignación a estos tres taxones no resultó conflictiva en ningún caso, aunque sí lo fue la identificación a nivel específico. Las discrepancias con las descripciones originales se discuten a continuación.

En ninguna de las cepas locales asignadas al género *Schizochytrium* sensu lato se encontraron células vegetativas que formaran amebas limaciformes que luego de redondearse produjeran zoosporas, como ocurre en *S. limacinum* (Honda et al. 1998), ni células vegetativas individuales que se redondearan y desarrollaran una zoospora cada una como en *S. mangrovei* (Raghukumar 1988b). Por su parte *S. minutum* es la única especie de este género con células vegetativas y esporangios de muy reducido tamaño; estos últimos se forman a partir de las células individuales de las tétradas, que no tienen más de 8 μm de diámetro, y producen 2 zoosporas cada uno (Gaertner 1981). El reducido tamaño de las células vegetativas de una gran parte de las cepas locales identificadas como *Schizochytrium* (spp. a, f, h, j, tabla 3.2) en las que no fue posible observar el proceso de zoosporulación sólo es compatible con las dimensiones de la mencionada especie, aunque debería completarse su caracterización para precisar la identidad de estos organismos. Es interesante resaltar que todas estas cepas tuvieron un crecimiento muy acotado y su aislamiento sólo fue posible luego de mejorar las condiciones de cultivo, demorando en algunos casos varios meses, por lo que también podrían representar nuevos taxones. La escasa disponibilidad de biomasa de estas cepas

debido a su lenta proliferación limita además la posibilidad de establecer su identidad mediante estudios bioquímicos y moleculares.

Las características de los esporangios (tamaño y número de zoosporas formadas) de los restantes aislamientos sólo fueron comparables con los descritos para *S. aggregatum* y *S. octosporum*. La primera especie mencionada presenta tétradas de $14-27 \times 13-29 \mu\text{m}$ cuyas células individuales se comportan como esporangios liberando 16-64 zoosporas a través de una apertura en la pared (Goldstein & Belsky 1964); cabe mencionar que para este taxón también se han documentado esporangios de mayor tamaño (15-25 μm de diámetro, Raghukumar 1988) y colonias de color naranja (Dick 2001). Por su parte, los esporangios de *S. octosporum* tienen un diámetro de 6,5- 8 μm y producen 8 zoosporas que se liberan por la desintegración gradual y completa de su pared (Raghukumar 1988a). La única cepa que presentó estas características y fue determinada como *S. aff. octosporum* (A11) discrepó con la especie tipo en el tamaño de las zoosporas (3 μm x 4 μm en la cepa A11 vs. 3,5-5 $\mu\text{m} \times$ 1,5-2,5 μm en el material tipo). Los otros dos materiales en los que se encontraron esporangios con 8 zoosporas no se asignaron a este taxón por presentar también esporangios con 4 zoosporas, de menor tamaño (*S. sp. h*) o con paredes parcialmente persistentes (*S. sp. c*) (ver tabla 3.2).

Las restantes cepas locales de *Schizochytrium* desarrollaron células vegetativas y esporangios de tamaños sólo compatibles con *S. aggregatum* aunque en ningún caso se encontró una congruencia tal con los materiales tipo que justificara su asignación a esta especie. Por ejemplo, el número de zoosporas de *S. sp. d, e, g é i* (tabla 3.2) en general fue 16 o menos, sus colonias tuvieron coloración crema-amarillo y en el primer y último grupo las paredes de los esporangios resultaron parcialmente persistentes. Por su parte, los aislamientos de *S. sp. b* presentaron esporangios globosos que formaron de 32 a 64 zoosporas y cuyas dimensiones (15-20 μm de diámetro) fueron coincidentes con las de *S. aggregatum* pero mostraron también algunas características únicas, como la formación de zoosporas con un flagelo posterior marcadamente reducido y crecimiento a temperaturas inferiores a 10°C únicamente sobre cebos de origen animal. Por este motivo, se las presenta como *Schizochytrium sp.*, ante la posibilidad de que se trate de una nueva especie.

Dentro de las especies de *Thraustochytrium* holocárpicas o no proliferativas (sin fundamento basal), *T. striatum* se caracteriza por el modo particular en que sus esporangios diferencian las zoosporas, clivándose primero en sectores radiales y delimitando luego las zoosporas a la periferia por efecto del incremento de tamaño de una vacuola central (fig. 3.7 A-C); finalmente las zoosporas adquieren movilidad dentro del esporangio a medida que la pared se disuelve (Schneider 1967). Este tipo de zoosporogénesis fue encontrado en tres subgrupos (a, b y c, tabla 3.2) de aislamientos locales, que se diferenciaron a su vez por el color de sus colonias, y el tamaño y grosor de la pared de sus esporangios. Las cepas del subgrupo c fueron las únicas con paredes delgadas y esporangios de dimensiones coincidentes con la de esta especie tipo (14,6 – 22 μm de diámetro). Los otros dos subgrupos (a y b) desarrollaron esporangios de mayor tamaño, que alcanzaron los 30 μm de diámetro, cuyas paredes fueron relativamente gruesas (1-2 μm). Si bien las paredes de los esporangios de esta especie son descritas como delgadas, en la diagnosis también se contempla la posibilidad de que sean relativamente gruesas (Karling 1981). Finalmente cabe mencionar que en los tres grupos locales analizados las dimensiones de las zoosporas superaron a las de la especie tipo (2 $\times$ 4 μm).

Thraustochytrium globosum sería otra de las especies holocárpicas representada por cepas locales. En este taxón los esporangios son globosos o elipsoidales, a veces, cónicos en la base y contienen 8-24-30 zoosporas que a la madurez chocan contra la pared desprendiendo irregularmente su mitad superior (Kobayashi & Ookubo 1953). Si bien los materiales que fueron asignados a esta especie (tabla 3.2) presentaron paredes de los esporangios persistentes en la base, movilidad de las zoosporas antes de ser liberadas y un número de zoosporas compatibles con los materiales originales, la forma de los esporangios nunca fue elipsoidal ni cónica en la base, y no se pudo observar el desprendimiento de la mitad superior de su pared al momento de ser liberadas las zoosporas; tampoco se registraron los 2 o 3 gránulos en las zoosporas que se mencionan en la descripción original.

La especie de otro representante holocárpico de *Thraustochytrium* (*T. sp. a*, tabla 3.2) permaneció sin determinar dado que los cultivos observados sólo compartieron algunos de los rasgos diagnósticos con la especie más similar (*T. aggregatum*) pero difirieron marcadamente en otros. Entre los caracteres compartidos pueden mencionarse la presencia de agregados de esporangios, así como su forma (globosa) y su tamaño (9–12 µm diám. en la cepa local y 10–15 µm en la original), y el color de las colonias (crema) en medio de cultivo agarizado. Sin embargo, en la especie tipo las zoosporas se liberan como una masa que permanece quiescente por aproximadamente una hora antes de adquirir movilidad (Ulken 1965), mientras que en el aislamiento *T. sp. a* las zoosporas nadan activamente dentro del esporangio antes de ser liberadas (fig. 3.7 F-G). Otra diferencia adicional es la persistencia parcial de la pared del esporangio en la cepa local y su completa disolución en el material original.

Thraustochytrium kinei fue la especie eucárpica más representada, dado que nueve aislamientos se identificaron como tal a partir del registro de esporangios piriformes con un fundamento basal, clivaje radial y pared muy persistente en la zona basal luego de la liberación de las zoosporas; sin embargo no se observó en ningún caso el desarrollo de una vacuola central que al expandirse separara a las zoosporas ni paredes gruesas en los esporangios de cultivos viejos, como es distintivo de esta especie (Gaertner 1969). Las dimensiones de los esporangios de las cepas locales están incluidas dentro del rango documentado para los materiales originales (14-17 × 17-19 µm), aunque la variabilidad de tamaño resultó mucho mayor. En el caso de *T. antarcticum*, las características morfológicas de la cepa LSA4 se ajustaron bien a la descripción original, que postula la presencia de un único fundamento basal y la delicuescencia completa de la pared esporangial al momento de la zoosporogénesis como rasgos diagnósticos centrales de esta especie. Sin embargo, otras características como la zona clara periférica del citoplasma del esporangio joven y la extremadamente rápida liberación de las zoosporas observadas, no han sido puntualizadas por los autores de la especie y no aparecen claras en sus ilustraciones y fotografías. Lamentablemente no fue posible mantener esta cepa en cultivo, por lo que deberán realizarse nuevos aislamientos para estudiar y precisar la identidad de este organismo.

Todas las restantes cepas identificadas como *Thraustochytrium* que presentaron fundamentos basales mostraron las mayores similitudes con *T. aureum*, si bien en algunos casos no se asignó a este taxón dadas las diferencias con los materiales originales. Esta especie con esporangios proliferativos a partir de un fundamento basal (4–8 μm diám.), globosos o subglobosos (8–7 μm diám.) con paredes delgadas, se diferencia del resto por el proceso de zoosporogénesis, en el cual las zoosporas nadan libremente dentro del esporangio puntuando la porción distal de la pared y emergen una vez que estas aperturas son lo suficientemente amplias (Goldstein 1963b). Su coloración va del amarillo pálido al amarillo anaranjado, lo que la distinguiría de otras especies según el autor. Los materiales correspondientes a las cepas MC18A y MC28C fueron los únicos en los que se encontró este modo particular de descarga de las zoosporas, aunque también formaron, en menor grado, esporangios que retuvieron esporas no móviles; estas cepas difirieron además con la especie tipo en el grosor de las paredes de los esporangios (tabla 3.2). El otro aislamiento cuyos rasgos también coincidieron en gran medida con los diagnósticos de *T. aureum* fue SCIV, siendo su mayor discrepancia la persistencia de la pared del esporangio. El color de las colonias (naranja en MC18A-MC28C y crema en SCIV) justifica además la asignación realizada. Otras dos cepas, *T. sp. b* y *c* (tabla 3.2) presentaron algunos de los atributos diagnósticos de *T. aureum*, aunque no compartieron con la especie tipo ni el color de sus colonias ni otras características que se comentan a continuación. La primera de ellas desarrolló esporangios que superaron las dimensiones máximas de la especie tipo además de estar delimitados por gruesas paredes. En el caso de *T. sp. c*, la principal diferencia fue que las zoosporas de esta cepa local tuvieron una fase inmóvil al momento de ser liberadas. Considerando este último rasgo, S48T sería similar a *T. proliferum*, pero tampoco coincidió con esta especie en cuanto a la forma del esporangio (obpiriforme) ni en el modo en que se diferencian y descargan las zoosporas (delimitación progresiva desde el ápice a la base y liberación por delicuescencia de la parte superior de la pared del esporangio, Sparrow 1936). En ninguna de estas cepas locales eucárpicas fue posible reconocer el fundamento basal antes de la liberación de las zoosporas, y su tamaño resultó más reducido que el descrito para *T. aureum*.

Dentro del género *Ulkenia* sensu lato, *U. radiata* y *U. visurgensis* comparten algunos rasgos diagnósticos como la disolución total de la pared esporangial cuando se libera el protoplasto ameboidal, y la ausencia de cuerpos proliferativos y biparticiones

sucesivas, lo que las distingue del resto de las especies del género (Gaertner 1977). La diferencia morfológica más conspicua entre ambas es el patrón de clivaje del estadio ameboidal, irregular en *U. visurgensis* y marcadamente radial en *U. radiata*. Aunque la observación de estas características en los materiales mencionados fue la base para establecer las afinidades propuestas, la superposición de caracteres registrada en algunos de los cultivos cuestiona la utilización de este criterio para la identificación de estas especies. Tal es el caso de la coexistencia de amebas pequeñas con clivaje radial y amebas de mayor tamaño con clivaje irregular en las cepas provenientes de la albufera de mar Chiquita y en LSA3 (tabla 3.2). Si bien en estas situaciones se optó por asignar a la especie cuyo patrón de clivaje se viera más frecuentemente representado para ese aislamiento en particular, las observaciones realizadas sugerirían una fuerte relación entre el tamaño del esporangio y la regularidad en el clivaje del protoplasto ameboidal. Respecto a las discordancias con las descripciones originales de estas dos especies, en el caso de las cepas de *U. aff. radiata* las zoosporas resultaron ser más pequeñas y redondeadas, y no exhibieron el cuerpo protoplasmático denso posterior al microcopio óptico descrito por Gaertner (1977). Por su parte, los representantes de *U. aff. visurgensis*, exceptuando la cepa S3, presentaron paredes esporangiales más delgadas que lo indicado en la diagnosis de la especie (Ulken 1965).

Finalmente *U. minuta* es distinguible de las otras especies del mismo género por la forma particular (biparticiones sucesivas) en que el protoplasto se divide, por la producción de amebosporas (fig. 3.8 A-G), y por la descarga del protoplasto por completa disolución de su pared. Este único tipo de reproducción fue registrado en las cepas S26-1 y S41sp, aunque la forma y las dimensiones de los esporangios (piriforme, $10-12 \times 13-15 \mu\text{m}$) y el tamaño de las zoosporas ($2-3 \times 3-4 \mu\text{m}$) fueron ligeramente distintas que las de los materiales originales (globosa, 6,2-10,5 μm diám., 1,0-1,5. $\times$ 1,5-2,5 μm) (ver tabla 3.2).

3.5.2- Morfología de colonia y condiciones de cultivo como herramientas complementarias

Una de las limitaciones de este sistema de determinación es que al reconocerse las especies en base a unos pocos caracteres morfológicos, organismos que comparten esas similitudes pero que difieren en otros numerosos aspectos son considerados como un mismo taxón. Un caso ilustrativo de esta situación lo constituye la gran cantidad de cepas identificadas como *U. aff. visurgensis*, muchas de las cuales exhibieron diferencias tanto morfológicas como fisiológicas en cultivo en medio sólido y líquido. Particularmente, los aislamientos S1 y S3, ambos asignados a este taxón y provenientes de la zona de Comodoro Rivadavia, difirieron notoriamente tanto en el tipo de colonia (tabla 2.4) como en cuanto a su crecimiento en medio sólido (tabla 2.5) y en las condiciones de cultivo para la obtención de biomasa (tabla 2.7), por lo que difícilmente se trate de cepas de una misma especie; adicionalmente desarrollaron esporangios con diferentes dimensiones y grosor de pared (tabla 3.2). El estudio de caracteres bioquímicos (como el perfil de PUFAs) y moleculares, requerido actualmente para la determinación taxonómica (Yokoyama & Honda 2007), ha resultado de utilidad para resolver este tipo de interrogantes, y se abordará en el próximo capítulo. Adicionalmente, la información obtenida durante la etapa de aislamiento y cultivo también aporta elementos de valor diagnóstico tal como se discute a continuación.

En el capítulo anterior se propuso utilizar la morfología de las colonias en medio sólido como criterio para reconocer diferentes traustoguitrales que pudieran coexistir en una misma muestra. La posterior caracterización de los aislamientos en cultivos en agua de mar y cebos permitió verificar que aquellos organismos que habían desarrollado diferentes tipos de colonias también mantuvieron las diferencias en sus rasgos diagnósticos. Pueden mencionarse como ejemplo las cepas patagónicas de *S. sp. g, h é i*, que primero pudieron reconocerse fácilmente según el morfotipo de sus colonias (tablas 2.4 y 3.2), y que luego fueron identificadas como especies independientes del género *Schizochytrium* sensu lato en base al desarrollo de distintos tipos de esporangios (tabla 3.2). Adicionalmente, aquellas cepas provenientes de diferentes muestras que presentaron colonias idénticas durante su aislamiento, fueron luego asignadas a un mismo taxón. Tal es el caso de las cepas de *T. aff. striatum* subgrupo c, originarias de

distintos sitios pero todas con colonias de color rosa anaranjado, convexas, de superficie seca y con células de gran tamaño (tabla 2.4) cuyos esporangios y proceso de zoosporogénesis fueron prácticamente idénticos (tabla 3.2). Un ejemplo más de la fuerte asociación entre los rasgos en polen y en medio sólido es ilustrado por el hecho de que aquellas cepas que exhibieron divisiones vegetativas en cultivos en agua de mar y cebos siempre tuvieron colonias con crecimiento tridimensional. El uso de ciertos rasgos de las colonias (por ejemplo, el color) como herramienta diagnóstica adicional fue sugerido tempranamente por algunos de los especialistas en este grupo de microorganismos (Goldstein 1963c). Estudios más recientes han mostrado que algunos de los aspectos de las colonias, como el tamaño o la morfología presentan correlación con los linajes filogenéticos (Yokoyama & Honda 2007). Por su parte Leander y colaboradores (2004) han sugerido que el tamaño, forma y patrón de las colonias así como la capacidad para penetrar el agar y la morfología de la red ectoplasmática serían sinapomorfias asociadas a diferentes clados de aplanoquiritiales.

Las condiciones de cultivo para la obtención de biomasa de las cepas también se analizaron en el capítulo anterior, comparando además el crecimiento en diferentes medios agarizados para aquellas provenientes del litoral marítimo y estuarios de la Patagonia. Estos resultados, producto de la fisiología de los organismos estudiados, también podrían arrojar información útil para su caracterización. En este sentido, se observaron algunas tendencias que vale la pena comentar. En primer lugar, la mayor parte de las especies de *Schizochytrium* de células vegetativas pequeñas y crecimiento acotado (a, f, h, j) no prosperó en cultivos líquidos ni en medio MC (tabla 2.7); para el caso de las cepas patagónicas, siempre fueron asignadas al grupo 1 en base a su proliferación en medio sólido (tabla 2.5). Contrariamente, las especies de *Schizochytrium* con esporangios y células vegetativas de mayores dimensiones (e, g, i) se propagaron sin dificultad en medio MC líquido con agitación rotacional, y pertenecieron al grupo 3 (tabla 2.5). Las cepas de *U. aff. visurgensis* y *U. aff. radiata* también proliferaron en general exitosamente en estas condiciones, mientras que una gran parte de los representantes de *Thraustochytrium* requirió de agitación más suave (horizontal, tabla 2.7). Según el crecimiento en medio sólido, todos los aislamientos de *T. aff. kinnei* formaron parte del grupo 3 mientras que los de *T. aff. striatum* se clasificaron dentro del grupo 2 (tabla 2.5).

A partir de la integración de los resultados presentados en este capítulo y en el anterior se sugiere que tanto el tipo de colonia como la comparación de los requerimientos de cultivo constituirían herramientas útiles para distinguir cepas cuyos rasgos diagnósticos sean indiferenciables, o no permitan su asignación a distintas especies, pero que por presentar diferentes comportamientos fisiológicos probablemente constituyan diferentes taxones. Tal es la situación de los subgrupos b y c de *T. aff striatum*, cuya zoosporogénesis fue muy similar a la del material tipo, pero que difirieron en otros rasgos, como el tamaño del esporangio o el grosor de las paredes (tabla 3.2), y que además fueron fácilmente distinguibles al comparar sus colonias (tabla 2.4) o las condiciones de cultivo en medio líquido requeridas para la obtención de biomasa (tabla 2.7). De todos modos, si bien este tipo de enfoque sugiere que podrían ser diferentes taxones, su tratamiento como tales requiere de más estudios que confirmen estas presunciones, como se tratará en el próximo capítulo.

3.5.3- Distribución de traustochytriales en los humedales argentinos

Los resultados obtenidos indicarían que el taxón más representado para los humedales de la Argentina, ya sea en el nivel genérico como en el específico, dependió fuertemente del ambiente en estudio, coincidentemente con los reportes previos (resumidos en la tabla 3.3).

Las especies de *Schizochytrium* parecen ser las más tolerantes a las fuertes variaciones ambientales (Fan et al. 2002). Coherentemente, para los materiales argentinos, este género resultó predominante en las aguas costeras antárticas y de la laguna salina Vilama, ambos sitios sometidos a condiciones climáticas extremas. Cabe mencionar que otro representante de dicho taxón había sido previamente documentado en muestras de algas sobre hielo antártico (Reimann & Schaumann 1993), por lo que podría ser un organismo común en este tipo de ambientes fríos. La acumulación intracelular de aceites, registrada para la cepa AA5 mediante tinción con Sudan IV, podría constituir una adaptación de estos aislamientos a las bajas temperaturas. Resulta llamativo que a pesar de haber recibido sólo dos muestras del litoral marítimo antártico, se encontraran en ellas tres tipos morfológicos distintos de *Schizochytrium*. Uno de ellos (*S. sp. b*) podría tratarse de una nueva especie mientras que otro fue identificado como

S. octosporum, taxón con una única cita previa para las aguas frías de Noruega (Raghukumar 1988). Por su parte, la cepa de *Schizochytrium* obtenida a partir de sedimentos y agua de la laguna salina Vilama probablemente constituya una nueva especie, no sólo por las singularidades del ambiente de origen, sino también debido a su reducido tamaño y dificultad para su cultivo, que no se corresponden con ninguna de las especies descritas previamente en la literatura. Otros representantes del género *Schizochytrium* se encontraron en la albufera de Mar Chiquita, el litoral marítimo patagónico, la laguna La Salada y las marismas de San Antonio Oeste y Bahía Blanca. Si bien no ha sido posible completar la diagnosis para la mayoría de estos aislamientos locales, una importante proporción de los mismos presenta una mayor similitud morfológica con *S. aggregatum*, la especie de distribución más amplia, con registros para agua de mar de Estados Unidos (Goldstein & Belsky 1964, Amon 1978), el Caribe (Sparrow 1968), Nueva Zelanda (Karling 1968), Canadá (Booth & Miller 1969), Inglaterra (Alderman et al. 1974), Japón (Konno 1969), India (Chakraborty, 1974) y Brasil (Ulken 1966), entre otros

Respecto a la presencia de representantes holocárpicos del género *Thraustochytrium* en los materiales locales analizados, la especie de más amplia distribución resultó *T. striatum*. Este organismo se registró principalmente en ambientes estuariales, como la marisma de San Antonio Oeste, de Bahía Blanca y la albufera Mar Chiquita, aunque también fue encontrado en las muestras del litoral marítimo de Caleta Córdova así como en la laguna La Salada. Cabe mencionar que las citas previas de esta especie corresponden exclusivamente a ambientes marinos fríos, la mayor parte de ellos europeos (Schneider 1967, Gaertner 1969, Alderman et al. 1974). Por su parte, *T. globosum*, también de amplia distribución en ambientes marinos a escala mundial, con registros para Japón (Kobayashi & Ookubo 1953), Estados Unidos (Sparrow 1969), Alemania (Ulken 1965) y Canadá (Booth 1971b), fue reconocido en dos humedales argentinos en conexión con el mar: el arroyo La Mata y la albufera Mar Chiquita. Si bien esta especie resultó predominante en una de las pocas lagunas salinas estudiadas previamente (Gran Lago Salado de Utah, USA, Amon 1978), no fue hallada en ninguno de los humedales de este tipo estudiados aquí.

La biodiversidad de especies de *Thraustochytrium* eucárpicas documentada en las muestras analizadas se vio reducida a tres únicos representantes: *T. antarcticum*, *T.*

aureum y *T. kinnei*. En el caso de *T. antarcticum*, es llamativa la disparidad de los hábitats en que fue encontrada, siendo la cita original para aguas superficiales antárticas (ca. 50 m de profundidad, Bahnweg & Sparrow 1974), mientras que el aislamiento aquí descrito (LSA4) se encontró en una laguna salada, sin conexión directa con el mar y unos cuantos kilómetros tierra adentro. Contrariamente, las otras dos especies mencionadas corresponden a organismos de amplia distribución a escala mundial (Karling 1981). *T. aureum* ha sido registrada para ambientes marinos cálidos en el Caribe (Booth 1971a), templados en Estados Unidos (Goldstein 1963b), o templado-fríos en el Mar del Norte (Gaertner & Raghukumar 1980). Por su parte, las cepas locales asignadas a este taxón provinieron del litoral marítimo de Santa Cruz y de la albufera Mar Chiquita. Finalmente *T. kinnei*, documentado previamente en agua de mar de Alemania (Gaertner 1969) e Inglaterra (Alderman et al. 1974) fue la especie más representada en los ambientes costeros patagónicos, habiéndose encontrado en los materiales con predominancia de material algal tomados en Comodoro Rivadavia, Puerto Madryn, Puerto Pirámides, Las Grutas, el canal de Beagle así como también en el estuario de Bahía Blanca.

Dentro del género *Ulkenia*, la especie más frecuentemente registrada ha sido *U. visurgensis*, citada para el estuario de Wesser en Alemania (Ulken 1966), el Caribe (Sparrow 1968), el Mar del Norte y el Océano Atlántico Norte (Gaertner 1969, 1974), el Mar de los Sargazos (Ulken 1979), el Mar Blanco en Rusia (Artemchuk 1972) e incluso para Brasil (Ulken 1966). El hallazgo de esta especie en una gran variedad de ambientes acuáticos, que incluyen aguas turbias de estuarios hasta cuerpos con alta salinidad, daría cuenta de su gran adaptabilidad (Ulken 1984). En los humedales salinos de la Argentina, *U. visurgensis* también se encontraría ampliamente distribuida, con predominancia en los ambientes de aguas más calmas, como las lagunas salinas La Salada y Rada Tilly y la albufera Mar Chiquita, pudiendo además estar presente en ambientes costeros patagónicos como las restingas de Puerto San Julián y Puerto Deseado.

Las otras dos especies de *Ulkenia* reconocidas en los materiales estudiados corresponden a organismos de hallazgo menos frecuente. Tal es el caso de *U. radiata*, único taxón presente en las muestras de la marisma de Bahía San Borombón, que a su vez sólo había sido citada previamente para piletones de marea del Mar del Norte

(Gaertner 1977). Por su parte, *U. minuta*, reportada por Raghukumar (1977) también para aguas frías del Mar del Norte, fue encontrada en aguas costeras patagónicas de temperaturas similares. Es llamativo que los dos únicos representantes locales de este último taxón provinieran de muestras similares, con abundante cantidad de fragmentos de algas en descomposición del frente de marea de Las Grutas y Puerto Pirámides.

Otra de las tendencias observadas respecto a la distribución de especies en los ambientes estudiados es que para aquellos humedales en los que se tomaron muestras en diferentes campañas de recolección, los taxones identificados variaron. Tal es el caso de la laguna La Salada, en la que se hallaron representantes de *U. visurgensis*, *U. radiata* y *T. antarcticum* en los materiales obtenidos en junio del 2004, mientras que en los de diciembre del 2006 se registraron dos tipos morfológicos diferentes de *Schizochytrium* y una especie eucárpica de *Thraustochytrium* con similitud con *T. aureum*. Otro ejemplo es el de las cepas aisladas a partir de algas recolectadas en la cuarta bajada de la playa de las Grutas: *U. amoeboida* y *T. kinnei* de materiales tomados en diciembre del 2006 y una especie de *Schizochytrium* para aquellos de mayo del mismo año. Estas diferencias podrían estar dando cuenta de variaciones estacionales en las poblaciones locales de traustoquitriales, tal como ha sido ampliamente documentado para otros ambientes estudiados en mayor detalle (ver tabla 3.3).

3.6- Conclusiones

La caracterización morfológica en cultivos en cebos y agua de mar de los aislamientos locales de traustoquitriales permitió asignarlos a los tres géneros más comunes para estos organismos: *Thraustochytrium*, *Schizochytrium* y *Ulkenia*. No se encontraron representantes de los géneros *Japonochytrium* ni *Althornia*. Debido a que los rasgos de las cepas estudiadas en general no pudieron encuadrarse completamente dentro de las descripciones originales de las especies de este grupo, las determinaciones a nivel específico se presentan con el estatus de *affinis* aunque el análisis morfológico exhaustivo no resultó posible en todos los casos. Las observaciones realizadas permitieron identificar la presencia de representantes de *U. aff. radiata*, *U. aff. visurgensis*, *U. aff. amoeboida*, *T. aff. globosum*, *T. aff. striatum*, *T. aff. antarcticum*, *T. aff. kinnei*, *T. aff. aureum* y *S. aff. octosporum* en los humedales salinos de la Argentina. Si bien no fue posible asignar a una determinada especie a la mayor parte de

los aislamientos de *Schizochytrium*, una parte de ellos mostró similitudes con *S. aggregatum* mientras que otra parte presentó células vegetativas muy pequeñas y requerimientos particulares para su cultivo, por lo que probablemente se trate de organismos no estudiados previamente. Delinear más precisamente la identidad de varias de las cepas locales, particularmente de los representantes de este último género, requiere indudablemente de la aplicación de herramientas bioquímicas y moleculares, tal como se abordará en el siguiente capítulo.

Los taxones más frecuentemente hallados variaron estacionalmente y según el tipo de humedal del cual proviniera el material analizado. En general, en aquellos ambientes sometidos a condiciones climáticas más extremas, como el litoral marítimo antártico o la laguna Vilama predominaron los representantes de *Schizochytrium*, mientras que en las aguas más calmas, como la albufera Mar Chiquita o la laguna La Salada *U. aff. visurgensis* fue dominante. En los humedales patagónicos, *T. aff. striatum* resultó la especie de mayor abundancia para los estuarios y *T. aff. kinnei* para el litoral marítimo. Sin embargo debe considerarse que los materiales analizados representan la fracción cultivable de las traustoquitriales de una gran variedad de ambientes del país, y por lo tanto las conclusiones que puedan obtenerse a partir de su análisis constituyen simplemente una primera aproximación a la descripción de la biodiversidad de estos organismos.

La determinación tradicional de especies en base a unos pocos caracteres morfológicos llevó a que aislamientos que compartieran estos rasgos pero difirieran en otros fueran asignados a un mismo taxón. Un ejemplo ilustrativo de esta situación es la identificación como *Ulkenia aff. visurgensis* de un gran número de cepas con protoplastos ameboidales, las cuales en muchos casos provinieron de ambientes muy dispares, y exhibieron distintos tipos de esporangios y requerimientos para su cultivo. Sin embargo, estos aislamientos pudieron ser fácilmente diferenciables según las características morfológicas de sus colonias en agar o la comparación de las condiciones para su cultivo, atributos que fueron compartidos por aquellas cepas con idénticos rasgos en granos de polen. Por tal motivo se propone la utilización de esas herramientas para distinguir cepas cuyos rasgos diagnósticos sean indiferenciables, o no permitan su asignación a distintas especies, y de este modo disminuir la subestimación de la biodiversidad en los ambientes estudiados. Considerando las limitaciones de la

taxonomía tradicional de las traustoquitriales, la información aportada en este capítulo puede resultar particularmente valiosa para un análisis posterior a la luz de nuevos conocimientos, especialmente para aquellas cepas que se presume podrían ser nuevos taxones.

CAPITULO IV: CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA Y MOLECULAR DE LOS AISLAMIENTOS

4.1- Resumen

Se completó la caracterización de las cepas locales mediante estudios bioquímicos y moleculares, analizando los resultados en función de la información morfológica y nutricional obtenida para estos aislamientos. Los perfiles de PUFA's resultantes y los análisis de filogenia molecular basados en la secuencia del gen ARNr 18S permitieron reconocer entre las cepas locales representantes de los nuevos géneros de traustochytriales, diferenciar cuales de los taxones anteriormente determinados representaban grupos monofiléticos y reevaluar tanto los criterios taxonómicos recientemente propuestos como los tradicionales.

4.2- Introducción

4.2.1- Nuevos criterios para la identificación de traustochytriales

La composición de los lípidos celulares ha demostrado ser un criterio estable y valioso para caracterizar, diferenciar e identificar distintos organismos, incluyendo bacterias (Guckert et al. 1991), hongos filamentosos (Stahl & Klug 1996), levaduras (Gunasekaran & Hughes 1980) y plantas superiores (Wolff et al. 2001). En las traustochytriales, un primer y valioso aporte para la resolución de su problemática taxonomía, fue realizado por Huang et al. (2003), quienes, basados en dicho criterio, propusieron la utilización del perfil de PUFA's como rasgo diagnóstico, ya que mostró tener una fuerte correlación con los linajes filogenéticos. A partir de este trabajo, y de la demostración de que los tres géneros mayoritarios de traustochytriales (*Schizochytrium*, *Thraustochytrium* y *Ulkenia*) constituían grupos polifiléticos (Honda et al. 1999), se han realizado recientemente rearrreglos taxonómicos en dos de ellos (*Schizochytrium* y *Ulkenia*) en base a la combinación de caracteres morfológicos, bioquímicos y moleculares. El aporte de estos estudios, incluyendo las modificaciones y criterios propuestos, se detalla en las siguientes líneas.

Yokoyama & Honda (2007) mostraron que las especies que se habían identificado como *Schizochytrium* formaban tres grupos monofiléticos según estudios basados en la secuencia del gen que codifica el ARN de la subunidad ribosomal pequeña de 18S (ARNr 18S). Estos tres grupos pudieron distinguirse también claramente a partir de la combinación de sus características morfológicas (tamaño de la colonia, morfología de la zoospora, etc.), sus perfiles de PUFAs y sus pigmentos carotenoides, aunque resultó difícil diferenciarlos a partir de un solo tipo de rasgo. Consecuentemente los autores propusieron asignar la categoría de género a estos tres grupos, enmendando el género *Schizochytrium* y creando dos nuevos taxones. El género *Schizochytrium* sensu stricto incluyó la cepa ATCC 28209 identificada como *S. aggregatum* y a otras cinco cepas no identificadas, incorporándose a su diagnosis las siguientes características: 1) acumulación de aproximadamente 20% de ácido araquidónico (ARA) en sus PUFAs totales, 2) acumulación de β -carotenos sin astaxantina ni cantaxantina y 3) secuencia del gen ARNr 18S distintiva. Un nuevo género, *Aurantiochytrium*, fue erigido para *A. (S.) limacinum*, *A. (S.) mangrovei* y otras nueve cepas no identificadas. Sus rasgos morfológicos característicos fueron la tendencia a no formar colonias grandes en fase de crecimiento y no desarrollar elementos de la red ectoplasmática. La acumulación de astaxantina y una composición de PUFAs dominada por DHA con niveles de ARA menores al 5% se presentaron también como atributos distintivos de este taxón. El otro nuevo género, *Oblongichytrium*, quedó compuesto por *O. (S.) minutum*, *O. (S.) multirudimentale* y tres cepas más, y se caracterizó por sus zoosporas elipsoidales, aproximadamente un 20% de ácido docosapentaenoico (siendo el DPA n-3 más abundante que el DPA n-6) en sus PUFAs totales y la acumulación de cantaxantina y β -caroteno, pero no de astaxantina. Es de notar que la filiación de *S. octosporum* no pudo ser evaluada por no haber materiales disponibles.

En Yokoyama et al. (2007) se aplicó el mismo tipo de enfoque para el género *Ulkenia*, distinguiéndose cuatro grupos monofiléticos que se asignaron a 4 géneros. *U. visurgensis* (especie tipo), *U. profunda* y *U. amoeboides* fueron reconocidas como especies del género *Ulkenia* sensu stricto, y su relación monofilética fue apoyada por su composición de pigmentos carotenoides, que incluyó astaxantina, fenicoxantina, equineno y β -caroteno. Típicamente el perfil de PUFAs mostró un contenido de ARA

de 10-15% y de DHA del 50% o más. Un nuevo género, *Botryochytrium*, quedó compuesto por *B. (U.) radiata* y *B. (U.) profunda*. Las células de este taxón se distinguieron del resto por poseer cantaxantina, equineno, β -caroteno y abundante DPA n-6 (40% aproximadamente). Otro de los nuevos géneros propuestos, *Parietichytrium*, con *P. (U.) sarkarianum* como especie tipo, se caracterizó por poseer únicamente β -caroteno así como cantidades abundantes (10%) de ácido docosatetraenico (DTA) en su perfil de PUFAs. En su diagnóstico también se incluye la formación de estadios ameboidales con forma de estrella, comportamiento que no se había comentado en la descripción original de *U. sarkariana* (Gaertner 1977). En la creación del tercer nuevo género, *Sicyoidochytrium*, erigido para tres cepas de *S. minutum*, se dio especial importancia al proceso de formación de zoosporas por divisiones vegetativas sucesivas. Las cepas que fueron incluidas en el mismo acumularon cantaxantina, equineno y β -caroteno al igual que los representantes de *Botryochytrium*, y sus niveles de ARA nunca superaron el 5% de los PUFAs.

4.2.2- Objetivos

Los objetivos de este capítulo son:

- Completar la caracterización de las cepas locales según su perfil de PUFAs y estudios de filogenia molecular basada en la secuencia del gen ARNr 18S.
- Reevaluar los criterios establecidos por Yokoyama et al. (2007) y Yokoyama & Honda (2007) para la reasignación de las cepas de *Ulkenia* sensu lato y *Schizochytrium* sensu lato a los géneros *Ulkenia* sensu stricto, *Botryochytrium*, *Parietichytrium* y *Sicyoidochytrium*, y *Schizochytrium* sensu stricto, *Aurantiochytrium* y *Oblongichytrium*, respectivamente.
- Proveer información acerca de la utilidad de estos caracteres bioquímicos y moleculares para el reconocimiento de especies, particularmente en el género *Thraustochytrium*.

- Discutir el valor taxonómico de los rasgos estudiados a partir de la integración de los resultados obtenidos en este capítulo y en los anteriores.

4.3- Materiales y Métodos

4.3.1- Cepas seleccionadas y preparación de muestras

Se analizaron todas las cepas disponibles depositadas en la colección BAFCCult que prosperaron en medio líquido (48 en total), las cuales fueron crecidas en frascos agitados de 100 ml conteniendo 20 ml de medio de cultivo en las condiciones indicadas en la tabla 2.7. No se incluyeron aquellos aislamientos que no proliferaron en medio líquido debido a su escasa producción de biomasa, insuficiente para las determinaciones analíticas, exceptuando las cepas S1, S26-1, S41sp, LGII y MC46B en las que fue posible obtener material para estudiar la composición de ácidos grasos. En este último caso, las cepas fueron crecidas en medio agarizado en placas de Petri (90 mm de diámetro). Las células se cosecharon luego de 10 días de incubación a $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ y se lavaron 3 veces con agua destilada.

4.3.2- Determinación de ácidos grasos (FAs)

La biomasa obtenida fue liofilizada y los FAs extraídos se determinaron por cromatografía gaseosa previa derivatización de los mismos. Para este propósito se optó por el método de transesterificación directa propuesto por Lepage y Roy (1986) que permite la utilización directa de la biomasa seca efectuándose simultáneamente un proceso de “clean-up”. Se trataron aproximadamente 10 mg de biomasa seca de cada cepa con una solución de CH_3COCl / CH_3OH en la proporción 1:20 v/v por 3 horas a 50°C . Se extrajeron los ésteres de ácidos grasos con n-hexano en presencia de agua y esta solución fue separada y llevada a seco por evaporación con corriente de nitrógeno. El extracto se resuspendió en 100 μl de hexano.

La determinación de FAs esterificados se realizó en un cromatógrafo gaseoso Hewlett Packard 5890A con detector de ionización de llama (FID) y una columna capilar termo Scientific TR-FAME de 30 m de longitud, 0,25 mm de diámetro y 0.25 μm de espesor de fase fija. La temperatura de horno inicial fue de 120°C durante 2 min,

seguido de un gradiente de $3^{\circ}\text{C min}^{-1}$ hasta 220°C y permanencia en la temperatura final de 5 min. El gas portador fue hidrógeno, con una velocidad de flujo de $0,6 \text{ ml min}^{-1}$ y una relación de “split” de 1:25. Las temperaturas del puerto de inyección y del detector fueron de 220 y 250°C , respectivamente. La cuantificación de ésteres metílicos de FAs (FAMES) se realizó empleando ácido nonadecanoico (19:0) (Sigma) como patrón interno, agregando 0,125 mg a cada muestra antes del proceso de esterificación metílica. La identificación de FAs se realizó tomando de referencia mezclas patrón certificadas de Supelco (FAME Mix 37, 18919) y de Nu-Chek (FAME Mix 569).

4.3.3- Secuenciación del gen ARNr 18S

Para la extracción de ADN genómico total, la biomasa lavada se trató 30 min a temperatura ambiente con 200 μl de buffer de lisis (Tris-Cl 0,25M, pH 8,2; EDTA 0,1M; SDS 0,1M; NaCl 0,1M; lisozima $2 \mu\text{g ml}^{-1}$), y se agregó 0,5 ml de reactivo DNAzol® (Invitrogen) al sedimento celular lavado. Luego de incubar 2 min a temperatura ambiente, el ADN se precipitó con etanol 100% v/v y se realizaron 3 lavados con etanol 70% v/v. El precipitado obtenido después de centrifugar (4.000 g 10 min) se resuspendió en 100 μl de NaOH 8 mM y se neutralizó con 18 μl de buffer HEPES 0,1 M. Para amplificar el gen ARNr 18S, 5 μl de la solución de ADN obtenida (o diluciones de la misma) se mezclaron con una solución de 0,2 mM de deoxinucleósidos trifosfato, 0,4 μM de cada cebador (SR1 y SR12, tabla 4.1), 3 mM de Mg^{2+} y 5U de Taq DNA polimerasa (Invitrogen) en buffer de reacción (25 μl de volumen final). Para la amplificación se utilizó el siguiente programa: denaturación a 94°C por 2 min, 35 ciclos de amplificación (30 seg a 94°C , 30 seg a 50°C y 2 min a 72°C) con una etapa de elongación final de 10 min a 72°C . Cuando no se observó amplificación en las condiciones anteriores se adicionó a la mezcla de reacción BSA ($0,4 \mu\text{g ml}^{-1}$) y/o DMSO ($0,4 \mu\text{g ml}^{-1}$) (Dieffenbach & Dveksler 2003). El producto de PCR obtenido se visualizó mediante electroforesis en geles de agarosa 1%, extrayéndose la banda correspondiente con el tamaño esperado del producto de PCR (1800 pb). El ADN amplificado se purificó utilizando el kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega). Se secuenció el producto de PCR purificado en ambos sentidos en el servicio de secuenciación del IIB-UNSAM, utilizando un equipo automatico Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer con los cebadores SR1, SR12 y

otros cebadores internos diseñados en base a las secuencias parciales obtenidas (tabla 4.1). Los números de acceso de las secuencias obtenidas (1750 pb aproximadamente) y depositadas en el banco de datos Genbank se muestran en la tabla 4.2.

4.3.4- Análisis filogenético

Las secuencias del gen ARNr 18S de otras cepas de traustquitriales, aplanoquitriales, labirintulales y de *Ochromonas danica* (elegida como grupo externo) se obtuvieron del banco de datos GenBank; los números de acceso se presentan en la tabla 4.3. El alineamiento de las secuencias se realizó con el programa ClustalW (Higgins et al.1994). Las posiciones con “gaps” o ambiguas fueron removidas para los posteriores análisis, conservándose 707 sitios nucleotídicos en el conjunto final de datos. Los árboles filogenéticos se construyeron mediante los métodos de distancias “neighbor-joining” (NJ, Saitou & Nei 1987) y evolución mínima (EM, Rzhetsky & Nei 1992), y de máxima parsimonia (MP, Eck & Dayhoff 1966). Las distancias evolutivas se estimaron con el método de máxima verosimilitud compuesta con el modelo de Tamura-Nei (1993) asumiendo igualdad en los patrones de sustitución entre los linajes y en las tasas de sustitución entre los sitios (Tamura et al. 2004). Los árboles más parsimoniosos y de mínima evolución se obtuvieron por búsqueda heurística empleando el algoritmo de “Close-Neighbor-Interchange” (Nei & Kumar 2000); los árboles iniciales se generaron por adición al azar de secuencias (10 réplicas) en el primer caso y mediante NJ en el segundo. El soporte de los nodos se calculó a partir de 1000 submuestras mediante el test de bootstrap (Felsenstein 1985). Todos los análisis moleculares evolutivos y filogenéticos se realizaron con el programa MEGA versión 4.0 (Tamura et al. 2007).

4.4- Resultados

4.4.1- Composición de FAs

La tabla 4.4 muestra la composición de FAs totales de las 53 cepas locales analizadas. En la misma puede observarse la presencia mayoritaria de los FAs saturados palmítico (C16:0) y esteárico (C18:0), además del insaturado oleico (C18:1, n-9), y una proporción variable de PUFAs, siendo los más abundantes los ácidos linoleico, ARA,

eicosapentaenoico (EPA), docosatrienoico, DPA (n-3 y n-6) y DHA, dependiendo de la cepa. También se registraron menores cantidades de los ácidos insaturados mirístico (14:0) y pentadecanoico (15:0), del insaturado palmitoleico (16:1) y de los PUFA γ -linolénico, α -linolénico, eicosadienoico, dihomo- γ -linolénico, docosadienoico y DTA. Estos compuestos representaron más del 90% de los FAs para todos los aislamientos estudiados excepto para SB1D, SCII, SCV, S26-1, S41sp, S1, AA3, B5, MC46B, LGII, S50sp, S48T y S26A, donde se encontraron otros no mencionados que totalizaron entre el 12 y el 26%. La figura 4.1 muestra como ejemplo un cromatograma típico en el cual se observan los picos correspondientes a las especies químicas mayoritarias, en las proporciones comentadas, para la cepa S2rc.

El porcentaje de PUFA respecto a FAs varió entre el 2,87% (cepa LSB) y el 67,99% (cepa S26A), obteniéndose los valores más bajos en los representantes de *U. aff. visurgensis* y lo más altos para los de *T. aff. kinnei*. Respecto a la cantidad de FAs en la biomasa, se registraron porcentajes entre el 2,31% (cepa SCII) y el 15,34% (cepa S44), siendo en general los más elevados los de algunas cepas de *Schizochytrium* sensu lato. Para aquellos aislamientos con altas cantidades de DHA se calculó el porcentaje que este FA representó de la biomasa total como $(\%DHA \times \%AG / biomasa) / 100$. Tres representantes de *T. aff. kinnei* (SB6A, SB41B y S50B) y uno de *U. aff. visurgensis* (S1) mostraron los mayores valores, con registros de 3,94, 3,43, 3,36 y 3,04% respectivamente. La presencia de DHA también fue mayoritaria en tres cepas de *Schizochytrium* sensu lato (B5, MC46B y LGII), pero al ser tan bajos sus contenido de FAs, el %DHA/biomasa resultó menor (1,17, 2,34 y 1,97% respectivamente).

4.4.2- Caracterización bioquímica: perfil de PUFA

Siguiendo los criterios establecidos por Yokoyama & Honda (2007) y Yokoyama et al. (2007) se comparó el perfil de PUFA con 4 o más insaturaciones, incluyendo ARA, EPA, DTA, DPA (n-3 y n-6) y DHA, entre las cepas locales según los géneros a los que habían sido asignadas en el capítulo anterior, En el caso de los 18 aislamientos caracterizados como *Ulkenia* sensu lato (fig. 4.2) pudieron separarse en tres grupos. El primero de ellos (grupo A) se caracterizó por un contenido de ARA de 10-15% y de DHA del 50%, típico de *Ulkenia* sensu stricto; en ellos el segundo PUFA mayoritario en general fue el DPA n-6. Los aislamientos del grupo B mostraron el perfil

diagnóstico del género *Botryochytrium*, con predominancia de DPA n-6 (al menos 40%); el DHA ocupó el segundo lugar y también se encontraron pequeños porcentajes de DPA n-3. Ambos grupos incluyeron aislamientos de *U. aff. radiata* y *U. aff. visurgensis*. El grupo C, formado por las cepas de *U. aff. minuta* y S1, no presentó niveles detectables de ARA y el DHA fue el PUFA mayoritario, como ocurre en el género *Sicyoidochytrium*; un rasgo particular de la cepa S1 es que no acumuló cantidades significativas de EPA.

La figura 4.3 muestra la comparación de los perfiles de PUFAs para las 10 cepas del género *Schizochytrium* sensu lato. También en este caso fue posible distinguir tres grupos. Por un lado, los aislamientos de MC15A, S34r, S44, S48cmc y S49cmc (grupo A) tuvieron cantidades de ARA de más del 20%, tal como ocurre en el género *Schizochytrium* sensu stricto, el DHA ocupó el segundo lugar y el DPA n-6 en general el tercero. Cabe mencionar que en todos ellos, el ácido linoleico, no incluido en este análisis, fue el PUFA mayoritario (tabla 4.3). Por otro lado, la cepa AA3 (grupo B) mostró el perfil típico del género *Oblongichytrium*: el DPA n-3 fue dominante respecto al DPA n-6, presentando el DHA el porcentaje más elevado. El contenido de PUFAs de las restantes cepas resultó compatible con el género *Aurantiochytrium* por incluir al DHA como componente mayoritario y muy bajas concentraciones de ARA y de DPA n-3. Dentro de este grupo (C) pudieron reconocerse tres subtipos: B5 y MC46B que contuvieron DPA n-6, y otras dos cepas sin presencia de este PUFA, una de ellas con bajas concentraciones de DPA n-3 (LGII) y otra con un perfil tan simple que sólo incluyó EPA además de DHA (S33C).

Los perfiles de PUFAs de las 25 cepas de *Thraustochytrium* se pueden observar en la figura 4.4. En este caso, al no haber patrones típicos disponibles en la literatura, se analizaron comparativamente los organismos que previamente se habían reconocido como diferentes taxones. Por tal motivo, se muestran primero los representantes holocárpicos y luego los eucárpicos. Los aislamientos de *T. aff. striatum* (ver tabla 3.2) tuvieron predominancia (más del 40%) de DPA n-6, pudiendo a su vez reconocerse los miembros de los subgrupos a y c (A1 en la fig. 4.4) por presentar además DPA n-3 a diferencia de los integrantes del subgrupo c (A2). El grupo B (fig. 4.4), conformado por *T. sp. a* (S12) y *T. aff. globosum* (S7), se caracterizó por acumular mayores porcentajes de DHA (entre el 40 y el 50%), ocupando el ARA el segundo lugar (30%) y el DPA n-6

el tercero (15-20%); el PUFA mayoritario en ambos fue el ácido linoleico, excluido de este análisis. Respecto a las cepas eucárpicas, el perfil de *T. sp. b* (S19T) fue muy similar al de los miembros del grupo A1. Las cepas de *T. aff. aureum* acumularon elevados porcentajes de DHA (más del 55%) y se pudieron dividir en dos grupos según el segundo PUFA mayoritario: EPA (más del 25%) en el grupo C y DPA n-6 (20%) en el grupo D. El patrón de *T. sp. c* (S48T, grupo E en la fig. 4.4) fue distinto del resto ya que contuvo altos porcentajes de PUFAs poco comunes (13% de DTA y 13% de DPA n-3) y no se registró DHA. Estos dos PUFAs inusuales se encontraron también en altos porcentajes (entre el 45 y 50% cada uno) en dos cepas *T. aff. kinnei* (S26A y TF, grupo F). Los restantes aislamientos de esta última especie formaron el grupo G, caracterizado por concentraciones muy altas de DHA (70%), EPA como segundo PUFA mayoritario (15-20%) y pequeñas cantidades (4% o menos) de ARA, DPA n-6 y DPA n-3.

4.4.3- Filogenia molecular

Dado que en el mejor árbol generado por cada uno de los tres métodos utilizados (NJ, EM y MP), las mismas cepas locales formaron grupos monofiléticos con las mismas cepas conocidas, se eligió uno de los árboles como modelo para inferir las relaciones filogenéticas entre estos organismos, indicándose los valores de bootstrap de las otras dos metodologías en los nodos comunes. La ubicación de las cepas conocidas en los tres árboles (figuras A.1. A.2 y A.3 del Apéndice) fue consistente con los reportes previos (Yokoyama & Honda 2007). A modo ilustrativo, aquellos organismos del mismo género, exceptuando *Thraustochytrium*, formaron grupos monofiléticos, siendo *Labyrinthula*, *Aplanochytrium* y *Oblongichytrium* los más basales.

La figura 4.5 muestra el árbol seleccionado, obtenido con el método de NJ, en el cual se colapsaron las ramas con un soporte menor al 50%. En el mismo puede observarse que (recuadro rojo) 12 cepas identificadas como *U. aff. radiata* y *U. aff. visurgensis* formaron un grupo monofilético sustentado por altos valores de bootstrap junto con cepas ya estudiadas de *Ulkenia amoeboida*, *Ulkenia visurgensis* y *Japonochytrium* sp. Dentro de este clado pudieron delinearse a su vez otros dos subgrupos monofiléticos con un muy buen soporte mientras que la ubicación de dos de

los aislamientos (MC11J y MC48B) fue variable en los distintos árboles. Las cepas SCI (*U. aff. visurgensis*) y SCIV (*T. aff. aureum*) resultaron basales a este grupo.

Otros agrupamientos robustos entre cepas locales y otras previamente estudiadas, con valores de bootstrap entre el 98 y 100% en los tres análisis, fueron los de *T. aff. aureum* (MC28C, MC18A) y *T. sp. c* (S48T) con *T. aureum* (recuadro azul), *T. aff. striatum* (MC26A, S33A, MC7D, S49sp, S50sp) con *T. striatum* (recuadro verde), *S. sp g é i* (S34r, S48cmc) con dos especies de *Schizochytrium* (recuadro anaranjado), y *T. aff. kinnei* (S50B, TF, S41b, S13, S26B, S29, S6A, S14, S26A) con *T. kinnei* (recuadro violeta). Estos dos últimos grupos monofiléticos y *T. gaertnerium* fueron muy cercanos en las tres topologías, así como el correspondiente a *T. striatum* y *T. motivum*.

Por su parte, otros aislamientos locales formaron grupos monofiléticos con representantes de géneros recientemente erigidos en base a estos caracteres moleculares. Tal fueron los casos de SB4A (identificada morfológicamente como *U. aff. radiata*) con *Parietichytrium sarkarianum* (recuadro amarillo), B5 (reconocida como *Schizochytrium* sp. j) con dos especies de *Aurantiochytrium* (recuadro rosado), y AA3 (*Schizochytrium* sp. b) con dos especies de *Oblongichytrium* (recuadro celeste).

Finalmente cabe mencionar que para representantes de *S. sp e* (MC15A), *S. sp i* (S44, S49cmc), *T. aff. globosum* (S7), *T. sp a* (S12) y *T. sp a* (S19T) no se encontraron las condiciones adecuadas para la reacción de amplificación, a pesar de ensayar numerosas alternativas. Por otro lado, sólo se obtuvieron secuencias parciales, que no pudieron ensamblarse debido a una gran cantidad de indeterminaciones, para 4 aislamientos de *T. aff. striatum* (S2rc, S2sp, S32sp y S34sp); su comparación con otras secuencias disponibles en bases de datos mediante el programa de alineamiento local BLAST (datos no mostrados) halló las máximas similitudes con la secuencia del gen ARNr 18S de la cepa *T. striatum* con número de acceso AB022112.1. La superposición de los fragmentos parciales con esta secuencia reveló que para las cuatro cepas las regiones sin amplificar se ubicaron entre las posiciones 305-695 y 1135-1350 de la utilizada como patrón.

4.5- Discusión

Todos los aislamientos locales estudiados formaron grupos monofiléticos con otros previamente caracterizados, con un soporte estadístico significativo, independientemente del tipo de método empleado. Estos resultados coincidieron además con la información obtenida a partir de los perfiles de PUFAs, así como con los rasgos morfológicos (capítulo III), las características de las colonias y las condiciones de cultivo (capítulo II), tal como se analiza a continuación para cada uno de los tres géneros tradicionales. Finalmente, a partir de la integración de esta información se discute el valor taxonómico de los distintos caracteres diagnósticos de las traustochytriales.

4.5.1- Caracterización de las cepas de *Ulkenia* sensu lato

Tal como se mencionara en la Introducción de este capítulo, las especies del género tradicional *Ulkenia* (sensu lato) han sido reclasificadas en 4 géneros: *Ulkenia* sensu stricto, *Botryochytrium*, *Parietichytrium* y *Sicyoidochytrium* (Yokoyama et al. 2007). En los análisis de filogenia molecular realizados en este trabajo, el clado *Ulkenia* sensu stricto se vio conformado por cepas conocidas de *U. visurgensis* (especie tipo del género), *U. amoeboidea* y *Japonochytrium* sp., y por 12 aislamientos locales identificados morfológicamente como *U. aff. visurgensis* y *U. aff. radiata*. Si bien estos resultados demuestran que las cepas estudiadas son especies de *Ulkenia* sensu stricto, pudieron diferenciarse dos subclados en el árbol filogenético (fig. 4.5), que, en general, también se pudieron reconocer según los perfiles de PUFAs (A y B en la fig. 4.2). Uno de estos perfiles (B) es típico del género *Botryochytrium*, del cual *B. radiatum* (anteriormente *U. radiata*) es la especie tipo. Adicionalmente durante la caracterización morfológica de las cepas (capítulo III) ya se había cuestionado la validez de la separación de las especies *U. visurgensis* y *U. radiata* debido a que en algunos materiales locales se había observado superposición de caracteres diagnósticos (particularmente amebas con clivaje irregular y regular en un mismo cultivo clonal). Estas inconsistencias entre los resultados de los estudios morfológicos, los perfiles de PUFAs y los del análisis de filogenia molecular respecto a lo establecido por Yokoyama et al. (2007) sugieren que el límite entre los géneros *Ulkenia* y *Botryochytrium* no sería tan claro como los autores proponen. Considerando además que para la erección de

Botryochytrium solamente se analizaron todos los caracteres en una única cepa, su validez como género probablemente requiera de más datos como los propios autores de este taxón reconocen (Yokoyama et al. 2007). A partir de todo lo dicho se decidió asignar los aislamientos mencionados a *Ulkenia* sensu stricto. Otro dato que sustenta esta decisión es que todas estas cepas formaron colonias similares, de color rosa-anaranjado (típico de *Ulkenia* sensu stricto, debido a la ausencia de cantaxantina) y patrón celular tipo mosaico. En cuanto a los dos subclados acompañados por una tendencia a poseer perfiles diferentes de PUFAs, podrían constituir especies distintas, lo cual debería confirmarse con estudios adicionales.

Por su parte, la cepa SB4A, identificada según su morfología como *U. aff. radiata* pero distinguible de otras cepas asignadas a la misma especie por los rasgos de sus colonias, formó un grupo monofilético con *Parietichytrium sarkarianum*. Estos dos organismos se caracterizaron además por la división centrípeta del estadio ameboidal al formar las zoosporas. A pesar de que en el material local no se observó la persistencia de la pared luego de la liberación del protoplasto ni se encontraron cantidades de DTA del orden del 10% tal como se establece en la diagnosis de *Parietichytrium*, la coincidencia en el resto de los rasgos con la especie tipo y su clara diferenciación de las otras cepas locales con estadios ameboidales parecen buenos argumentos para justificar su asignación a este género.

Las cepas de *U. aff. minuta* (S26-1, S41sp) y S1 (reconocido morfológicamente como cepa particular de *U. aff. visurgensis*) no fueron incluidas en los estudios de filogenia molecular debido a su limitado crecimiento. Además de presentar similares requerimientos para su cultivo, estos organismos también tuvieron patrones de PUFAs relativamente parecidos, compatibles con el género *Sicyoidochytrium*. Las cepas de *U. aff. minuta* compartieron además los rasgos morfológicos en granos de polen con *Sicyoidochytrium* (anteriormente *Ulkenia*) *minutum*, la especie tipo de este taxón, por lo cual la información bioquímica reforzaría su inclusión en este nuevo género. Respecto a S1, este organismo podría ser una nueva especie, debido a que mostró caracteres compatibles con diferentes géneros, y a su vez otros únicos, como la morfología de sus colonias. Su zoosporogénesis fue coincidente con la de *U. visurgensis*, mientras que, si bien su perfil de PUFAs fue más parecido al de *S. minutum* tal cual se mencionara anteriormente, no se encontraron niveles detectables de EPA como en los restantes

representantes de este género. El esclarecimiento de la identidad de la cepa S1 requerirá del hallazgo de las condiciones de cultivo adecuadas a fin que poder analizar su filiación molecular con otros organismos.

4.5.2- Caracterización de las cepas de *Schizochytrium* sensu lato

La información obtenida a partir de los estudios de filogenia molecular y de los perfiles de PUFAs permitió completar la caracterización de algunos de los aislamientos, identificados morfológicamente como especies de *Schizochytrium* sensu lato y asignarlos a alguno de los tres géneros en que Yokoyama & Honda (2007) lo subdividieron: *Schizochytrium* sensu stricto, *Oblongichytrium* y *Aurantiochytrium*.

Las cepas S34r, S44, S48cmc, S49cmc y MC15A exhibieron el perfil de PUFAs del género *Schizochytrium* sensu stricto, con el ácido linoleico como el PUFA mayoritario. Si bien en estos aislamientos la obtención de biomasa (y ADN genómico) no resultó un inconveniente, la amplificación del gen ARNr 18S presentó numerosas dificultades y sólo pudo completarse para dos de ellos (S34r y S44). En concordancia con su perfil de PUFAs, estas dos cepas conformaron un grupo monofilético junto con los dos representantes del género *Schizochytrium* sensu stricto incluidos en el análisis, lo que confirmaría su pertenencia a este género. Es de notar que los rasgos morfológicos en polen ya habían resultado semejantes a los de la especie tipo (*S. aggregatum*). La cepa S34r, por su parte, presentó condiciones particulares para su cultivo (no prosperó a temperaturas mayores a 18°C) y colonias con características únicas, por lo que probablemente se trate de una nueva especie.

Respecto al aislamiento antártico AA3, tanto su perfil de PUFAs como su ubicación en el árbol filogenético indican que sería un miembro del género *Oblongichytrium*. El requerimiento de bajas temperaturas de esta cepa así como sus rasgos únicos en cultivos en agua de mar y granos de polen descritos en el capítulo III, sugieren que se trataría de una especie nueva para la ciencia.

Finalmente, las cepas B5, MC46B, LGII y S33C presentaron un perfil de PUFAs similar al del género *Aurantiochytrium*. La única cepa que prosperó en cultivos líquidos

y pudo ser secuenciada (B5) formó un grupo monofilético con *A. limacinum* y *A. mangrovei*, confirmándose lo indicado por el perfil de PUFAs. Otras seis cepas locales caracterizadas recientemente en nuestro laboratorio, también presentaron divisiones vegetativas en cultivos en polen, crecimiento muy limitado, similar perfil de PUFAs y se ubicaron dentro del mismo clado (datos no mostrados). Estos resultados indican que el género *Aurantiochytrium* incluye especies con crecimiento muy limitado a diferencia del profuso de las de manglares (*A. limacinum* y *A. mangrovei*), que bien podría ser que se tratara de nuevos taxones.

4.5.3- Caracterización de las cepas de *Thraustochytrium*

La distribución de los representantes de *Thraustochytrium* en los árboles filogenéticos obtenidos en este trabajo sustenta la condición polifilética del género, tal como ya ha sido sugerido (Honda et al. 1999). Es importante destacar que el principal impedimento para delimitarlo con una mayor precisión, es la falta de cultivos disponibles de la especie tipo (*T. proliferum*). Sólo será posible establecer cuál de los diversos clados monofiléticos en que se congrega *Thraustochytrium* (en su concepción morfológica), mantendría el epíteto genérico y cuales constituirían, eventualmente, nuevos taxones una vez que se designe un nuevo epitipo de referencia para este organismo (ICBN 2006, Art. 9.7), para lo cual será necesario el aislamiento de un espécimen que coincida lo más posible con la diagnosis original de la especie (cuya tipología es iconotípica, es decir una ilustración) (Sparrow 1936). A pesar de que no se cuenta con elementos para resolver este interrogante, las relaciones filogenéticas entre los distintos aislamientos locales y otros conocidos resultó de utilidad para analizar la información aportada por los estudios morfológicos y de cultivo, tal como se discute a continuación.

Comenzando por los subgrupos delineados dentro de *T. aff. striatum* en base a las características morfológicas en polen, los requerimientos para su cultivo y la morfología de su colonia (a, b, c, ver tabla 3.2), ellos se segregaron a su vez según sus perfiles de PUFAs (A1 conteniendo a los subgrupos a y c, y A2 constituido por los representantes de b, fig. 4.4). Los estudios de filogenia molecular fueron útiles para demostrar que constituyen un grupo monofilético con una cepa previamente caracterizada de la misma especie, pero no arrojaron información adicional acerca de la

relación entre los subgrupos, lo que requeriría entonces del análisis de caracteres adicionales. Es de notar que solamente la mitad de dichas cepas pudieron incluirse en estos análisis debido a la imposibilidad de ensamblar las secuencias parciales de la mitad restante por contener regiones con numerosas indeterminaciones. La ubicación de estas regiones en las mismas posiciones respecto a otra cepa patrón disponible en las bases de datos podría aportar información filogenética, aunque primero debe descartarse que estas dificultades se deban a problemas metodológicos asociados a la formación de estructuras secundarias o un alto contenido de CG.

El clado formado por *T. aff. aureum* (MC28C, MC18A), S48T (identificado como *T. sp. c*) y un representante conocido de *T. aureum* fue el más cercano al grupo anteriormente analizado. Las dos primeras cepas habían sido previamente asignadas al mencionado taxón y mostraron además un perfil de PUFAs similar entre ellas (D). Por su parte S48T también había presentado características morfológicas compatibles con esta especie, pero su asignación había permanecido tentativa debido a algunas pequeñas inconsistencias con los materiales tipo, como una fase inmóvil de las zoosporas al momento de ser liberadas. Las diferencias entre esta cepa y las dos anteriores en cuanto a sus perfiles de PUFAs (grupos D y E en la fig. 4.4), condiciones de cultivo (tabla 2.7) y tipo de colonia (tabla 2.4), podrían justificar su tratamiento como distintos taxones infraespecíficos de *T. aureum*. Otro aislamiento estudiado con morfología de *T. aureum* que quedó excluido de este clado (SCIV), se distinguió de los integrantes del mismo por su perfil de PUFAs (grupo C), por lo que probablemente corresponda a otra especie. Es de notar su condición basal con respecto al bien establecido clado del género *Ulkenia*.

La ubicación de las cepas de *T. aff. kinnei* en un grupo monofilético junto con una cepa previamente caracterizada de *T. kinnei* avala su identificación según los criterios morfológicos. Todas ellas excepto S26A y TF presentaron un perfil de PUFAs muy similar, así como el mismo tipo de colonia y similares requerimientos para su cultivo, por lo que constituirían un taxón natural. Finalmente, respecto a las cepas de *T. aff. globosum* (S7), *T. sp. a* (S12) y *T. sp. b* (S19T), no fue posible obtener la secuencia del gen ARNr 18S debido a que no lograron establecerse las condiciones adecuadas para su amplificación. Considerando además que el estudio de los rasgos morfológicos sólo había permitido la identificación a nivel específico de S7, el perfil de PUFAs de

estos aislamientos no resultó muy informativo, aunque podría ser de utilidad al momento de disponer de más datos.

4.5.4- El aporte de los distintos caracteres a la sistemática de las traustoguitriales

Los caracteres moleculares estudiados resultaron sumamente útiles para establecer las afinidades filogenéticas entre los aislamientos argentinos y los previamente sometidos al mismo tipo de estudio por otros autores, delineándose clados monofiléticos que son los que permiten sustentar decisiones taxonómicas. En este sentido, constituyeron un marco de referencia para la comparación de la validez de otro tipo de caracteres (bioquímicos, nutricionales y morfológicos) con fines sistemáticos. Cabe mencionar que para los estudios filogenéticos moleculares de los labirintulomicetes, el único tipo de información disponible es la secuencia del gen ARNr 18S, razón por la cual se abordó su estudio en esta tesis. El análisis de varios genes (que codifican la actina, la β -tubulina y el factor de elongación 1α) solamente ha sido abordado en un reciente trabajo (Tsui et al. 2009), el cual ha señalado interesantes aspectos evolutivos de los labirintulomicetes, pero sin agregar nueva información para la delimitación de géneros de traustoguitriales. Tal como ha sido mostrado en repetidas ocasiones, la utilización de varios genes es necesaria para resolver relaciones filogenéticas en los niveles genérico y específico (Letcher et al. 2008), y probablemente resulte clave para esclarecer algunos de los actuales interrogantes del estudio sistemático de las traustoguitriales. Es importante destacar que para que este tipo de herramientas resulten informativas deberán resolverse previamente dos limitaciones: la ausencia de cultivos de representantes de los taxones tradicionales (particularmente *T. proliferum*, especie tipo del género) que puedan ser adoptados como epítipos así como la disponibilidad de un mayor número de aislamientos para poblar los clados pobremente representados en los actuales árboles filogenéticos (v.g., el caso de *B. radiatum*).

Por su parte, los perfiles de PUFAs permitieron reconocer no solamente los taxones determinados en base a los rasgos morfológicos y al análisis filogenético, sino también individualizar aquellas cepas que mostraron distintos tipos de colonia y requerimientos de cultivo a pesar de que habían sido asignadas a un mismo taxón (como S1 y S3). También fueron útiles para distinguir subgrupos morfológicos no resueltos en

los árboles filogenéticos (como aquellos denominados a, b y c para *T. aff. striatum*). En el caso de las cepas de *Ulkenia* sensu stricto, los dos subgrupos de PUFAs encontrados que presentaron correlación con dos linajes filogenéticos probablemente reflejen la existencia de dos especies, considerando que las diferencias son moderadas (únicamente cambiaron las proporciones de DPA n-6 y DHA) y en lo poco confiable que resulta la definición del género *Botryochytrium*. La ausencia de DTA entre los PUFAs de la cepa SB4A, reasignada en este capítulo al género *Parietichytrium*, probablemente se deba a las diferencias en las condiciones de cultivo empleadas para las otras cepas estudiadas previamente (medio GPY, Yokoyama et al. 2007). En este sentido, sería muy importante establecer con más precisión las condiciones en que estas determinaciones deben realizarse para reducir la variabilidad de los caracteres evaluados.

El análisis de la composición de ácidos grasos permitió además reconocer los aislamientos locales más oleaginosos. La baja proporción de FAs registrada en la mayoría de las cepas probablemente se deba a que las condiciones de cultivo empleadas no propiciaron la acumulación de lípidos. Tal como se comentará en el capítulo VI, los medios de cultivo con altas relaciones C:N son preferidos para la producción de Fas (Rosa et al. 2010), y para estas determinaciones se empleó en general MC, el cual posee una relación C:N baja. Las mayores concentraciones de DHA respecto a la biomasa se encontraron en representantes de *T. aff. kinnei* y en la cepa S1. Esta última había exhibido abundantes gúttulas lipídicas al ser examinada al microscopio óptico (fig. 3.10 D).

La reevaluación de la caracterización morfológica de las cepas locales y de sus requerimientos para ser cultivadas a la luz de los resultados de los estudios moleculares y bioquímicos permite esbozar algunas conclusiones sistemáticas interesantes. En primer lugar, entre los rasgos morfológicos que presentaron correlación con los linajes filogenéticos pueden mencionarse la división vegetativa de las células tróficas (en *Schizochytrium* sensu stricto, *Oblongichytrium* y *Aurantiochytrium*) así como de los protoplastos ameboidales liberados por los esporangios (en *Sicyoidochytrium*) y las características de las colonias (que fueron constantes para los miembros de un mismo clado o subclado). Contrariamente, la movilidad de las zoosporas al momento de ser liberadas, y la regularidad con que se cliva el protoplasto ameboidal en los representantes de *Ulkenia* sensu stricto no parecieran ser atributos confiables para la

determinación de especies (v.g., *U. visurgensis* vs. *U. radiata*). Otros caracteres de los esporangios, como la forma, la persistencia de su pared luego de liberar las zoosporas o la presencia de fundamentos han sido compartidos por los miembros de un mismo clado, por lo que no debería descartarse su importancia taxonómica.

En lo global de los labirintulomicetes, y restringiéndonos a los aspectos morfológicos, reflejo del tipo de reproducción y desarrollo, el análisis filogenético muestra que taxones basales como *Labyrinthula*, *Oblongichytrium* y *Schizochytrium* sensu stricto, son capaces de proliferar tanto mediante divisiones vegetativas como por la producción de zoosporas. Ahora bien, como las zoosporas pasan a ser componentes del plancton, expuestas a ser depredadas por zoopláncteres (microcrustáceos, ciliados, flagelados, rizopodarios, etc.) y otros heterótrofos (v.g. moluscos bivalvos) (Gleason et al. 2008), y que a la vez, en su carácter de células desnudas, sin la pared de las vegetativas, poseerían una mayor susceptibilidad a la infección viral, es verosímil interpretar que pueda haber existido un compromiso (“trade off”) evolutivo (presiones de selección mediante) entre la predominancia de ambos sistemas de proliferación (el vegetativo y el zoosporogénico). El hallazgo de partículas de tipo viral en las traustochytriales ha sido mencionado en varios trabajos (Kazama & Schornstein 1972 y 1973, Takao et al. 2005 y 2007) y se abordará en más detalle en el siguiente capítulo. En este sentido, y de acuerdo con el cladograma obtenido, la predominancia de la división vegetativa constituiría un carácter primitivo (simplesiomórfico, meramente mantenido en géneros como *Aurantiochytrium*), mientras que la zoosporogénesis directa (no mediada por división vegetativa), aparecería como un carácter derivado, claro que sujeto a homoplasia, como la polifilia de *Thraustochytrium* parece indicar. La intercalación de un estadio ameboidal previo a la zoosporogénesis, como en el caso de *Ulkenia*, acaso pueda interpretarse cómo el mecanismo de proliferación más derivado (y consistente en el nivel de caracterización genérica) dentro del grupo, aunque tampoco libre de cierto grado de homoplasia (ver la posición de *Parietichytrium*).

En cuanto a los PUFAs, las cepas de un mismo grupo monofilético y que mostraron un perfil común de estos FAs, tuvieron en general similares requerimientos para la obtención de biomasa. Es de notar que el agrupamiento de los aislamientos patagónicos en base a su crecimiento en seis medios agarizados (tabla 2.5) fue consistente con las determinaciones analizadas en este capítulo: las cepas de los clados

T. kinnei y *Schizochytrium* sensu stricto correspondieron al grupo 3, las del clado *T. striatum* al grupo 2 y aquellas reasignadas a *Sicyoidochytrium* y *Aurantiochytrium* al grupo 1. Estos resultados demuestran la potencialidad de los atributos fisiológicos para la clasificación de las traustochytriales, tal como es de amplia utilización para el reconocimiento de otros microorganismos, como las levaduras (Barnett et al. 1990).

4.6- Conclusiones

La combinación de los caracteres moleculares, bioquímicos y morfológicos permitió distinguir clados en el nivel genérico formados por cepas de traustochytriales locales y otras previamente estudiadas. Esta información fue útil para precisar con mayor detalle la identidad de los aislamientos de Argentina. Los resultados obtenidos sugieren que algunas de las cepas locales podrían ser nuevas especies para la ciencia, entre ellas S1 (*Ulkenia* sensu stricto sp. o bien *Sicyoidochytrium* sp, sin determinar), S34r (*Schizochytrium* sp.), AA3 (*Oblongichytrium* sp.) y B5, MC46B, LGII y S33C (*Aurantiochytrium* sp.). Completar la diagnosis de las mismas requerirá de disponer de la secuencia del gen ARNr 18S para aquellas pendientes, de realizar nuevas determinaciones, como la composición de sus pigmentos carotenoides, y de evaluar más aislamientos con similares características.

La mayor parte de los aislamientos de *Ulkenia* sensu lato formaron un grupo monofilético con miembros conocidos de *Ulkenia* sensu stricto, dentro del que se reconocieron dos subclados. Si bien algunas de estas cepas también mostraron rasgos típicos de *Botryochytrium*, la validez de este género es cuestionada debido a inconsistencias detectadas entre los caracteres que lo definen en los materiales analizados y a que fue erigido a partir del estudio completo de un único aislamiento. Otros aislamientos de *Ulkenia* sensu lato pudieron ser reasignados a los nuevos géneros *Sicyoidochytrium* y *Parietichytrium* sin dificultades.

Respecto al género *Schizochytrium* sensu lato, los análisis bioquímicos y moleculares fueron de suma utilidad para reasignar sin inconsistencias las cepas locales estudiadas a los tres géneros propuestos por Yokoyama & Honda (2007). Se encontró que aquellas cepas con crecimiento muy limitado que pudieron ser caracterizadas correspondieron al género *Aurantiochytrium*. En lo concerniente al género

Thraustochytrium, estas herramientas permitieron reconocer grupos monofiléticos (*T. striatum* y *T. kinnei*), algunos de ellos con subgrupos, de acuerdo con su perfil de PUFAs.

Los resultados de este trabajo constituyen un considerable aporte al estudio de la taxonomía de las traustochytriales, área del conocimiento que está actualmente siendo revisada y modificada. La comparación de los diferentes caracteres empleados con fines clasificatorios indicó que algunos de los atributos morfológicos serían confiables (como las divisiones vegetativas o los tipos de colonia en medio sólido) mientras que otros no (la movilidad de las zoosporas al momento de ser liberadas o la regularidad en el clivaje del protoplasto ameboidal en *Ulkenia* sensu stricto). Los análisis de filogenia molecular fueron de suma utilidad como marco de referencia mientras que los perfiles de PUFAs permitieron reconocer la mayor parte de los grupos y subgrupos indicados por otros rasgos. Los resultados también sugieren la importancia de considerar los requerimientos para el cultivo y el aspecto de las colonias como caracteres accesorios de mucha utilidad.

Es de notar que, en líneas generales, los resultados de los estudios de filogenia molecular mostraron una tendencia evolutiva (dentro del marco de los labirintulomicetes) que va desde una dominancia de la división vegetativa sobre la zoosporogénesis, hacia una preponderancia de la formación de zoosporas como modo de proliferación e invasión del ambiente. Lamentablemente, esta tendencia parece ser homoplásica, por lo que la disección de las convergencias y paralelismos involucrados constituya acaso la pieza fundamental para una mejor aproximación a la historia evolutiva y la taxonomía de estos seres vivos.

CAPITULO V: ULTRAESTRUCTURA DE AISLAMIENTOS SELECCIONADOS

5.1- Resumen

Los caracteres ultraestructurales han sido ampliamente utilizados en diversos grupos de organismos para estudios de la morfología celular, sistemáticos, y de desarrollo. Considerando que su conocimiento en las traustoguitrias es muy limitado, se describen algunos detalles ultraestructurales de cepas locales representativas de los taxones más frecuentemente hallados como una herramienta más a la caracterización de su biodiversidad en la Argentina. Las observaciones realizadas permitieron identificar en los aislamientos las estructuras celulares típicas del grupo así como otros detalles particulares de los organismos en estudio. Se discuten las implicancias biológicas de la información aportada por las micrografías electrónicas a partir de su comparación con los reportes previos.

5.2- Introducción

Se presenta a continuación la información citológica actualmente disponible en comparación con otros organismos con características similares más conocidos, enfatizándose la potencial utilidad de este tipo de caracteres con fines sistemáticos y funcionales.

5.2.1- La ultraestructura como herramienta

Los caracteres derivados de los estudios ultraestructurales, disponibles a partir de los primeros años de la década del sesenta con el desarrollo de la microscopía electrónica, son básicamente morfológicos o anatómicos, y ofrecen en general una mayor resolución que los caracteres del mismo tipo obtenidos con el microscopio óptico. La microscopia electrónica de transmisión ha sido de fundamental importancia para proveer nueva información para la reevaluación de hipótesis evolutivas, especialmente las estructuras asociadas a los flagelos y la división nuclear así como la estructura interna de las mitocondrias o de la pared celular (Alexopoulos et al. 1996). Diversos grupos taxonómicos de algas y hongos se han delimitado en base a este tipo de

caracteres, sustentándose luego estos agrupamientos por los resultados de los estudios de filogenia molecular (Brodie & Lewis 2007, Lamour & Kamoun 2009).

Las quitridiales constituyen un interesante ejemplo de la aplicación de los estudios ultraestructurales como criterio para realizar cambios taxonómicos, tal como se comenta a continuación. A partir del cuestionamiento de la validez de los caracteres morfológicos utilizados para la clasificación de estos hongos zoosporicos, como la operculación, Barr (1980) planteó una reclasificación del orden, basándose fundamentalmente en las diferencias de la ultraestructura de las zoosporas. En este emblemático trabajo se describió la típica zoospora de los géneros de los dos órdenes propuestos, a partir de los cuales se erigieron las correspondientes familias. Estudios más recientes (Letcher et al. 2006) revelaron distintos subtipos de zoosporas dentro de *Rhizophydium*, uno de los géneros delineados por Barr. A partir de estas observaciones y de la disponibilidad de un gran número de aislamientos, Letcher y colaboradores (2008) realizaron un análisis integral de la morfología del talo, la ultraestructura de las zoosporas y la secuencia de tres genes ribosomales de organismos pertenecientes a la familia Rhizophydiales, y en base a la congruencia de estos caracteres pudieron delimitar siete nuevas familias dentro de este taxón.

Además de constituir una herramienta para solucionar dificultades taxonómicas, los estudios ultraestructurales permiten explicar una amplia variedad de procesos biológicos, al constituir las organelas celulares la base estructural para los procesos fundamentales de los organismos (Pavelka & Roth 2010). La descripción citológica a partir de la observación por microscopía electrónica ha sido la base para proponer muchas hipótesis evolutivas, entre ellas el origen endosimbiótico de las algas, así como para proveer explicaciones sobre procesos metabólicos, de desarrollo, de infección o reproductivos, entre otros (Goldstein et al. 1964, Lobban & Wynne 1981).

5.2.2- Ultraestructura de las traustokitriciales

La mayor parte de los estudios de la ultraestructura de traustokitriciales se han concentrado en las zoosporas, el sagénogeno, la red ectoplasmática y la pared como un primer intento por analizar su relación filogenética con otros grupos de organismos (Porter 1974, Olive 1975, Perkins 1976). Aunque este tipo de caracteres aún no han sido

aplicados para delimitar géneros o familias, actualmente son incluidos en las presentaciones de nuevas especies o cepas (Schärer et al. 2007, Harel et al. 2008), así como en las últimas revisiones taxonómicas (Yokoyama & Honda 2007). Aplicaciones recientes de estas metodologías incluyen el estudio de la formación de cuerpos lipídicos bajo diferentes concentraciones de glucosa en *Aurantiochytrium mangrovei* MP2 (Wong et al. 2008) y la observación de un representante de *Schizochytrium* sensu lato parásita, no cultivable, en las branquias del bivalvo *Ruditapes decussatus* (Azevedo & Corral 1997).

La organización de las células vegetativas al microscopio electrónico de transmisión se muestra en la figura 5.1 A. La pared, formada por varias capas de escamas, y las mitocondrias con crestas tubulares son dos de las estructuras típicas que se pueden reconocer en una primera inspección. Otro rasgo común es la continuidad de la doble membrana nuclear, interrumpida por poros, con las membranas del retículo endoplasmático y del aparato de Golgi. Las cisternas del retículo endoplasmático pueden estar muy desarrolladas y contener material denso, formando un “cuerpo paranuclear” (fig. 5.1 A). En el citoplasma también pueden visualizarse diferentes tipos de vacuolas y gránulos de lípidos, dependiendo su abundancia del material examinado.

El sagenógeno, estructura a partir de la cual se forma la red ectoplasmática, se presenta en la superficie celular como un cuerpo opaco al microscopio electrónico, frecuentemente con extensiones a modo de digitaciones y asociado al retículo endoplasmático liso (fig. 5.1 B). La red ectoplasmática está delimitada por una membrana que es una extensión de la membrana plasmática y no contiene organelas. Aparentemente el agregado granular del sagenógeno evitaría el movimiento de estructuras celulares a los elementos de la red. La organización básica del sagenógeno en las traustoquitriales es la misma que la de *Labyrinthula*, aunque puede resultar un poco más simple. En una célula típica de una traustoquitrial suele observarse un único sagenógeno o varios formando un grupo, mientras que en las labirintuales suele haber entre dos y cinco dispersos en diferentes puntos de la superficie celular (Perkins 1976).

Las escamas que forman las paredes de las traustoquitriales se han visualizado al microscopio electrónico como electrodensas, delgadas (20-50 Å), flexibles y con forma aproximadamente circular (0,5 – 1 µm de diámetro) (fig 5.1 C). En todas las especies

examinadas (*L. minuta*, *L. yorkensis*, *Thraustochytrium* sp, *S. aggregatum* y *A. crouchii*) estas estructuras se forman en las cisternas del aparato de Golgi para luego encontrarse en vesículas derivadas de dicha organela (Porter 1974). La intervención de estas vesículas en un proceso de exocitosis ha sido propuesta por varios autores (Darley et al. 1973, Raghukumar 1982) a partir de la observación de micrografías electrónicas de las cuales puede inferirse su fusión con la membrana plasmática y el depósito de las escamas en la superficie celular. La formación de la pared celular aquí descrita es marcadamente diferente a la de los hongos filamentosos, a pesar de que en ambos casos tiene lugar como resultado de la actividad de Golgi (Darley et al. 1973). En las traustochytriales el producto de Golgi es una escama preformada y no una sustancia amorfa que se polimeriza fuera de la célula como en el caso de los hongos (Alexopoulos et al. 1996). Este proceso es muy similar a la formación de las paredes de varios grupos de algas, también compuestas por escamas orgánicas, como es el caso de miembros de la clase Chrysophyceae (Heterokonta) o la división Prymnesiophyta (Lee 1999).

Probablemente debido a la significancia adjudicada a la zoospora en la filogenia de las algas y los hongos, esta estructura reproductiva ha sido extensivamente estudiada en los considerados tradicionalmente como hongos marinos y estuarios (Fuller 1966). En lo que respecta a las traustochytriales, los principales rasgos de las zoosporas de *Thraustochytrium* sp. (Gaertner 1964, Kazama 1972 a y b, 1973), *S. aggregatum* (Perkins 1974) y *A. crouchii* (Jones & Alderman 1971) han sido registrados a nivel ultraestructural (fig. 5.2) y evaluados en forma comparativa (Perkins 1976). En todas ellas se ha documentado el típico flagelo heterocontó y una delgada pared formada por finas escamas que solo se discontinúan en la zona de inserción de los flagelos. La presencia de varios tipos de estructuras electrónicamente densas en el lumen del kinetosoma, compartida con *L. algeriensis*, pareciera ser otro de los caracteres distintivos de este grupo de microorganismos. En el citoplasma de las zoosporas de *Thraustochytrium* sp se han encontrado cuerpos de inclusiones estriadas, que consisten en arreglos paralelos de filamentos y frecuentemente están asociados al sagenógeno. A partir de la observación de vacuolas conteniendo mitocondrias en degradación en esta misma especie, Kazama (1973) presentó evidencia de un posible proceso de autofagocitosis que involucraría en principio la intervención de vesículas con actividad de fosfatasa ácida (citolisosomas), que eventualmente se fusionarían para formar

estructuras de mayor tamaño. Estos grandes citolisosmas también podrían desarrollarse a partir de cuerpos multivesiculares originados en el aparato de Golgi.

La división celular y la morfología del desarrollo han sido estudiadas casi exclusivamente en especies de *Labyrinthula*. El único indicio de estadios sexuales en los labirintulomicetes se ha registrado para *L. vitellina*, a partir de la observación de un complejo sinaptonemal en un núcleo en profase (Perkins & Amon 1969). La formación de zoosporas en las traustoquitriales sería entonces un proceso mitótico. Los estudios de la citocinesis de una especie de *Thraustochytrium* durante la zoosporogénesis indican que involucraría un mecanismo de estrangulamiento, similar al de los animales y otros protistas, en el que los microtúbulos cumplirían una función de movimiento más que estructural (Kazama 1975). Dado que la división nuclear no suele ser sincrónica con el clivaje celular es frecuente encontrar estadios multinucleares (Porter 1990).

5.2.3- Objetivos

Si bien los estudios ultraestructurales no se emplean actualmente para diferenciar taxones de traustoquitriales, pueden resultar de gran valor para obtener información acerca de la biología general de estos organismos y para proveer un mayor detalle de algunos de los caracteres de importancia taxonómica, como el proceso de zoosporulación. La obtención de cultivos de cepas representativas de la biodiversidad de traustoquitriales de la Argentina se plantea como un punto de partida para estudiar este tipo de caracteres y evaluar su variabilidad.

Los objetivos de este capítulo son:

- Describir detalles ultraestructurales de aislamientos que representen los taxones más frecuentemente hallados en los humedales locales como un aporte más a la caracterización de la biodiversidad de traustoquitriales en la Argentina.
- Inferir aspectos generales acerca de la biología (v.g. formación de estructuras reproductivas) de los organismos examinados a partir de la observación de sus estructuras celulares.

5.3- Materiales y Métodos

5.3.1- Cepas estudiadas

Las cepas seleccionadas para la observación de las estructuras internas celulares correspondieron a ejemplares de *U. aff. visurgensis* (S3), *Schizochytrium sensu stricto* sp. (S48cmc), *T. aff. striatum* (S33A), *T. aff. kinnei* (S26B) y *T. aff. aureum* (S48T). Estos aislamientos se seleccionaron por representar los taxones más frecuentemente hallados en los humedales argentinos, abarcando los tres géneros reportados para estos ambientes. A su vez, en el caso del género *Thraustochytrium* se estudiaron una especie holocárpica y dos eucárpicas. El material sobre el que se observó la zoosporogénesis mediante microscopía electrónica de barrido, previa al aislamiento de S3, corresponde a la cepa de *U. aff. visurgensis* SB1D.

5.3.2- Microscopía electrónica de transmisión

Para la obtención de biomasa, se realizaron cultivos en frascos agitados de 100 ml conteniendo 20 ml de medio de cultivo en las condiciones indicadas en la tabla 2.7 para cada aislamiento en particular. Las células cosechadas fueron fijadas en glutaraldehído 3% m/v en buffer fosfato salino 0,1 M (175 ml de KH_2PO_4 0,1 M y 25 ml de Na_2HPO_4) a 4°C durante 24 h. El precipitado obtenido luego de centrifugar a 2000 rpm durante 15 min fue lavado dos veces en el mismo buffer y fijado nuevamente con OsO_4 2% m/v durante 1 h. Se deshidrató en un gradiente de series de etanol y finalmente en acetona. El material fue pre-incluido en una dilución 1:1 de resina Spurr (Spurr 1969): acetona y seguidamente incluido en resina Spurr pura, incubando a 72°C por 48 h. Los cortes ultrafinos (800-900 Å) se realizaron con un ultramicrotomo Sorvall modelo Porter Blum MT2-B, se montaron en grillas de cobre y se tiñeron por 15 min en acetato de uranilo 2% y luego 5 min en solución de Reynolds (0,266 g de nitrato de plomo y 0,352 g de citrato de sodio disueltos en 1,6 ml de NaOH 1N y llevado a 10 ml con agua desionizada) (Reynolds 1963). Los preparados ultrafinos fueron examinados en un microscopio electrónico de transmisión Philips modelo EM-301 utilizando una aceleración de 60 KV.

5.3.3- Microscopía electrónica de barrido

Se prepararon cultivos en agua de mar y granos de polen, los cuales fueron incubados durante dos días, verificado que hubiera activa zoosporulación. El material se recolectó en un cubreobjetos impregnado con resina formvar (polivinil formaldehído) 1% m/v en 1,2-dicloroetano. Una vez que el agua se evaporó completamente, se fijó agregando una gota de glutaraldehído 2,5% m/v en buffer colidina 0,1 M (Bennett & Luft 1959) con $1,75 \text{ g l}^{-1}$ de sal de mar durante 1 h, se lavó dos veces en el mismo buffer y se fijó nuevamente con buffer con tetróxido de osmio (OsO_4) 1% m/v durante 1 h más. Luego de deshidratar en un gradiente de series de etanol, la muestra en etanol 100% fue secada en punto crítico en un equipo Denton modelo DCP-1, montada en soporte *ad-hoc* y finalmente sometida a fase de metalizado con partículas de 30 nm de oro y paladio en un sistema Anatech modelo Technics Hummer 6.6. Las observaciones se realizaron en un microscopio electrónico de barrido Hitachi modelo S-2500 utilizando un aceleración de 10 KV.

5.4- Resultados

5.4.1- Microscopía electrónica de transmisión

La organización interna de las células examinadas se presenta en las figuras 5.3 a 5.5. En todas ellas fue posible observar la típica pared formada por escamas derivadas del aparato de Golgi, mitocondrias con crestas tubulares, uno o varios núcleos prominentes y una proporción variable de vacuolas respecto a otras organelas. Las particularidades de cada uno de estos materiales se comentan a continuación.

El material de *U. aff. visurgensis*, desarrollo estadios multinucleares de gran tamaño (30 μm aproximadamente) en los que se diferenciaron numerosas mitocondrias y una gran cantidad de vacuolas que pudieron clasificarse en dos tipos: aquellas que contuvieron material similar a las escamas de la pared, ubicadas en la periferia, y otras en la zona central, en general translucidas o con poco material electrodens (fig. 5.3 A). Mediante una observación más detallada pudieron registrarse las membranas simples de estas vacuolas y las membranas dobles de las mitocondrias y del núcleo, estas últimas interrumpidas por poros (fig. 5.3 B). Dentro del núcleo fue posible diferenciar

cromatina condensada y el nucleolo. También se documentaron las escamas, circulares en vista superior en el interior de las vacuolas, y lineales y delgadas formando varias capas en la pared.

Por su parte, cada una de las células de la tetrad documentada para la cepa de *Schizochytrium* sp. estuvo rodeada por una pared individual y por otra común al grupo (fig. 5.3 C). Las células presentaron un único núcleo prominente, numerosas mitocondrias y unas pocas vacuolas con escamas y/o material electrodens en la proximidad del núcleo. Dentro de uno de los miembros del grupo fue posible diferenciar una zona de división del protoplasma en contacto con la membrana de una de estas vacuolas. Otras estructuras características fueron el extenso retículo endoplasmático y el desarrollado aparato de Golgi, ambos asociados a la membrana nuclear (fig. 5.3 D). Finalmente, en el interior de una de las mitocondrias se encontró un sistema de membranas dobles concéntricas (fig. 5.3 D).

Respecto al material examinado correspondiente a *T. aff kinnei*, se visualizaron numerosas vacuolas conteniendo escamas (y menos frecuentemente material electrodens) tanto en las células vegetativas (fig. 5.4 A), como en el fundamento basal y la zona esporógena de los esporangios observándose la fusión de sus membranas con la membrana plasmática en el área de contacto entre estos dos últimos sectores (fig. 5.4 B y D). En ambas porciones del esporangio se registraron mitocondrias, gúttulas lipídicas, retículo endoplasmático con ribosomas (REG) y aparato de Golgi, ambos asociados a el/los núcleo/s (uno en el fundamento basal y varios en la zona esporógena). En el interior de una de las mitocondrias se encontró el mismo sistema de membranas dobles concéntricas que se mencionara para *S. sp.* También se observó un esporangio en división, dentro del cual pudieron reconocerse los axonemas de los flagelos en corte transversal con el típico arreglo de microtúbulos de $9 + 2$ (fig. 5.4 C). En el fundamento basal de uno de los esporangios se visualizaron partículas poligonales compatibles con una infección viral (fig. 5.4 D). El diámetro de las mismas fue de 130 ± 30 nm, y sus 5 o 6 lados indicarían una simetría icosaédrica. Estas partículas constaron de un centro y una cubierta electrodensos separados por una zona intermedia de menor densidad, y estaban asociadas a material fibrilar.

Las células vegetativas de la cepa de *T. aff. striatum* fueron en general multinucleadas, presentando gruesas paredes y una gran cantidad de vacuolas conteniendo escamas (fig. 5.5 A). Dentro de los esporangios, de hasta 40 μm de diámetro, fue posible distinguir una desarrollada vacuola central y numerosas esporas periféricas a su alrededor (fig. 5.5 B). Estas esporas, con un único núcleo y nucléolo prominente presentaban una bien desarrollada pared celular, no registrándose en ellas componentes flagelares. En el protoplasma de una de estas células se detectó el sagenógeno (fig. 5.5 C).

Finalmente, se examinaron las estructuras reproductivas de un aislamiento de *T. aff. aureum*. En la zoospora de este organismo se observaron el cuerpo paranuclear asociado al núcleo, mitocondrias, un gránulo lipídico cercano al retículo endoplasmático, numerosos ribosomas dispersos y el axonema del flagelo anterior en corte transversal rodeado de mastigonemas (fig. 5.5 D). También se registró un esporangio diferenciando sectores por estrangulamiento (fig. 5.5 E). Cada una de estas porciones presentó un único núcleo, las organelas reconocidas en la zoospora, y dos o más axonemas en corte transversal en la zona de contacto con la pared del esporangio (fig. 5.5 F).

5.4.2- Microscopía electrónica de barrido

Los estadios de la zoosporogénesis de una cepa de *U. aff. visurgensis* fueron registrados mediante microscopía electrónica de barrido (fig. 5.6). En estos materiales pudo observarse que los esporangios se encontraban originalmente adheridos al sustrato (granos de polen) mediante la red ectoplasmática (fig. 5.6 A). La disolución de la pared celular comenzó en una zona definida en forma simultánea con las primeras deformaciones del protoplasma (fig. 5.6 B y C). Los estadios con prolongaciones lobuladas más conspicuas aún conservaron fragmentos de pared adheridos (fig. 5.6 D). Se diferenciaron porciones regulares, que terminaron de separarse por estrangulamiento para producir los cuerpos de las zoosporas (fig. 5.6 E y F), que contuvieron uno o dos gránulos internos y permanecieron agrupados (fig. 5.6 G). Los flagelos pudieron observarse completamente desarrollados en las zoosporas ya maduras, identificándose el anterior por la presencia de mastigonemas (fig. 5.6 H).

5.5- Discusión

5.5.1- Estructuras típicas de las traustoquitriales

Las observaciones realizadas al microscopio electrónico permitieron documentar los rasgos distintivos de las traustoquitriales, como la pared formada por escamas, las mitocondrias con crestas tubulares, el sagenógeno, el cuerpo paranuclear, los dos flagelos, los mastigonemas del flagelo anterior y la red ectoplasmática (Perkins 1976). Estos registros refuerzan la identidad de los aislamientos locales.

Los núcleos de las células analizadas, bordeados por una doble membrana interrumpida por poros y continua con las cisternas del retículo endoplasmático y el aparato de Golgi, presentaron las características descritas previamente para otras traustoquitriales (Karling 1981). Prácticamente en todos los casos fue posible distinguir el nucleolo. En cuanto al protoplasma, no se registraron porciones primariamente ribosómicas como en otras especies estudiadas (Goldstein 1964); los ribosomas sólo pudieron distinguirse claramente asociados al retículo endoplasmático (REG) o dispersos en el interior de las células y zoosporas. Los lípidos, especialmente abundantes en la cepa de *Schizochytrium* sp., formaron gútulas electrodensas, asociadas en general al retículo endoplasmático liso. Las diferencias en la intensidad de la señal electrodensa estarían relacionadas con la proporción de ácidos grasos saturados respecto de los insaturados, ya que el tetroxido de osmio se une preferentemente a los dobles enlaces (Bozzola & Russel 1999). De hecho, dentro de las cinco cepas examinadas, los materiales de *Schizochytrium* sp. fueron los que tuvieron mayor cantidad de PUFA's respecto a la biomasa (4,61%, respecto a 2,10% en S3, 1,76% en S26B, 1,13% en S33A y 1,22% en S48T, según tabla 4.4). La presencia de una gútula lipídica en las zoosporas de las traustoquitriales parece ser una característica común, tal como se encontró para los aislamientos estudiados (figs. 5.5 D y 5.6 F-G), y como se menciona en muchas de las descripciones originales de estos organismos (Karling 1981).

Respecto a las organelas, tanto el retículo endoplasmático liso como el aparato de Golgi estuvieron muy desarrollados en los materiales examinados. Esto podría estar asociado con la producción de lípidos en el primer caso y de escamas de pared en el segundo, procesos que pueden inferirse como muy activos a partir de la difundida

presencia de sus productos en las células observadas. Finalmente cabe mencionar que el hallazgo en dos de las cepas estudiadas (S48cmc y S26B) de un sistema de membranas dobles concéntricas en el interior de algunas mitocondrias (figs. 5.3 D y 5.4 B) es coincidente con los reportes previos de Goldstein (1964), quien asocia estas estructuras con las observadas en los kinetosomas de los tripanosomas y en mutantes de *Saccharomyces cerevisiae* con deficiencias respiratorias.

5.5.2- Estructuras particulares de las cepas examinadas

La presencia de vacuolas de distintos tipos, algunas de ellas completamente translúcidas, otras con material electrodenso y otras con escamas de pared resultó común en las células vegetativas y en los esporangios de las cepas analizadas. Su abundancia fue variable en los distintos aislamientos, aunque las más frecuentemente encontradas (en los representantes locales de *U. aff. visurgensis*, *T. aff. kinnei* y *T. aff. striatum*, y en menor medida para el espécimen de *S. sp.*) correspondieron a aquellas con estructuras que se identificaron como escamas a partir de su morfología (circulares en vista superior y lineales en vista lateral) (fig. 5.3 D) en comparación con los registros previos (Darley et al. 1973, fig. 5.1 C). La ubicación de estas vacuolas, en general periféricas, y la fusión de sus membranas con la membrana plasmática, documentada para todas las cepas (figs. 5.3 B y D, 5.4 B y D, 5.5 A), darían un fuerte indicio de su participación en el proceso de exocitosis de escamas de pared sintetizadas en el aparato de Golgi propuesto por Raghukumar (1982). Según puede interpretarse a partir de las observaciones, este mecanismo podría además ser empleado durante la separación del protoplasma para formar diadas en la cepa de *Schizochytrium* (fig. 5.3 C) como así también en la separación del fundamento basal y la zona esporógena en el esporangio de *T. aff. kinnei* estudiado (fig. 5.4 A-B y D).

Si bien las vacuolas son componentes celulares comunes de las traustochytriales, según puede observarse en las micrografías disponibles en la literatura (Goldstein 1964, Perkins 1973, Azevedo & Corral 1997, Wong et al. 2008), muchas veces se omite su mención, y su función, más allá del transporte de material de pared, no ha sido analizada. Estructuras similares a las vacuolas con material denso de las cepas locales han sido identificadas por Yokoyama & Honda (2007) en varios representantes de *Schizochytrium*, *Oblongiochytrium* y *Aurantiochytrium*. Los autores las denominaron

como “cuerpos con material electrodensos” y señalan que se ubican en la zona cercana al núcleo, al igual que en las células observadas en este trabajo (v.g. fig. 5.3 A y C). Este tipo de vacuolas resultaron más frecuentes en los materiales de *U. aff. visurgensis*, pero también se observaron en *T. aff. kinnei* y *S. sp.* y en menor medida en *T. aff. striatum*. En el caso particular de *U. aff. visurgensis* algunas de estas vacuolas fueron totalmente translúcidas (fig. 5.3 A), y su ubicación en la zona central, observada en la mayor parte de los esporangios examinados, podría estar implicada en el desplazamiento de los núcleos a la periferia previo al proceso de zoosporogénesis. El hallazgo de una gran vacuola central, probablemente originada por coalescencia de numerosas pequeñas vacuolas, en los esporangios de *T. aff. striatum* reforzaría la intervención de estas estructuras en el proceso de zoosporogénesis, tal como ocurre en los hongos (Alexopoulos et al. 1996).

El hallazgo de partículas de tipo viral ha sido informado previamente para las traustoguitiales. Kazama & Schornstein (1972, 1973) encontraron virus similares a herpes, con forma redondeada, un diámetro promedio de 110 nm, y un centro y cápside electrodensos envueltos en material fibrilar en una especie de *Thraustochytrium*. Más recientemente Takao y colaboradores aislaron y caracterizaron dos novedosos virus: uno de ARN simple cadena a partir de una especie de *Schizochytrium* (Takao et al. 2005), y otro, de ADN doble cadena infectando una cepa de *Sicyodochytrium minuta* (Takao et al. 2007). En el primer caso, las partículas también fueron icosaédricas pero de menor diámetro (25 nm), y no fue posible diferenciar zonas en su interior. Ellas formaban arreglos cristalinos dentro de las células, y si bien se hallaron asociadas a material fibrilar, no estaban completamente envueltas él. En el segundo, se presentaron como un cuerpo electrodensos de forma elíptica (con 146 y 112 nm de largo y ancho respectivamente), diferente a otros virus previamente reportados. Si bien la morfología de las partículas virales encontradas en los materiales de *T. aff. kinnei* en este trabajo es más similar a la descrita por Kazama & Schornstein (1972, 1973), no se encontró en ellas la envoltura de material fibrilar mencionada por los autores. Las estructuras aquí presentadas fueron prácticamente idénticas a las halladas en los esporangios del alga parda *Feldmannia* (Henry & Meints 1992), organismo perteneciente a la misma división que las traustoguitiales. En este caso, las partículas virales, también icosaédricas con 130 a 150 nm de diámetro y genoma de ADN doble cadena, probablemente pertenezcan

a la familia Phycodnaviridae, al igual que la mayoría de los virus que infectan las microalgas marinas (Brussaard 2004).

5.5.3- Aporte de la ultraestructura al estudio de la biología de las traustochytriales

La comparación de los rasgos ultraestructurales de las cepas estudiadas abre la posibilidad de esbozar algunas generalidades acerca de la reproducción de este grupo de microorganismos. En lo que respecta a la división celular, la predominancia de estadios multinucleares en las cepas de *Thraustochytrium* y *Ulkenia* analizadas, ilustra que el clivaje celular sería posterior a la división nuclear, como en la mayoría de las traustochytriales. Por el contrario, estos dos eventos parecieran ser sincrónicos en el aislamiento de *Schizochytrium*.

Respecto a la zoosporogénesis, observada en *T. aff. kinnei* y *T. aff. aureum* mediante microscopía electrónica de transmisión y en *U. aff. visurgensis* a través del microscopio electrónico de barrido, se encontró que el clivaje del protoplasto ocurrió por estrangulamiento, tal como propusiera Kazama (1975). Las micrografías electrónicas mostraron que la formación de los flagelos sería simultánea (o anterior) a la diferenciación de los cuerpos de las zoosporas. El hallazgo de cuerpos de zoosporas sin flagelos exteriores en el material de *U. aff. visurgensis* o de zoosporas inmóviles en *T. aff. aureum* no contradice tal presunción, dado que estas estructuras podrían encontrarse ya desarrolladas en el interior.

Adicionalmente, los detalles ultraestructurales observados permiten proveer un mayor detalle de algunos de los aspectos del ciclo de vida de las cepas locales, previamente analizados al microscopio óptico. Por ejemplo, las micrografías electrónicas de barrido de *U. aff. visurgensis* (fig 5.6 B y C) señalan que la pared empezaría a desprenderse en un punto determinado y ocurriría simultáneamente (pero no previamente) a la deformación del protoplasto ameboidal. Esta metodología permitió además visualizar gránulos internos en las zoosporas, rasgo mencionado en la descripción original, pero que no había podido ser percibido mediante inspección al microscopio óptico. Respecto al espécimen de *S. sp.* examinado, el mantenimiento de los grupos de células originados por mitosis se puede explicar por la presencia de una pared común.

Por su parte, en los esporangios de las especies eucarpicas de *Thraustochytrium* estudiadas, el fundamento basal y la zona esporógena estuvieron claramente delimitados por una pared en *T. aff. kinnei* pero no pudieron diferenciarse en *T. aff. aureum*, coincidentemente con las observaciones previas realizadas al microscopio óptico (ver figs. 5.4 D y 5.5 E). Estos resultados podrían estar indicando la existencia de diferentes mecanismos de formación de los fundamentos basales. En la última cepa mencionada se visualizaron elementos flagelares durante el proceso de zoosporgénesis, lo que señalaría que estas estructuras ya están desarrolladas al momento de la liberación de las zoosporas, a pesar de que las mismas experimenten una fase inmóvil. Finalmente la vacuola propuesta en *T. aff. striatum* para explicar la ubicación periférica de las zoosporas dentro del esporangio antes de su liberación pudo ser registrada en la micrografía electrónica de transmisión (fig. 5.5 B).

En síntesis, el análisis ultraestructural de materiales locales representativos de diferentes taxones permitió proveer un mayor detalle de los caracteres morfológicos relacionados a su ciclo de vida. El fuerte valor taxonómico de estos rasgos plantea la potencialidad del empleo de la ultraestructura para el estudio sistemático de las traustoquitriales. Sin embargo, aún falta un largo camino por recorrer ya que la aplicación de caracteres ultraestructurales con fines taxonómicos requiere, por un lado disponer de un gran número de organismos que representen la biodiversidad existente (Letcher et al. 2008) y por otro lado la posibilidad de poder cultivarlos para obtener la biomasa necesaria para la aplicación de esta técnica (Barr 1980).

5.6- Conclusiones

La observación de cepas representativas de los taxones más frecuentemente hallados en los humedales argentinos mediante microscopía electrónica confirmó su pertenencia a las traustoquitriales. Entre las particularidades encontradas en los especímenes examinados puede mencionarse la ubicua presencia de vacuolas conteniendo distinto tipo de material, que participarían en los procesos de zoosporogénesis y de formación de pared. Se hallaron además partículas virales (probablemente de la familia Phycodnaviridae) en el fundamento basal de *T. aff. kinnei*. Estas técnicas permitieron obtener un mayor detalle sobre la formación de estructuras

reproductivas y otros aspectos citológicos del ciclo de vida respecto a las observaciones realizadas al microscopio óptico. El mantenimiento a nivel ultraestructural de los rasgos observados al microscopio óptico refuerza la utilización de esta última metodología, más simple, en el reconocimiento de nuevos aislamientos. Considerando la importancia de las estructuras reproductivas en la identificación de géneros y especies, el empleo de estudios ultraestructurales no sólo resulta prometedor por las contribuciones que pueda hacer al conocimiento general de la biología de estos microorganismos, sino también por su potencialidad para delinear más precisamente caracteres ultraestructurales con valor taxonómico.

CAPITULO VI: DISEÑO DE UN BIOPROCESO PARA LA OPTIMIZACION DE LA PRODUCCIÓN POR FERMENTACIÓN DE ÁCIDO DOCOSAHEXAENOICO UTILIZADO LA CEPA *AURANTIOCHYTRIUM LIMACINUM* SR21.

6.1- Resumen

Se eligió a la cepa modelo *Aurantiochytrium limacinum* SR21 para estudiar la producción de ácidos grasos omega 3, particularmente ácido docosahexaenoico (DHA), ya que las concentraciones de biomasa alcanzadas por los aislamientos locales no fueron compatibles con su aplicación biotecnológica. Se diseñó un bioproceso en dos etapas para optimizar la producción de DHA, en base a los diferentes requerimientos de dicha cepa para el crecimiento y para la acumulación de lípidos. Para identificar las variables de cultivo significativas sobre la producción de biomasa (primera etapa) se aplicaron Diseños Estadísticos Experimentales de selección, y los niveles óptimos se encontraron combinando las metodologías de Redes Neuronales Artificiales, Algoritmos Genéticos y Análisis Gráficos. El valor de biomasa obtenido (40,3 g de peso celular seco l⁻¹) empleando las condiciones optimizadas coincidió con el predicho por el modelo. En los siguientes ensayos se determinaron los niveles de dos condiciones de cultivo significativas para la producción de DHA (segunda etapa). El bioproceso completo se llevó a cabo primero en frascos agitados y luego se escaló en un biorreactor de 3,5 l de volumen de trabajo agitado mecánicamente.

6.2- Introducción

La importancia biotecnológica de las traustoguitriales como fuente alternativa para la producción de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (PUFAs) omega 3 (n-3), particularmente ácido docosahexaenoico (DHA, 22:6n-3), ha sido brevemente introducida en el capítulo I. En el mismo, también se enfatiza acerca de la necesidad de optimizar el proceso productivo como una posible estrategia para disminuir los costos de producción y que de este modo, el aceite celular microbiano (SCO) resulte competitivo comercialmente en precio de venta con el aceite de pescado. A continuación se proveen más fundamentos sobre estos aspectos y se presentan los métodos estadísticos empleados para la optimización de los bioprocursos.

6.2.1- Mercado de los PUFAs

Los efectos benéficos de los PUFAs en la salud humana y animal se relacionan con sus funciones a nivel celular. Por un lado, tienen un importante rol en la arquitectura, dinámica, transición de fase y permeabilidad de las membranas, modulando el comportamiento de proteínas asociadas a las mismas como receptores, ATPasas, proteínas transportadoras y canales iónicos. Adicionalmente, los PUFAs controlan la expresión de ciertos genes y en consecuencia afectan la biosíntesis de ácidos grasos (FA) y el transporte del colesterol en el cuerpo. Finalmente son precursores de una amplia variedad de metabolitos (como prostaglandinas y leucotrienos) por lo que regulan funciones biológicas críticas (Certik & Shimizu 1999).

Las sugerencias sobre el uso de los PUFAs por sus beneficios nutricionales y sobre la salud datan de 1975, cuando dos de la principales consultoras internacionales, FAO (“Food and Agriculture Organization”) y WHO (“World Health Organization”), indicaron que las fórmulas infantiles debían simular la leche materna, la cual es particularmente rica en ARA y DHA. A partir de 1990, numerosas organizaciones han recomendado específicamente la inclusión de estos dos PUFAs en este tipo de productos, cuyo mercado se ha estimado en alrededor de 10 billones de dólares anuales. Una gran variedad de compañías comercializan actualmente fórmulas infantiles adicionadas con SCO, en más de 60 países. Otros mercados con más potencial aún incluyen el de los alimentos saludables para adultos, como quesos, yogures, huevos, cereales y bebidas, los alimentos para mujeres embarazadas y los productos para mejorar la salud cardiovascular. Cabe mencionar que la mayor parte de ellos han sido reconocidos como “seguros” o “GRAS” (“Generally Regarded as Safe”) por la organización FDA (“Food and Drug Administration”) en Estados Unidos, por lo que tienen amplia aceptación (Simopoulos et al. 1999). Debido al gran potencial comercial del SCO muchas compañías han mostrado interés en investigar, desarrollar y manufacturar productos ricos en PUFAs. Entre ellas pueden mencionarse a Aventis S.A., BASF A.G., Friesland Brands A.G, Gist-brocades, Hoffmann-LaRoche A.G., Laboratorios Ordesa, Martek Inc, Nestle S.A., Novartis, Nutricia, Nutrinova Celanese A.G., Ross products y Walmart (Ward & Singh 2005).

Los productos ricos en PUFAs tienen además importantes aplicaciones en acuicultura ya que las larvas de algunos peces y crustáceos requieren estos compuestos, principalmente DHA, para su correcto desarrollo (Lewis et al. 2000). Los cultivos de *Schizochytrium* han sido utilizados para enriquecer las concentraciones de DHA de rotíferos y larvas de *Artemia* antes de emplearse como alimentos de larvas de peces y camarones por más de una década (Barclay & Zeller 1996). Por su parte, varias compañías como Aquafauna Bio-Marine Inc. y Sanders Brine Shrimp Company han elaborado alimentos enriquecidos con SCO que incrementaron la tasa de supervivencia y redujeron el pseudoalbinismo en juveniles de rodaballos, y actualmente se están llevando a cabo nuevos avances en esta área de investigación (Song et al. 2007).

6.2.2- Fuentes tradicionales de obtención de PUFAs

En la actualidad la principal fuente de PUFAs es el aceite de pescado. Los peces incorporan estas sustancias como parte de su dieta y pueden concentrar EPA y DHA en el tejido adiposo, la grasa muscular, las vísceras y las gónadas en forma de triacilglicerol. La composición y cantidad de PUFAs n-3 en los aceites de pescado dependerá de la especie, de la época del año y lugar geográfico donde se capture (Miller et al. 2007). La mayor parte de la producción de aceite de pescado es utilizada para la alimentación de peces criados en cautiverio (Touminen & Esmark 2003). El desarrollo acelerado de la industria acuícola ha incrementado la demanda de PUFAs n-3, además de las nuevas aplicaciones de estos productos en alimentos y nutraceuticos. Por tal motivo, se espera que en los próximos años su producción a partir de las fuentes actuales no sea suficiente para satisfacer las demandas del mercado.

La inclusión de PUFAs provenientes del aceite de pescado en alimentos, fórmulas infantiles y aplicaciones farmacéuticas tiene algunas desventajas, por ejemplo, la presencia de contaminantes ambientales o los problemas asociados con el típico gusto y olor a pescado que pueden resultar desagradables (Sijtsma & de Swaarf 2004). Particularmente, el consumo de pescado marino es la única forma de exposición de los humanos al metil-mercurio, la forma más peligrosa de este metal pesado, que puede causar afecciones en el sistema inmunológico, en el sistema nervioso, producir crecimiento anormal de los embriones y alterar los sistemas enzimáticos a nivel genético (Gómez Gómez et al. 2004). Otro de los inconvenientes de esta fuente de

PUFAs n-3 es su inestabilidad ante la oxidación. Cabe mencionar que la susceptibilidad y velocidad de oxidación se relaciona proporcionalmente al grado de insaturación y se deben aplicar tratamientos especiales para reducirla a niveles aceptables (Aidos 2002). Por otro lado el aceite de pescado contiene una mezcla de FA cuya purificación requiere de muchas etapas. En algunos casos se utiliza cromatografía líquida (HPLC), lo que sube el costo de producción (Wen & Chen 2005). El mejoramiento de las técnicas de separación y el uso de condiciones de operación más suaves de procesamiento jugarán un rol importante en la industria de alimentos y fármacos. Esto hace necesario considerar nuevas tecnologías y fuentes alternativas para la obtención de PUFAs (Lewis et al. 1999), entre ellas los microorganismos. Otra fuente propuesta recientemente son las plantas, aunque su principal limitación es que sólo pueden sintetizar ácidos grasos de hasta 18C. Debido a ello algunas compañías internacionales (Monsanto y Dupont por ejemplo) están trabajando intensamente en la aplicación de técnicas de ingeniería genética para desarrollar cultivos transgénicos productores de PUFAs (Nichols et al. 2010).

6.2.3- Aceites microbianos (SCO)

Los SCO (“Single Cell Oils”) son definidos como aceites comestibles obtenidos de microorganismos que pueden ser similares en tipo y composición a los provenientes de plantas y animales (Ratledge & Wynn 2001). Los SCO son ampliamente aceptados en el mercado y su producción se está expandiendo y diversificando cada día. En este tipo de tecnología, los microorganismos capaces de producir el aceite deseado son cultivados en un biorreactor. Este proceso implica mayores costos que su obtención a partir de fuentes animales o vegetales y por lo tanto se utiliza actualmente para la elaboración de productos de alto valor agregado. Sin embargo, ofrece interesantes ventajas respecto a las fuentes tradicionales, entre ellas, un mayor contenido de PUFAs n-3 con predominancia de un tipo específico (y no una mezcla), mayor estabilidad ante la oxidación, la posibilidad de ser producidos a partir de fuentes sustentables y en condiciones controladas y menores costos de purificación. Los parámetros más importantes en la selección de la cepa adecuada para la producción del PUFA deseado son la velocidad específica de crecimiento, la producción de biomasa bajo las condiciones óptimas de cultivo, el contenido total de lípidos y la proporción del PUFA respecto a los lípidos, así como la ubicación celular del PUFA (resulta fundamental que

sea parte de los triacilgliceroles del citosol y no de los fosfolípidos de membranas) (Sijtsma & de Swaarf 2004). Se mencionan brevemente a continuación las ventajas y limitaciones de los microorganismos oleaginosos capaces de producir SCO, que incluyen a bacterias, hongos y microalgas.

Las bacterias de mayor producción de PUFAs, particularmente EPA y DHA, pertenecen a los géneros *Shewanella*, *Colwellia* y *Moritella* de la división Proteobacteria. Estas especies marinas se encuentran asociadas a ambientes extremos donde prevalecen altas presiones y bajas temperaturas. Se piensa que la síntesis de estos FA es una respuesta sobre la fluidez de la membrana para contrarrestar las variables adversas (Nichols et al. 1993). Debido a que no acumulan altas concentraciones de triacilgliceroles, que contienen otros lípidos inusuales y que requieren condiciones de cultivo dificultosas, no son consideradas como sistemas adecuados con fines productivos (Ratledge & Wynn 2001).

Diversos hongos se han estudiado para la obtención de PUFAs. Se destacan entre éstos aquellos pertenecientes al orden Mucorales, particularmente representantes del género *Mortierella*. Entre éstos pueden mencionarse a *M. ramannianna*, *M. isabellina* y *Mucor circinelloides*, que pueden acumular concentraciones de ácido γ -linolénico (GLA) del 15-25% de los FA totales (Certik & Shimizu 1999). Por su parte, *M. alpina* y *M. elongata* se caracterizan por ser productores de EPA (Bajpai & Bajpai 1993). En la actualidad algunas cepas de *M. alpina* se utilizan industrialmente como fuente de ARA (Singh & Ward 1997b). La cepa *M. alpina* 1S-4 además de producir ARA, ha servido de modelo para estudios del metabolismo de los lípidos. Este organismo es altamente oleaginoso, su biosíntesis de lípidos es simple y regulada y también puede incorporar FA exógenos y transformarlos (Sakuradani et al. 2005).

A pesar de que las microalgas constituyen un reservorio de compuestos bioactivos, sólo un número limitado de las especies conocidas ha sido estudiado y analizado para la producción de lípidos (Pomponi 1999). Entre los diversos grupos de microalgas que sintetizan y acumulan PUFAs se incluyen las diatomeas, las crisófitas, las criptofitas, las primnesiofitas y los dinoflagelados (Cohen et al. 1995). Sin embargo, el principal obstáculo para la producción comercial de algas se debe a que la mayor

parte de ellas son fotoautótrofas obligadas y además no acumulan los PUFA's como triacilglicérol's. Las bajas productividades obtenidas con estos sistemas se relacionan principalmente con dos problemas no resueltos aún, la limitación de luz y la acumulación de oxígeno (Barbosa 2003). La alternativa a los fotobioreactores, con el potencial de reducir los costos, es utilizar algas con capacidad de crecer heterotróficamente en fermentadores convencionales. Se ha estimado que el costo de producción de biomasa heterotrófica puede ser menor a US\$ 5/ kg mientras que producir 1 kg de alga fototróficamente puede representar valores superiores en 1 o 2 órdenes de magnitud (Gladue & Maxey 1994). De todos modos, las algas fotosintéticas continuarán siendo candidatos para la elaboración de SCO para acuicultura debido a que representan la mejor y más natural fuente de nutrientes para larvas y animales juveniles como ostras, larvas de pez espada y rotíferos (Cohen 1999).

Los microorganismos marinos heterótrofos que actualmente son utilizados en procesos comerciales para la producción de PUFA's n-3, particularmente DHA, son el dinoflagelado marino *Cryptocodinium cohnii* y los géneros de traustochytriales *Thraustochytrium* y *Schizochytrium* (Ward & Singh 2005). Kyle (1994) describió un método para la obtención de DHA con *C. cohnii* que provee las bases para la producción industrial de "DHASCO", aditivo incorporado en fórmulas infantiles y otras comidas. En el ejemplo presentado, el máximo rendimiento de DHA resultó de aproximadamente 2 g l⁻¹ luego de 5 días de cultivo. La acumulación de triacilglicérol's en *C. cohnii* no ocurre durante la fase activa de crecimiento en un medio con todos los nutrientes, sino en la idiofase, después que algún nutriente, diferente a la fuente de carbono, es limitante (generalmente nitrógeno). Debido a esto la fermentación se realiza en dos etapas y por lote alimentado. En la primera fase, cuando el crecimiento es activo, el contenido de lípidos en la biomasa representa aproximadamente un 20% del peso seco de biomasa y las células son móviles. Una vez que el nitrógeno se agota y se continúa alimentado el fermentador con la fuente de carbono, comienza a producir material de reserva, las células pierden los flagelos y se desarrollan numerosos cuerpos lipídicos (Wynn et al. 2005). El bioproceso en el que se han obtenido los rendimientos más elevados de biomasa (109 g l⁻¹), lípidos (61 g l⁻¹) y DHA (19 g l⁻¹) con este microorganismo luego de 400 h de fermentación utilizando acetato como fuente de carbono y un sistema de lote alimentado ha sido informado por de Swaaf et al. (2003).

6.2.4- Producción de PUFA's empleando traustochytriales

Las mejores fuentes microbianas de DHA son las cepas de los géneros *Schizochytrium* sensu lato y *Thraustochytrium*, con las que se han alcanzado productividades superiores a las registradas para *C. cohnii*. La tabla 6.1 presenta algunos ejemplos representativos de las producciones de biomasa, lípidos y DHA obtenidas a escala de laboratorio, en frasco agitado y en fermentadores para las distintas cepas estudiadas. En ella puede observarse que los valores más elevados corresponden a la cepa *Aurantiochytrium* (anteriormente *Schizochytrium*) *limacinum* SR21, originaria de manglares de la isla Yap de Japón (Honda et al. 1998), que actualmente es considerada la especie modelo para la producción comercial de DHA (Raghukumar 2008). Yokochi et al. (1998) optimizaron la producción de este PUFA n-3 con la referida cepa en frascos agitados, obteniendo rendimientos de más de 4 g DHA l⁻¹ (tabla 6.1) en medio con glucosa (9% m/v) o glicerol (12% m/v), macerado de maíz (CSL) y una concentración de sal correspondiente al 50-200% de la presente en el agua de mar. *A. limacinum* SR21 también prosperó sin el agregado de sal, aunque la tasa de crecimiento se redujo a la mitad que la registrada en condiciones óptimas. El contenido de FA se incrementó al disminuir la concentración de la fuente de nitrógeno, representando un 50% de la biomasa total (tabla 6.1). Esta cepa contrastó con *T. aureum*, que resultó completamente inhibida por salinidades de agua de mar de 0 y 200% y por concentraciones de glucosa mayores al 1% (Iida et al. 1996). El crecimiento de la cepa SR21 en di y polisacáridos fue muy pobre, a diferencia de *T. aureum*, *T. roseum* y *S. aggregatum* que se propagaron sin dificultad en maltosa y almidón (Bajpai et al. 1991a y b, Li & Ward 1994). Las máximas productividades de DHA con *A. limacinum* SR21 a escala de laboratorio (3,3 g DHA l⁻¹ d⁻¹) han sido informadas por Yaguchi y colaboradores (1997), en cultivos de cuatro días en fermentadores con 3 l de medio con 12% m/v de glucosa. Los autores alcanzaron valores de 48 g l⁻¹ de biomasa seca y 13 g l⁻¹ de DHA; el contenido de lípidos fue un 77,5 % de la biomasa mientras que el contenido de DHA representó el 36,5% de los FA totales (tabla 6.1).

Bowles y colaboradores (1999) desarrollaron un programa de aislamiento de traustochytriales a partir de materiales provenientes de regiones con diferentes climas (litoral templado, 59–61° N; litoral frío, 50–51° N; y manglares subtropicales, 25–27° N). Luego de evaluar la producción de biomasa, lípidos y DHA de los 57 aislamientos

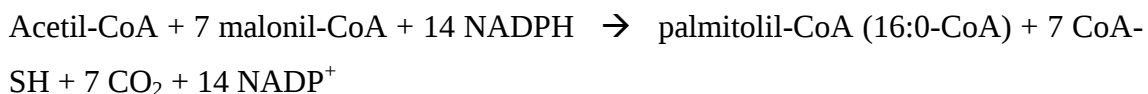
obtenidos, encontraron que las concentraciones máximas de DHA se registraron en las cepas de ambientes fríos, pero los mayores niveles de biomasa correspondieron a aquellas provenientes de ambientes subtropicales. La concentración más elevada de DHA utilizando una cepa tropical resultó 2,17g l⁻¹ luego de 107 h de cultivo en un biorreactor. Por su parte Barclay (1997) comparó la producción de PUFAs de 151 nuevas cepas aisladas y cinco de la colección de cultivo ATCC, obteniendo las máximas productividades de DHA (1,08 g l⁻¹ d⁻¹) con algunos de los nuevos aislamientos. Valores similares fueron registrados por una de las 9 cepas obtenidas por Fan y colaboradores (2002) a partir de manglares subtropicales. Este aislamiento, reconocido como *S. mangrovei*, produjo 2,8 g l⁻¹ de DHA en 52 h de cultivo en medio con glucosa y extracto de levadura. En el mencionado trabajo los autores evaluaron además el uso de residuos provenientes de una industria productora de leche de soja, que sustentó el crecimiento de todas las cepas.

Respecto a los estudios a escala industrial, Baily y colaboradores (2003) han descrito las condiciones para cultivos de alta densidad, en los que luego de 90 y 100 h de fermentación, consistente en una primera etapa de incremento de biomasa seguida de una segunda etapa de producción de lípidos, se lograron obtener concentraciones de biomasa del orden de 200 g l⁻¹ y productividades de DHA de 0,5 g l⁻¹ h⁻¹. Los organismos empleados en estos ensayos fueron especies del género *Schizochytrium* sensu lato (ATCC 20.888 y un aislamiento salvaje). El cultivo de cepas de *Thraustochytrium*, *Schizochytrium* y *Ulkenia* para la producción de aceites que son incorporados en alimentos que contienen PUFAs n-3, utilizados en la acuicultura y como aditivos en la producción de huevos y en la formulación de alimentos infantiles se detalla también en diversas patentes (Barclay 1992, 1994 y 2001, Tanaka et al. 2003).

6.2.5- Bioquímica de la acumulación de PUFAs

La comprensión de los mecanismos bioquímicos subyacentes a la síntesis y acumulación de FA es de crucial importancia para el desarrollo de los procesos relacionados con los SCO. Solamente un número reducido de microorganismos son capaces de acumular lípidos por encima de un 20% de su biomasa, y en principio sus vías de biosíntesis de FA no parecen ser diferentes que las de las especies no oleaginosas. Tal como se comentara en el capítulo 1, los FA son sintetizados mediante

un complejo enzimático multiproteico denominado sintetasa de ácidos grasos (FAS), de acuerdo a la siguiente reacción general:



La malonil-CoA deriva de la acetil-CoA, que es carboxilada por la enzima acetil-CoA carboxilasa en el primer paso de la biosíntesis de lípidos. Si bien en principio se supuso que esta enzima podría haber sido clave en la regulación de la vía metabólica, actualmente se presume que la oleaginosidad de ciertos microorganismos estaría más relacionada con su habilidad para suplementar continuamente los sustratos primarios: acetil-CoA y NADPH. (Anderson & Wynn 2001). La alta disponibilidad de estos dos metabolitos ha sido atribuida a la presencia de la enzima ATP:citrato liasa y a la dependencia de AMP de la isocitrato dehidrogenasa, exclusivas de las especies oleaginosas. Tal como se muestra en la figura 6.1, bajo limitaciones de nitrógeno, las células de estos microorganismos experimentan un incremento de la actividad AMP deaminasa, que reduce el contenido de AMP e inhibe la actividad de la enzima isocitrato deshidrogenasa en las mitocondrias. Consecuentemente se acumula ácido cítrico que es exportado hacia el citosol, donde es clivado por la ATP:citrato liasa para formar acetil-CoA y oxalacetato. La acetil-CoA queda entonces disponible para la biosíntesis de ácidos grasos mientras que el oxalacetato es convertido en malato. El malato es decarboxilado por la enzima málica para producir piruvato y NADPH. Si bien la enzima málica no es el único sistema generador de NADPH, parece estar íntimamente asociada con la vía lipogénica dado que su deficiencia inhibe la acumulación de FA (Ratledge 2004).

En la mayoría de los organismos, el complejo FAS provee los FA saturados de 16C y 18C que se desaturan y elongan subsecuentemente para dar origen a los PUFAs (fig. 1.5). Sin embargo, el análisis de los genes de la síntesis de FA de una especie de *Schizochytrium* y otra de *Ulkenia* ha mostrado que estas cepas utilizarían un sistema alternativo similar a la ruta de la policétido sintetasa (PKS) bacteriana. En este nuevo esquema la introducción de dobles enlaces no requiere de O₂ como en la vía convencional y por eso se ha denominado anaerobio, aunque ocurra en presencia de O₂. Si bien aún poco se sabe acerca de este mecanismo biosintético, se ha especulado que

los doble enlaces introducidos durante la síntesis de la cadena carbonada serían retenidos (a diferencia de la ruta FAS) y entonces los intermediarios de hasta 16 C nunca serían completamente saturados (Metz et al. 2001). Una de las ventajas que tendrían los organismos que posean este sistema es que “economizarían” la necesidad de poder reductor (NADPH) para la síntesis de PUFAs (Ratledge 2004).

Finalmente cabe mencionar que la identificación de una Δ -4 desaturasa en una especie de *Thraustochytrium* involucrada en la conversión de DPA n-3 en DHA mediante expresión heteróloga en *Saccharomyces cerevisiae* y *Brassica juncea* (Qiu et al. 2001) plantearía la existencia de dos rutas alternativas para la síntesis de PUFAs en las traustoquitriales: la tradicional, dominante en especies de *Thraustochytrium*, y la vía PKS, predominante en *Schizochytrium* (y *Ulkenia*) (Ward & Singh 2005).

6.2.6- Metodologías estadísticas para la optimización de bioprocesos

Fisher (1926) desarrolló la teoría básica de los Diseños Estadísticos Experimentales (DOEs) al demostrar que cambiar más de un factor al mismo tiempo resulta más eficiente que cambiar un único factor por vez. La aplicación de este tipo de enfoque ha resultado muy exitosa para el mejoramiento de medios de cultivo (Silveira et al. 1991). Idealmente, la metodología de los DOEs es un proceso secuencial que involucra en primer lugar, la realización de diseños de selección, mediante los cuales se explora un gran número de variables independientes de un bioproceso a fin de establecer cuales de ellas son significativas sobre la variable respuesta estudiada (Montgomery 1991). En este tipo de experimentos, los niveles máximos y mínimos para cada uno de los factores x_i explorados se codifican como de +1 y -1, estudiándose experimentalmente sólo un subconjunto de todas las combinaciones posibles, lo que permite ganar tiempo y disminuir costos. Los resultados obtenidos se analizan estadísticamente, estimándose el efecto lineal (la pendiente b_i de la línea que conecta la media aritmética de las respuestas en su nivel inferior y la media aritmética de las respuestas en su nivel superior, así como el grado de significancia estadística, P) de cada uno de los factores. De este modo, la variable respuesta se expresa por ecuaciones lineales del tipo $y_i = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + \dots + b_nx_n$, donde n es el número de variables independientes e y_i es el grado de la respuesta i . Para verificar que se esté trabajando en el rango adecuado (es decir, que se incluyen los niveles óptimos) y estimar el error puro

del método (o sea, la dispersión entre réplicas) se realizan también (por triplicado) ensayos (“puntos centrales”) que combinan los valores centrales de los niveles de todos los factores estudiados (Strobel & Sullivan 1999). Los diseños de selección más comúnmente empleados son los del tipo Plackett-Burman (PB) y Factorial Fraccional (FFr). Este último, permite también estimar el efecto de la interacción entre dos factores sobre la respuesta estudiada (Stanbury et al. 1986).

Una vez seleccionadas las variables de mayor incidencia sobre el bioproceso, se llevan a cabo diseños de optimización. El objetivo de estos estudios es confirmar los efectos y las interacciones determinados anteriormente, estimar la curvatura específica de los efectos cuadráticos y determinar los valores óptimos para los factores críticos seleccionados (Strobel & Sullivan 1999). El Diseño Central Compuesto de Box-Wilson centrado en las caras es el más empleado con este fin. Las variables evaluadas se codifican según la siguiente ecuación: $x_i = \frac{X_i - X_0}{\Delta X_i}$, donde $i = 1, 2, \dots, k$; y la respuesta se

analiza según el modelo de segundo orden:

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{j=2}^k \sum_{i=1}^{j-1} \beta_{ij} x_i x_j + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 \quad (\text{Box et al. 1978}).$$

Finalmente, después de la construcción del modelo, el máximo óptimo predicho se verifica experimentalmente.

Las Redes Neuronales Artificiales (ANNs) constituyen estrategias alternativas a los DOES (Kennedy & Krouse 1999, Mutihac & Mutihac 2008), siendo modelos que imitan la capacidad de aprendizaje del cerebro. Ellas son entrenadas con un conjunto de datos de entrada (valores de las variables independientes del bioproceso, en este caso) y salida (i.e. valores de las respuestas obtenidas) para “aprender” a reproducir una salida a partir de una entrada. La principal ventaja de las ANNs es que pueden utilizarse para modelar situaciones no lineales sin necesitar de conocimientos previos acerca de la dinámica del sistema (Soria et al. 2004). La desventaja de las ANNs es que al ser modelos de “caja negra”, la inspección de sus parámetros no permite entender la influencia de las variables de entrada sobre las salidas. Por esta razón, las técnicas estándar de diferenciación aplicadas a modelos paramétricos para encontrar máximos y mínimos no pueden aplicarse a la optimización por ANNs. En su lugar, se han desarrollado distintos métodos de búsqueda, y entre ellos, la familia de los Algoritmos

Genéticos (GA) es la más frecuentemente utilizada. En esta metodología, los valores de salida se calculan utilizando el modelo de la ANN para un número de “individuos”, cada uno conteniendo un “cromosoma” con tantos “genes” como variables de entrada y valores iniciales al azar asignados a ellos. Aquellos individuos con los valores de salida más altos y más bajos, dependiendo de si el objetivo es encontrar un máximo o un mínimo respectivamente, se conservan para la próxima generación, y se “crean” nuevos individuos cruzando los cromosomas exitosos y otros mutados al azar de los individuos de la generación anterior. El proceso se repite para un número dado de generaciones o hasta que la población alcance un máximo (o un mínimo). La combinación de ANNs y GAs para la optimización de procesos ha sido aplicada exitosamente en biotecnología y química industrial (Desai et al. 2008, Mutihac & Mutihac 2008).

6.2.7- Objetivos

Durante la etapa de selección de cepas locales para los estudios de producción de PUFAs n-3, se encontró que ninguna de ellas presentó concentraciones de biomasa mayores a 5 g l⁻¹ luego de una semana de incubación en los diferentes medios y condiciones ensayadas (capítulo II, sección 2.4.4), por lo que no constituirían sistemas adecuados con fines productivos. Más allá de que estos resultados no descarten la posibilidad de hallar en un futuro aislamientos locales con mayores potenciales biotecnológicos, para los ensayos de producción propuestos en este trabajo de tesis se optó por utilizar la cepa modelo *A. limacinum* SR21. Considerando que la acumulación de PUFAs está asociada a requerimientos nutricionales particulares, diferentes a aquellos relacionados con el crecimiento, los objetivos de este capítulo son:

- Estudiar en detalle la cinética de crecimiento de la cepa modelo *A. limacinum* SR21 bajo diferentes relaciones C:N para proponer un bioproceso en el que se optimice la producción de biomasa y la producción de DHA.
- Aplicar las metodologías estadísticas de los DOEs, ANNs y GA para definir las condiciones óptimas de crecimiento para la cepa en estudio

- Diseñar un bioproceso utilizando las condiciones determinadas como óptimas para el crecimiento y las establecidas en la literatura para la producción de DHA que mejore las productividades de DHA previamente informadas.
- Escalar el proceso optimizado en frascos agitados en un biorreactor de volumen de trabajo de 5 litros

6.3- Materiales y Métodos

6.3.1- Cepa y mantenimiento

Los estudios se realizaron con la cepa *A. limacinum* SR21, provista por el Instituto de Fermentación de Osaka (Japón, IFO 32693, ATCC MYA-1381). El microorganismo se mantiene a -70°C en medio GPY (tabla 2.1) con glicerol 10% v/v. Los cultivos de rutina y preinóculos para los ensayos se prepararon en frasco agitado en medio GPY a 28°C y 250 rpm.

6.3.2- DOEs, ANN, GA y análisis de datos

Se utilizaron diseños del tipo PB y FFr para seleccionar las variables que tuvieran un efecto significativo sobre la acumulación de biomasa. Estos diseños se desarrollaron para 3 o 4 factores con dos niveles codificados, cubriendo diferentes rangos, como se indica en la tabla 6.4, para evaluar su efecto lineal sobre la biomasa (peso seco). Para cada experimento se corrieron además 3 “puntos centrales”. Los resultados se ajustaron a un modelo lineal de primer orden, estimando el coeficiente (pendiente) para cada factor y su nivel de significancia estadística.

Se aplicó un procedimiento de dos pasos para verificar si los datos de los experimentos de selección podían agruparse a fin de ser utilizados en modelos de optimización. En primera instancia, los ensayos individuales de los 5 experimentos de selección (tabla 6.4) se agruparon utilizando el algoritmo de las K-medias de acuerdo a los valores de los factores significativos (Hartigan 1979), i.e. tamaño del inóculo y concentración de glucosa y de macerado de maíz (CSL). El algoritmo de las K-medias distribuye muestras, ensayos en este caso, entre un número de grupos. Si ese número, n ,

no se conoce *a priori*, se evalúan varios valores de n y la suma de cuadrados acumulativa dentro del grupo penalizada por n es calculada para cada uno. Aquel n con la menor suma de cuadrados penalizada se selecciona. Debido a la superposición parcial de muestras dentro del espacio muestral, la mayoría de los grupos que resultan del algoritmo de K-medias deberían contener ensayos provenientes de diferentes experimentos. En la tabla 6.5 puede observarse que esto ocurrió con los datos analizados (4 de los 5 experimentos tuvieron sus ensayos ubicados en al menos 3 grupos distintos, y 5 de los 6 grupos incluyeron ensayos de al menos dos experimentos diferentes). El segundo paso del análisis fue determinar si existía una diferencia significativa en los valores medios de peso seco entre los grupos obtenidos mediante el algoritmo de K-medias. Para esto se realizaron ANOVAs de un factor de los ensayos utilizando la pertenencia a los grupos como criterio clasificador y los valores de peso seco como variable dependiente.

Para la etapa de optimización, el conjunto de datos de los ensayos de los cinco experimentos de selección se dividió en dos subconjuntos, uno para ajustar o “entrenar” el modelo, y otro para su validación. Los datos del primer subconjunto se ajustaron a tres modelos: lineal con interacciones, cuadrático con interacciones y una ANN. Los modelos se utilizaron para hacer predicciones sobre el subconjunto de datos de validación. Para comparar su efectividad, se calculó para cada modelo la raíz cuadrada de la suma media de los cuadrados de los errores (*mse*) según:

$$mse = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_i^n (\text{observado}_i - \text{esperado}_i)^2}$$

El análisis estadístico y numérico de los datos se realizó con el programa R (R Development Core Team, 2007). Para el diseño, entrenamiento y predicciones de la ANN se siguió la metodología descrita por Soria y colaboradores (2006), utilizando la herramienta *Neural Network Toolbox* incluida en el programa MATLAB ver. 6.0 (The MathWorks, Natick, MA, USA). La arquitectura de la ANN consistió en una red con tres capas: una capa de entrada (con tres datos de entrada: tamaño de inóculo y concentraciones de glucosa y CSL), una capa oculta con cuatro neuronas y una capa de salida que presentó el valor predicho de peso seco. Se aplicó la función sigmoidea

tangente hiperbólica (tansig) como función de transferencia de las neuronas en la capa oculta, y una función de transferencia lineal para la neurona de la capa de salida. Para el entrenamiento se utilizó el método Bayesiano de *back-propagation* (trainbr) (Foresse & Hagan 1997, MacKay 1992), el cual busca el número de neuronas en la capa oculta que produce buenas predicciones.

Se aplicó un GA para encontrar la combinación de tamaño de inóculo y concentraciones de glucosa y CSL que rindieran la máxima producción de biomasa. Para ello se empleó la herramienta *Genetic Algorithm and Direct Search Toolbox* del programa MATLAB con los siguientes parámetros: tipo de población, doble vector; tamaño de la población, 40 individuos; número de individuos que sobreviven en la próxima generación, 10; fracción de retrocruza (fracción de los 30 individuos restantes que se generan por recombinación), 0,95; escala de valor para la varianza de la primer generación, 0,8. Los restantes parámetros se dejaron en los valores estándar del programa. Los valores posibles que podían tomar los individuos de la primer generación fueron restringidos a 8-12% m/v de glucosa, 11-13% v/v de CSL y $5.0-6.0 \times 10^6$ células ml^{-1} para el tamaño del inóculo. Estos parámetros y los valores iniciales se seleccionaron por encontrarse en una región que contenía un máximo según los análisis exploratorios iniciales. La función de *fitness* utilizada fue la de la ANN entrenada con la restricción de evitar concentraciones de CSL superiores a 13% v/v y tamaños de inóculo mayores que $5.0-6.0 \times 10^6$ células ml^{-1} , ya que ningún máximo encontrado más allá de estos límites sería aplicable en la práctica.

6.3.3- Condiciones de cultivo

Para investigar el efecto de la relación molar C:N sobre la producción de peso seco, proteínas y lípidos, los cultivos se realizaron en el Medio Basal de Producción (MBP), el cual contiene 10,00% m/v de glucosa, 0,40% m/v de KH_2PO_4 , 0,10% m/v de extracto de levadura (YE), 1,75% m/v de sal de mar artificial (SW), concentración variable de acetato de amonio ($\text{CH}_3\text{COONH}_4$) dentro del rango 0.15 - 2.20% m/v y pH 5.5. Para los estudios de cinética de crecimiento y los ensayos de los DOEs se llevaron a cabo cultivos de cinco días crecidos en medios con diferentes concentraciones de nutrientes (ver tabla 6.4). Para la optimización de la producción de DHA mediante una fermentación en dos etapas, las células fueron primero incubadas en el medio

optimizado de crecimiento, centrifugadas a 7000 rpm por 15 min, lavadas 3 veces con 1,75% de SW, transferidas al mismo volumen de MBP con diferentes relaciones molares C:N e incubadas durante 3 días. En todos los casos, los cultivos se realizaron en frascos agitados de 100 ml conteniendo 20 ml de medio de cultivo y se incubaron a 200 rpm y $28\pm 1^{\circ}\text{C}$.

Los experimentos en biorreactores se realizaron en un equipo BioFlo 110 (New Brunswick Scientific, Edison, NJ, USA) provisto de sensores de pH, temperatura, agitación y concentración de oxígeno disuelto (DOC). Los cultivos en lote se llevaron a cabo en 3.5 l de medio de producción, cuya composición se estableció en los resultados previos en frasco agitado. Se utilizaron como inóculo (10% v/v) cultivos crecidos en el medio optimizado de crecimiento. La temperatura se mantuvo en $28\pm 1^{\circ}\text{C}$ y la velocidad de agitación se varió (entre 300 y 500 rpm) para mantener la DOC a un 20% de saturación con un flujo fijo de aire de 1.71 vvm. Para controlar la formación de espuma, se adicionó al inicio de los experimentos 30 μl de antiespumante (Antifoam289, Sigma, Saint Louis, MO, USA). Se tomaron muestras de 15 ml cada 8 h y al final de la fermentación (96 h) para determinar *off-line* las concentraciones de glucosa remanente, biomasa, lípidos y DHA.

6.3.4- Determinaciones analíticas

Para la estimación de la producción de biomasa como peso celular seco, las muestras lavadas con agua destilada se secaron a 105°C hasta peso seco constante. Los recuentos celulares se realizaron en cámara de Neubauer, estimándose la velocidad específica de crecimiento ($\mu_{\text{máxima}}$) y el tiempo de duplicación (td) según la fórmula:

$$\mu_{\text{máxima}} (\text{h}^{-1}) = \frac{\Delta \text{biomasa}}{\Delta \text{tiempo (h)}} = \frac{(\ln x - \ln x_0)}{\Delta t} = \frac{\ln 2}{td}$$

siendo x la concentración de células alcanzada en un tiempo determinado (Δt) y x_0 la concentración de células inicial. La glucosa residual se determinó con un kit comercial enzimático basado en el método de la glucosa oxidasa-peroxidasa (Wiener Lab., Argentina), el amonio residual mediante el método del indofenol (Scheiner 1975) y la concentración de proteínas de acuerdo a Lowry et al. (1951). Los lípidos se determinaron gravimétricamente según la metodología descrita por Kates (1998). Para la medición de DHA, la biomasa lavada se liofilizó y se suspendió en HCl metanólico

10% por 3 h a 50°C, agregando ácido araquídico (20:0) como estándar interno. Luego de extraer con n-hexano, seguido de evaporación en atmósfera de nitrógeno, los ácidos grasos esterificados obtenidos se disolvieron en n-hexano y se cuantificaron en un cromatógrafo gaseoso HP 5890 (Hewlett-Packard Co., Palo Alto, CA, USA) con detector de ionización de llama (FID) y con una columna capilar SB 5 (Supelco; Bellefonte, Pensilvania, USA). La temperatura de horno inicial fue de 180°C durante 2 min, seguido de un gradiente de 5°C min⁻¹ hasta 225°C y permanencia en la temperatura final de 5 min. La identificación de DHA se realizó tomando de referencia el éster metílico correspondiente certificado por Sigma.

6.4- Resultados

6.4.1- Cinética de crecimiento en medios con diferente relación C:N

Como punto de partida se estudió la cinética de crecimiento de la cepa *A. limacinum* SR21 en medios de cultivo con diferentes relaciones molares C:N. La figura 6.2 muestra los valores de biomasa (medida como peso seco), lípidos, proteínas y glucosa residual registrados al emplear el medio de propagación GPY (tabla 2.1, relación C:N aproximada 10:1), habitualmente utilizado en la preparación de inóculos y en el mantenimiento de la cepa. Partiendo de un inóculo de 1 10³ células ml⁻¹, se obtuvieron una $\mu_{\text{máxima}}$ de 0,31 h⁻¹ y un tiempo de duplicación de 2,2 h, alcanzándose la fase estacionaria a las 36 h (6,5 10⁷ células ml⁻¹). La glucosa se agotó completamente a las 48 h de cultivo, tiempo en que la biomasa tomó valores aproximados de 9 g l⁻¹, que se mantuvieron hasta el final del ensayo (120 h). La variación de la concentración de las proteínas celulares presentó el mismo perfil que la biomasa mientras que los lípidos se incrementaron hasta las 48 h para luego disminuir gradualmente obteniéndose registros menores a 0,3 g l⁻¹ a partir de las 96 h.

Se procedió a continuación a estudiar la cinética de crecimiento en un medio de cultivo con una relación C:N (50:1) más elevada que la del medio GPY, conteniendo los nutrientes (y las concentraciones) que Yokochi y colaboradores (1998) encontraran como óptimas para la producción de DHA, al que se denominó Medio Basal de Producción (MBP, ver composición en Materiales y Métodos). Partiendo de un inóculo del mismo tamaño que el del ensayo anterior (1 10³ células ml⁻¹), el cultivo alcanzó la

fase estacionaria a las 48 h ($2,5 \times 10^7$ células ml^{-1}), momento en que prácticamente se detuvieron tanto el consumo de glucosa como el incremento de biomasa (fig. 6.3 A). La $\mu_{\text{máxima}}$ fue de $0,21 \text{ h}^{-1}$ y el tiempo de duplicación de 3,3 h. Debido a que las concentraciones de lípidos (menores a 1 g l^{-1}) y el peso seco celulares (hasta 4 g l^{-1}) resultaron muy bajos y que la mayor parte de la fuente carbonada no había sido consumida (80 g l^{-1} de glucosa remanente), el experimento se repitió utilizando un inóculo de mayor tamaño (1×10^6 células ml^{-1} , fig. 6.3 B). En este segundo ensayo, se observó activa división celular hasta las 36 h (3×10^7 células ml^{-1}), obteniéndose una $\mu_{\text{máxima}}$ de $0,09 \text{ h}^{-1}$ y un tiempo de duplicación de 7 h. La concentración de lípidos y el consumo de glucosa se incrementaron abruptamente a partir de las 48 h (fig. 6.3 B), aumentando junto con la biomasa hasta el final del experimento (120 h).

Para confirmar el efecto diferencial de la relación molar C:N del medio de cultivo sobre el crecimiento (estimado mediante la concentración de proteínas) y sobre la acumulación de lípidos, se realizaron cultivos en medio MBP variando la concentración de la fuente de N (acetato de amonio) de modo de alcanzar relaciones C:N entre 10:1 y 150:1. La figura 6.4 muestra que en las células de *A. limacinum* SR21 crecidas en MBP con relaciones C:N bajas (10:1) se favoreció la producción de proteínas sobre la de lípidos, y que esta tendencia se invirtió a partir de relaciones C:N de 50:1.

6.4.2- Diseños de selección

Considerando los resultados de los ensayos anteriores y los referidos en la literatura, se dividió el estudio de la optimización de la producción de DHA en dos etapas, investigando en principio con mayor detalle las variables significativas sobre el crecimiento de *A. limacinum* SR21 (primera etapa) de modo de obtener biomasa para utilizar como inóculo en una (segunda) etapa de producción de ácidos grasos.

Para evaluar la importancia relativa de la concentración de nutrientes, las condiciones ambientales y su interacción sobre el crecimiento de la cepa SR21, el efecto de la glucosa (fuente de C), del CSL (fuente de N), el pH y la salinidad del medio de cultivo se estudiaron mediante diseños de selección del tipo FF_r. Dado que el número de células y el peso seco no mostraron una relación lineal (ver ítem anterior), se eligió el

peso seco como parámetro indicador de la producción de biomasa ya que éste resulta más significativo desde un punto de vista biotecnológico. La tabla 6.2 muestra uno de los FFr desarrollados, incluyendo los niveles codificados y reales de las variables independientes y la respuesta obtenida (peso seco), la cual varió en un rango entre 4.1 y 38.5 g l⁻¹, dependiendo de las condiciones ensayadas. Los coeficientes de regresión para las variables codificadas y sus interacciones se muestran en la tabla 6.3. Los únicos factores que mostraron un efecto significativo sobre la producción de biomasa ($P < 0.05$) fueron la concentración de glucosa, la de CSL y su interacción. La obtención de coeficientes positivos para estas variables significa que los niveles más altos de biomasa se produjeron en altas concentraciones de ambos nutrientes en el medio de cultivo.

Dado que otros factores no incluidos en el diseño de selección anterior podrían afectar también la producción de biomasa, tales como el tamaño del inóculo o la adición de fosfato o vitaminas al medio de cultivo, se incluyó su exploración durante la fase de selección. De este modo, varios DOEs más pequeños (del tipo PB y FFr) se llevaron a cabo para evaluar el efecto de diferentes rangos de nutrientes (fuentes de C, N, P y vitaminas), condiciones físico-químicas (pH y salinidad) y tamaño del inóculo sobre el crecimiento de *A. limacinum* SR21. Los diseños completos y sus correspondientes análisis estadísticos se presentan en el Apéndice (tablas A.6 a A.13). Los resultados obtenidos, sintetizados en la tabla 6.4, revelaron que, bajo las condiciones ensayadas, ni la salinidad (0.35 a 3.5%) ni el pH (4 a 7) afectaron significativamente la producción de biomasa, por lo que en los siguientes experimentos se mantuvieron en una concentración de 1.75% y un valor de 5.5 respectivamente. En lo concerniente al YE (0.1-0.8%) y al KH₂PO₄ (0.1-1%), como suplementos de vitaminas y fosfatos respectivamente, tampoco se encontraron diferencias significativas al incluir estas variables dentro de las concentraciones ensayadas, motivo por el cual se descartaron en los siguientes experimentos. Por otro lado, tanto la concentración de glucosa como la de CSL, cubriendo un rango entre 0.5-13.5% y 0.5-15% respectivamente en los diferentes experimentos desarrollados, mostraron un efecto significativo positivo sobre la producción de biomasa, exceptuando el caso de la glucosa en el diseño FFr2, donde éste resultó negativo. La interacción positiva entre la glucosa y el CSL sugirió nuevamente un efecto diferencial de la relación molar C:N sobre la producción de biomasa. El tamaño del inóculo se mantuvo aproximadamente en 10⁶ células ml⁻¹ en todos los

experimentos, excepto en el diseño FFr2, para el cual este factor se varió entre 10^3 y 10^6 células ml^{-1} y presentó un efecto significativo positivo.

6.4.3- Análisis de datos para el proceso de optimización

Cuando se realizan uno o dos diseños durante la fase de selección, el curso normal para continuar con la fase de optimización es la aplicación de diseños de superficie de respuesta, como los del tipo Box-Behnken o central compuesto. Para este caso en particular, se llevaron a cabo 5 diseños de selección independientes en los cuales el rango de al menos un factor se superponía con el rango del mismo factor en otro diseño. Como consecuencia, el hecho de contar con este número relativamente elevado de datos que cubría un amplio espacio experimental se presentaba como una oportunidad para agruparlos y utilizarlos para ajustar modelos con el fin de buscar los puntos óptimos sin necesidad de desarrollar nuevos experimentos. Sin embargo, las variaciones entre experimentos y el hecho de que la superposición fuera solamente parcial podían inhabilitar la agrupación de datos. Para verificar esto, se aplicó un proceso en dos etapas combinando el algoritmo de K-medias y el análisis de varianza (para más detalles, ver Materiales y Métodos). Este análisis (tabla 6.5) mostró que ensayos de diferentes experimentos de selección con valores similares de tamaño de inóculo y concentración de glucosa y CSL podían ser incluidos en un mismo grupo y que las diferencias en el peso seco entre estos grupos eran estadísticamente significativas ($P < 10^{-6}$). Confirmada entonces la validez del agrupamiento de los datos de los diseños de selección, éstos se utilizaron como un único conjunto para la posterior etapa de optimización.

Para encontrar los valores óptimos de tamaño de inóculo, concentración de glucosa y concentración de CSL, el conjunto de datos experimentales se dividió en dos subconjuntos, uno de entrenamiento y otro de validación. Se ajustaron dos regresiones (una lineal y otra cuadrática) y un modelo de ANN con el primer subconjunto y a partir de ellos se realizaron predicciones sobre el segundo (para más detalles, ver Materiales y Métodos). Los valores de la suma media de los cuadrados de los errores (*mse*) para los modelos lineal, cuadrático y la ANN fueron 5.8, 4.2 y 2.6 respectivamente. En consecuencia, se utilizó el último de ellos para simular la biomasa producida por 5172 combinaciones de concentraciones de glucosa, CSL y tamaños de inóculo. El análisis

exploratorio mostró que la producción de biomasa estaba fuerte y positivamente correlacionada con la concentración de CSL. Sin embargo, la preparación de medios con altos niveles de CSL resulta dificultosa. Por otro lado, experimentos previos mostraron que el incremento del CSL provocaba una reducción en el contenido de lípidos, lo cual afectaría negativamente la segunda fase de acumulación de DHA. Por estos motivos, se estableció una concentración de 12 % de CSL como límite superior para las siguientes búsquedas de óptimos.

Se utilizó un GA acoplado a la ANN entrenada (para más detalles, ver Materiales y Métodos) para encontrar la combinación de los componentes críticos del medio que rindieran un máximo valor de biomasa. El GA predijo una producción máxima de biomasa de 42.1 g l^{-1} con 8.8 g l^{-1} de glucosa, 12% de CSL y un tamaño de inóculo de $1 \cdot 10^6$ células ml^{-1} (círculo blanco en la figura 6.5). Como para el trabajo rutinario es más sencillo preparar inóculos más pequeños, se seleccionó para este factor el valor de $4 \cdot 10^5$ células ml^{-1} , que se encuentra en la isolínea de 38 g l^{-1} de biomasa. La mencionada figura indicó además que la concentración de glucosa debía mantenerse en 80 g l^{-1} .

6.4.4- Validación

El perfil de crecimiento de la cepa *A. limacinum* SR21 en el Medio Optimizado de Crecimiento (MOC; composición: 8.0% m/v de glucosa, 12.0% v/v de CSL, 1.75% m/v de SW; relación molar C:N 6:1) se presenta en la figura 6.6. Considerando a la división celular como medida de propagación, la fase estacionaria se alcanzó a las 40 h con una $\mu_{\text{máxima}}$ de 0.11 h^{-1} . Por su parte, la biomasa celular continuó incrementándose hasta aproximadamente las 120 h de incubación. Se registró un elevado consumo de glucosa para la acumulación de altos niveles de biomasa y lípidos a partir de las 100 h de cultivo, obteniéndose 40.33 g l^{-1} de peso seco a las 120 h, un valor muy próximo a los 38 g l^{-1} predichos. La acumulación de lípidos fue coincidente con el consumo total del amonio y alta concentración de glucosa en el medio de cultivo (esto es, con una relación molar C:N alta).

6.4.5- Condiciones para la producción de DHA mediante un bioproceso de dos etapas

En los siguientes experimentos en dos etapas, los cultivos se incubaron en medio MOC (primera etapa), se lavaron y luego se transfirieron a medio de producción para que acumularan DHA (segunda etapa). Considerando que el estado metabólico del inóculo podría haber resultado una variable significativa sobre la producción, se investigó la influencia de la fase de crecimiento (exponencial o estacionaria) de las células obtenidas en la primera etapa sobre la acumulación de DHA. Con este propósito, cultivos de 2 y 5 días crecidos en MOC se lavaron y transfirieron a medio MBP con diferentes relaciones molares C:N (10:1 a 100:1, variando la concentración de acetato de amonio) y se incubaron durante 3 días. También se incluyó un “punto central” (cultivos inóculo de 3,5 días y MBP con C:N de 55:1) para el análisis estadístico. Los resultados (tabla 6.6) indicaron que la edad del inóculo no tuvo efecto estadístico sobre ninguna de las respuestas estudiadas, mientras que, tal como se esperaba, la relación C:N del medio de producción presentó un efecto significativo y positivo sobre producción de biomasa, lípidos y DHA. La máxima concentración de DHA, 7 g l^{-1} , se obtuvo para la relación C:N 55:1, que se seleccionó para el medio de producción (MP) empleado en los siguientes ensayos.

En los ensayos previos, para eliminar el efecto inhibitorio que podría causar el MOC sobre la producción de DHA, las células crecidas en este medio se centrifugaron y lavaron 3 veces con agua de mar estéril antes de transferir al mismo volumen de MP. Considerando que este procedimiento no sería el más conveniente para una fermentación a mayor escala, se investigaron los procedimientos alternativos de transferencia que se presentan en la tabla 6.7. El lavado de las células crecidas en MOC y centrifugadas previo a la resuspensión en el mismo volumen de MP (transferencia completa) no mostró diferencias significativas sobre ninguna de las respuestas estudiadas comparado con las células sin lavar, indicando que la remoción del medio MOC mediante centrifugación resultó suficiente para alcanzar altas concentraciones de DHA (c.a. 9.5 g l^{-1}). El otro procedimiento alternativo ensayado fue la dilución del cultivo inóculo en MP, sin aplicación de ningún tratamiento previo. Los resultados obtenidos mostraron que aunque esta transferencia parcial (10%) de células crecidas en MOC a MP resultó en niveles levemente menores de biomasa y DHA que la

transferencia completa (100%), la concentración de DHA fue igualmente alta (7.75 g l^{-1}). Considerando que este último procedimiento es mucho más económico y simple de implementar, fue seleccionado para los siguientes experimentos.

Las condiciones para el bioproceso en dos etapas establecidas en frasco agitado se ensayaron en un fermentador de tipo tanque agitado. Para ello, un cultivo de 350 ml crecido durante tres días en medio MOC se transfirió a un volumen de 3,5 l de MP en un biorreactor. La figura 6.7 muestra que la acumulación de biomasa y lípidos ocurrió a partir de las 24 h y hasta las 72 h de incubación, alcanzando valores de 51.95 y 35.4 g l^{-1} respectivamente, consumiéndose completamente la glucosa en dicho lapso. La concentración de DHA se incrementó hasta las 72 h y no se modificó hasta las 96 h, tiempo en que se concluyó el ensayo. No se registró un aumento significativo del número de células en el fermentador (datos no mostrados), por lo que la producción de peso seco y lípidos reflejarían un incremento en el contenido celular. Mediante la implementación este bioproceso en dos etapas, la productividad máxima de DHA en el fermentador fue de $3.7 \text{ g l}^{-1} \text{ d}^{-1}$.

6.5- Discusión

Si bien es sabido que la acumulación de lípidos en células eucariotas oleaginosas ocurre preferentemente bajo ciertas condiciones nutricionales como la deficiencia de nitrógeno (Anderson & Wynn 2001), los estudios de la cinética de crecimiento de la cepa *A. limacinum* SR21 bajo diferentes relaciones C:N mostraron claramente que en este organismo los requerimientos para el crecimiento y para la producción de lípidos fueron diferentes, ocurriendo este último proceso en fase estacionaria, la cual es en general alcanzada luego de 36-48 h. A partir de estos resultados fue posible proponer un bioproceso en dos etapas para maximizar la producción de DHA, manipulando principalmente la relación C:N del medio de cultivo: una primera fase (relación C:N baja) en la que las células se dividen activamente y una segunda fase (relación C:N alta), donde las células anteriores incrementan su tamaño (y peso seco) como consecuencia de la acumulación de lípidos. Partiendo de esta idea, se investigaron separadamente los factores que influenciaron estadísticamente ambos procesos. Cabe mencionar que la mayor parte de los trabajos disponibles en la literatura en los que se manipulan los niveles de nutrientes (principalmente C y N) y las condiciones de cultivo

(temperatura, pH y salinidad) con cepas de *Schizochytrium* y *Aurantiochytrium* para optimizar la producción de DHA (Iida et al. 1996, Yokochi et al. 1998, Bowles et al. 1999, Wu & Lin 2003, Perveen et al. 2006), el efecto de estas variables se evalúa sobre la acumulación del PUFA n-3 sin diferenciar su influencia sobre el crecimiento. Sin embargo, una reciente contribución de Chi y colaboradores (2009) señala que en biorreactores los niveles de oxígeno disuelto (DOC) tienen un efecto diferencial sobre la producción de biomasa y la de PUFAs, motivo por el cual los autores proponen una fermentación en dos etapas, similar al bioproceso aquí presentado, manipulando este parámetro.

Los resultados confirmaron que las concentraciones de las fuentes de C y N y su interacción son variables significativas estadísticamente tanto para la acumulación de biomasa como de lípidos, concluyendo que un medio con alta concentración de C y una relación C:N de al menos 50:1 es adecuada para obtener altas productividades de DHA. Por otro lado, el uso de CSL como fuente de N, un subproducto de la industria agrícola, permitió evitar la adición de vitaminas (YE) al medio de crecimiento (MOC), lo que se traduciría en una disminución de los costos de producción. Las condiciones fisicoquímicas ensayadas no tuvieron influencia significativa en la producción de biomasa, permitiendo trabajar con bajas concentraciones de sal de mar y un amplio rango de pH. Esto no es sorprendente si se tiene en cuenta que *A. limacinum* SR21 fue aislada de un ambiente estuarial, esto es, un bioma que experimenta amplias variaciones de temperatura, salinidad y en la concentración de diversas sustancias (Constanza et al. 1993).

La preparación del inóculo fue otra variable fundamental para la producción de DHA con la cepa SR21. Por un lado se encontró que el tamaño del inóculo tuvo un efecto significativo sobre la producción de biomasa. Por el otro, la inoculación directa en medio de producción de células que no fueron previamente propagadas en un medio de crecimiento produjo bajos pesos secos y concentraciones de lípidos (fig. 6.3). En contraste, se obtuvieron altas acumulaciones de lípidos inoculando MP con un 10% v/v de cultivos de tres días crecidos previamente en MOC. En este último caso se alcanzaron altos valores de DHA (11 g l^{-1}) en cortos períodos de tiempo (3 días), incrementando en consecuencia la productividad.

La metodología de los DOEs ha sido aplicada para optimizar la producción de DHA en otra cepa de *Schizochytrium* (S31) previamente (Wu & Lin 2003). Los diseños de selección y de optimización desarrollados en ese trabajo encontraron que las condiciones para maximizar la producción de DHA (0.516 g l^{-1}) fueron 27.98 g l^{-1} de glucosa, 4.52 g l^{-1} de YE, 24.82 g l^{-1} de NaCl, pH 6.96 y un período de incubación de 4 días. Si bien en este trabajo se ha estudiado el efecto de variables similares sobre la producción de biomasa en *A. limacinum* SR21 aplicando inicialmente diseños de selección, luego se utilizaron otras herramientas estadísticas alternativas para proseguir el análisis. Una vez validado el conjunto de datos obtenidos de los DOEs, se utilizaron ANN y modelos lineales y cuadráticos para ajustar los datos, obteniendo el mejor ajuste con las ANNs tal como era esperado (Soria et al 2004). La aplicación de este modelo permitió predecir muy precisamente las condiciones óptimas sin tener la necesidad de realizar nuevos experimentos de optimización, lo que permitió ahorrar esfuerzo y tiempo.

Estudios previos en frasco agitado realizados con *A. limacinum* SR21 alcanzaron máximas productividades de $0.84 \text{ g DHA l}^{-1} \text{ d}^{-1}$ (Yokochi et al.1998, tabla 6.1). Los resultados presentados demuestran que este valor puede triplicarse ($2.58 \text{ g DHA l}^{-1} \text{ d}^{-1}$) si la misma cepa es primero crecida en MOC y luego transferida a un volumen 10 veces mayor de MP. La validación de las condiciones optimizadas en frasco agitado en un biorreactor, resultó en una productividad máxima de $3.7 \text{ g DHA l}^{-1} \text{ d}^{-1}$, ligeramente superior a la obtenida por Yaguchi et al. (1997, $3.3 \text{ g DHA l}^{-1} \text{ d}^{-1}$) en fermentadores de 3 l de volumen de trabajo. Si bien es de amplio conocimiento que las productividades obtenidas en cultivo de frasco agitado pueden mejorarse en un biorreactor (Unagul et al. 2007), para ello es necesario conocer y manipular las variables significativas que operan en esta escala. Al respecto, pueden mencionarse los estudios a escala de laboratorio (1 l) de cultivos en lote alimentado de Ganuza et al. (2008), quienes demostraron que la implementación del sistema pH-auxostat utilizando NH_4OH resultó en una alta producción de biomasa (63 g l^{-1} , representando los FAs un 25%) de la cepa *Schizochytrium* sp G13/2S. Por su parte, los resultados de Jakobsen et al. (2008) en cultivos en lote (con un volumen de trabajo de 1.8 l) con la cepa *Aurantochytrium* sp T66 han reconocido al DOC, además del N y del P, como factores que deben mantenerse en condiciones limitantes para favorecer la producción de DHA. En este sentido, los resultados obtenidos resultan alentadores, ya que las productividades

alcanzadas podrían mejorarse investigando otros factores potencialmente importantes que operan en esta escala de producción, entre ellos, la disponibilidad de oxígeno o distintos esquemas de fermentación.

Los resultados aquí presentados constituyen una contribución más al conocimiento de la manipulación de las condiciones de cultivo para mejorar la producción de PUFAs n-3 utilizando traustequitiales. Tal como se señalara anteriormente, la relevancia de este tipo de estudios está directamente relacionada con la necesidad de disminuir los costos de producción para que estos microorganismos puedan competir comercialmente con la fuente tradicional de PUFAs n-3, el aceite de pescado, y ampliar sus aplicaciones a gran escala (Lewis et al. 1999). La comprensión de la relación entre la producción de biomasa y la acumulación de lípidos en la cepa *A. limacinum* SR21, que se desprende de los ensayos realizados, permitió plantear un bioproceso productivo en dos etapas, tal como fuera anteriormente propuesto para otros organismos oleaginosos como *C. cohnii* (Wynn et al. 2005). Con esta estrategia en dos fases, la reproducción celular y la acumulación de DHA pudieron ser optimizadas separadamente mejorando los resultados informados para experimentos en una sola fase. Este tipo de enfoque podría ser no solamente aplicado en procesos productivos de PUFAs n-3 sino también más ampliamente, en otros sistemas productores de SCO.

6.6- Conclusiones

A partir del reconocimiento de los diferentes requerimientos de *A. limacinum* SR21 para el crecimiento y para la producción de lípidos, se propuso un bioproceso en dos etapas para optimizar la producción de DHA. Se aplicó exitosamente y por primera vez para esta cepa (y para las traustequitiales también) una combinación de diseños experimentales estadísticos y de técnicas de análisis de datos no lineales (incluyendo Redes Neuronales Artificiales, Algoritmos Genéticos y Análisis Gráficos) como una herramienta efectiva para determinar las condiciones de cultivo óptimas para la primera etapa (de crecimiento). Las condiciones seleccionadas fueron: 8% m/v de glucosa, 12% v/v de macerado de maíz (CSL) y un tamaño de inóculo de 4×10^5 células ml^{-1} , bajo las que se obtuvo un valor de biomasa seca de $40,3 \text{ g l}^{-1}$ luego de 5 días de incubación. Este valor experimental no difirió significativamente del predicho por el modelo utilizado. Las condiciones en frasco agitado mejoradas para la segunda etapa (de producción de

DHA) fueron: tamaño de inóculo de 10% v/v obtenido en la primera etapa optimizada y relación molar C:N del medio de producción de 55:1. El escalado de la etapa de producción en un fermentador de 3,5 l permitió alcanzar una productividad de DHA de $3.7 \text{ g l}^{-1} \text{ d}^{-1}$. Los resultados presentados en este capítulo demuestran por primera vez que la productividad de DHA con la cepa *A. limacinum* SR21 puede mejorarse mediante la implementación de un bioproceso en dos etapas optimizado estadísticamente. La exploración futura de este tipo de estrategia de cultivo en una mayor escala se plantea entonces como una herramienta más para aumentar las productividades de PUFA n-3 y disminuir los costos de producción que podrían ampliar la utilización de las traustoguitriales a nivel comercial.

CAPITULO VII: CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

7.1- Prefacio

Las traustoguitriales son un grupo de organismos que ha sido muy poco estudiado, y por tal motivo la información sobre diversos aspectos de su biología es fragmentaria y escasa, a pesar de que han adquirido especial atención en los últimos años por su capacidad para producir y almacenar altas concentraciones de ácidos grasos omega 3. La mayor parte de las cepas estudiadas a la fecha han sido obtenidas mediante las técnicas de aislamiento tradicionales, y entonces representan solo una fracción de la biodiversidad existente. La identificación de nuevos aislamientos resulta muy difícil no sólo por la ausencia de caracteres confiables para el reconocimiento de las especies (y en algunos casos de los géneros) sino además por la pérdida de los materiales tipo de gran parte de los taxones del grupo, algunos de los cuales han sido muy pobremente descritos. La aplicación de herramientas bioquímicas y moleculares para la identificación de grupos monofiléticos dentro de los géneros tradicionales ha arrojado cierta luz sobre el asunto, a pesar de que aún quedan géneros por ser revisados, entre ellos *Thraustochytrium*.

En este complejo escenario, los estudios planteados en esta tesis contribuyen a aumentar la información disponible sobre estos microorganismos, abordando en forma integral diferentes aspectos de su biología. Adicionalmente este trabajo constituye el primer aporte al conocimiento de su biodiversidad en la Argentina. Bajo este enfoque holístico, la producción biotecnológica de ácidos grasos omega 3 también fue explorada.

7.2- Conclusiones

Se detallan a continuación las conclusiones más salientes que pudieron desprenderse de los estudios realizados.

- La presencia de traustoguitriales fue registrada en una amplia variedad de humedales salinos de la Argentina, que incluyeron el litoral marítimo bonaerense, patagónico y antártico, los estuarios de Punta Rasa, Mar Chiquita, Bahía Blanca y San Antonio Oeste,

y las lagunas salinas continentales La Salada y Vilama (altamente irradiada). Se encontró una mayor diversidad morfológica de estos microorganismos en ambientes con alta carga de materia orgánica, particularmente cangreiales o zonas costeras con acumulación de algas en descomposición.

- Se propone una metodología general para mejorar el éxito de aislamiento de traustquitriales de ambientes fríos y templados con requerimientos similares a los representantes locales. Entre las modificaciones sugeridas se incluye la utilización de una mayor variedad de cebos, la prolongación de los tiempos de incubación y la aplicación de antimicrobianos alternativos. La aplicación de esta metodología permitió acceder a nuevas cepas de traustquitriales de la Argentina, algunas de las cuales podrían ser “elusivas”.

- A partir de los estudios en cultivo en los que se comparó la efectividad de dos nuevos medios formulados (MC y TMPP) y otros de uso estándar (H, KMV, GPY y SSA) para sostener el crecimiento de los aislamientos patagónicos, se propone el medio MC como el más adecuado para aislar y el medio SSA como una segunda alternativa. Los medios “más concentrados” (TMPP y GPY) no mejoraron el crecimiento relativo de las cepas. El medio líquido MC también resultó el más adecuado para la obtención de biomasa en cultivos con agitación para la mayoría de las cepas.

- Los estudios en cultivo indicaron que la concentración de agar, o más probablemente las impurezas contenidas en él, estaría directamente relacionada con el agua disponible (a_w) y el porcentaje de humedad del medio, por lo que cuando se varió entre 1 y 3% m/v tuvo un efecto estadísticamente significativo sobre el crecimiento de las cepas ensayadas. Estos resultados sugieren que la concentración de agar de los medios de aislamiento no debería ser superior a 2% m/v.

- La adopción de los medios MC (y alternativamente SSA) así como de las otras modificaciones sugeridas para incrementar el éxito de aislamiento, permitió obtener cultivos de prácticamente todas las traustquitriales que se observaron en las muestras de los humedales salinos. De este modo se estableció un cepario con 63 representantes del grupo, disponible para propósitos científicos e industriales. Considerando que la

mayor parte de estas cepas ha sido caracterizada durante este trabajo, constituyen material de referencia para futuros estudios académicos.

- La morfología de las colonias fue constante en los diferentes medios agarizados ensayados y en general presentó correlación con los caracteres morfológicos en granos de polen así como con los perfiles de PUFAs. Los resultados demuestran no sólo la potencialidad de este atributo como un rasgo adicional para el reconocimiento de diferentes taxones sino que también avalan la propuesta de emplearlo como una herramienta simple y rápida para la caracterización preliminar de la diversidad de traustochytriales en una muestra. Esto fue particularmente útil al trabajar con un gran número de muestras durante las tareas de aislamiento.

- La mayor parte de las cepas locales requirió de condiciones de cultivo particulares para la obtención de biomasa. Solamente unas pocas pudieron prosperar en medio líquido con agitación rotacional moderada (100 rpm), mientras que otras requirieron de agitación aún más suave (horizontal, 100 rpm) y un grupo no mostró proliferación en cultivos líquidos. En general se propagaron sin dificultad a temperaturas de 25-28°C, aunque algunos aislamientos debieron ser incubados a menores temperaturas. El crecimiento limitado de las cepas planteó dos restricciones: por un lado, la imposibilidad de obtener la biomasa necesaria para las determinaciones analíticas de algunas de ellas, y por otro, descartó su aplicación como productoras de ácidos grasos omega 3. Sin embargo, la proliferación limitada probablemente sea un reflejo de sus diferencias genéticas y ecológicas respecto a otras cepas estudiadas, y esto las vuelve particularmente interesantes para otro tipo de estudios fisiológicos, ecológicos y evolutivos. De hecho, el agrupamiento de las cepas patagónicas en base al crecimiento en distintos medios sólidos se conservó al evaluar los caracteres bioquímicos y moleculares.

- La caracterización morfológica en cultivos en cebos y agua de mar de los aislamientos permitió identificar la presencia de representantes de los géneros tradicionales *Ulkenia* sensu lato, *Schizochytrium* sensu lato y *Thraustochytrium*. Aquellos que pudieron ser determinados a nivel específico se asignaron a *U. aff. radiata*, *U. aff. visurgensis*, *U. aff. minuta*, *T. aff. globosum*, *T. aff. striatum*, *T. aff. antarcticum*, *T. aff. kinnei*, *T. aff. aureum* y *S. aff. octosporum*. Las cepas de especies de *Schizochytrium* sin identificar

podieron dividirse en dos grupos: aquellas que mostraron similitudes con *S. aggregatum* y otras que presentaron células vegetativas muy pequeñas (menores a 5 µm) y requerimientos particulares para su cultivo.

- Los taxones más frecuentemente hallados variaron según el tipo de humedal del cual proviniera el material analizado. En general, en aquellos ambientes sometidos a condiciones climáticas más extremas, como el litoral marítimo antártico o la laguna Vilama predominaron los representantes de *Schizochytrium*, mientras que en las aguas más calmas, como la albufera Mar Chiquita o la laguna La Salada *U. aff. visurgensis* fue dominante. En los humedales patagónicos, *T. aff. striatum* resultó la especie de mayor distribución para los estuarios y *T. aff. kinnei* para el litoral marítimo.

- Los análisis de filogenia molecular basados en la secuencia del gen ARNr 18S fueron útiles para reconocer grupos monofiléticos de traustochytriales que incluyeran a las cepas locales. En este sentido, constituyeron un marco de referencia para la comparación de la validez de otro tipo de caracteres (bioquímicos, nutricionales y morfológicos) con fines sistemáticos. Sin embargo, no aportaron elementos para resolver relaciones filogenéticas en el nivel específico, mostrando en algunos casos también limitaciones en el nivel genérico.

- Por su parte, los perfiles de PUFA permitieron reconocer no solamente los taxones determinados en base a los rasgos morfológicos y al análisis filogenético, sino también individualizar aquellas cepas que mostraron distintos tipos de colonia y requerimientos de cultivo a pesar de que habían sido asignadas a un mismo taxón. También fueron útiles para distinguir subgrupos morfológicos no resueltos en los árboles filogenéticos. Si bien los resultados demuestran que este carácter bioquímico (con base multigénica) puede ser incluso más informativo que la secuencia de un único gen, su valor diagnóstico probablemente se vea alterado por las condiciones de cultivo que se utilicen para la obtención de la biomasa a analizar, y en tal sentido, deberían ser estrictamente establecidas.

- La integración de los caracteres morfológicos, bioquímicos y moleculares según los criterios establecidos por Yokoyama y colaboradores (2007) y Yokoyama & Honda (2007) permitió la reasignación de las cepas locales del género tradicional *Ulkenia*

sensu lato a *Ulkenia* sensu stricto y a los nuevos géneros *Parietichytrium* y *Sicyoidochytrium*, y la de los aislamientos del género tradicional *Schizochytrium* sensu lato a *Schizochytrium* sensu stricto y los nuevos géneros *Aurantiochytrium* y *Oblongichytrium*. El análisis de los resultados cuestionó la validez del género *Botryochytrium* y a su vez demostró la existencia de subclados dentro de *Ulkenia* sensu stricto. En este sentido, los criterios propuestos por los autores resultaron adecuados para diferenciar clados dentro de *Schizochytrium* sensu lato pero se encontraron inconsistencias dentro de *Ulkenia* sensu lato. En lo concerniente al género *Thraustochytrium*, estas herramientas permitieron reconocer algunos grupos monofiléticos (como *T. striatum* y *T. kinnei*).

- La comparación de los diferentes caracteres empleados con fines clasificatorios indicó que algunos de los atributos morfológicos serían confiables (como las divisiones vegetativas o los tipos de colonia en medio sólido) mientras que otros no (por ejemplo la movilidad de las zoosporas al momento de ser liberadas o la regularidad en el clivaje del protoplasto ameboidal en *Ulkenia* sensu stricto). Otros rasgos mencionados en la literatura que no han sido de utilidad en el reconocimiento de taxones fueron el sistema rizoidal (en general poco desarrollado, excepto en algunas cepas) así como la presencia de gránulos en las zoosporas (pareciera ser común en las traustoquitriales, pero no se reconocieron fácilmente al microscopio óptico, aunque si al electrónico). Otros atributos relacionados con los esporangios y las zoosporas se conservaron en miembros de un mismo grupo monofilético (como la vacuola central en *T. striatum*, el fundamento basal rodeado de pared persistente en *T. kinnei*, o las zoosporas con un corto flagelo posterior en AA3 y AA5) y en este sentido serían adecuados para el reconocimiento de ciertos taxones.

- En los aspectos generales acerca sobre los labirintulomicetes, se observó, básicamente a partir de los estudios de filogenia molecular, una tendencia evolutiva que habría llevado desde formas de vida cuya proliferación se basaba principalmente en la división vegetativa (y eventualmente la zoosporulación), hacia una predominancia (llegando hasta la exclusividad) de la zoosporulación como mecanismo de reproducción e invasión de los ambientes y sustratos en que esos organismos prosperan.

- Los resultados obtenidos sugieren que algunas de las cepas locales podrían ser nuevas especies de *Ulkenia* sensu stricto, *Schizochytrium*, *Oblongichytrium* y *Aurantiochytrium*. En este sentido, esta tesis muestra evidencias de que existiría una diversidad oculta y que son necesarios muestreos intensivos de diferentes hábitats y regiones del planeta, para poblar algunos de los clados que parecen corresponder a nuevos taxones y tomar decisiones taxonómicas. En una visión general, puede afirmarse que en el estado actual del conocimiento de la biodiversidad de las traustochytriales, es más útil hacer una caracterización ajustada de los aislamientos (como fue intención de este trabajo), conservarlos en cultivo (esto es crucial) para estudios futuros con nuevas técnicas y/o criterios taxonómicos que eventualmente se desarrollen, antes que asignarlos a un taxón particular o presentarlos como nuevas entidades para la ciencia, lo cual resulta por el momento, riesgoso.

- El estudio de la morfología celular a nivel ultraestructural de cepas identificadas como representantes de los taxones más abundantes permitieron reconocer los rasgos diagnósticos de las traustochytriales. También fue de utilidad para obtener un mayor detalle sobre la formación de estructuras reproductivas y otros aspectos del ciclo de vida previamente observados al microscopio óptico. El fuerte valor taxonómico de estos rasgos plantea la potencialidad del empleo de la ultraestructura para el estudio sistemático de las traustochytriales. Entre las particularidades encontradas en los especímenes examinados pueden mencionarse la ubicua presencia de vacuolas conteniendo escamas de pared y el hallazgo de partículas virales (probablemente de la familia Phycodnaviridae) en el fundamento basal de una cepa de *T. aff. kinnei*.

- Se logró optimizar la producción de DHA con la cepa *Aurantiochytrium limacinum* SR21 mediante un bioproceso en dos etapas. Se aplicó exitosamente y por primera vez para esta cepa (y para las traustochytriales también) una combinación de diseños experimentales estadísticos y de técnicas de análisis de datos no lineales (incluyendo Redes Neuronales Artificiales, Algoritmos Genéticos y Análisis Gráficos) como una herramienta efectiva para determinar las condiciones de cultivo óptimas para la primera etapa de crecimiento.

- El escalado de la etapa de producción en un fermentador de 3,5 l permitió alcanzar una productividad de DHA de $3.7 \text{ g l}^{-1} \text{ d}^{-1}$. Los resultados presentados demuestran por

primera vez que la productividad de DHA con la cepa *A. limacinum* SR21 puede mejorarse mediante la implementación de un bioproceso en dos etapas optimizado estadísticamente.

7.3- Perspectivas

La información obtenida en este trabajo de tesis amplía el conocimiento biológico básico y aplicado de las traustogitriales y plantea la posibilidad de estudiar nuevos aspectos aún no explorados. Se proponen a continuación algunos estudios complementarios que permitirían extender y completar los resultados hasta aquí discutidos.

- Realizar estudios comparativos de aislamiento que permitan evaluar las metodologías aquí mejoradas, así como explorar el diseño de nuevos medios de cultivo. La gran afinidad de algunas cepas de traustogitriales por los crustáceos plantea la potencialidad de incluir quitina (o N-acetil-glucosamina) como componente de los mismos. También resultaría de interés evaluar la adición de vitaminas del grupo B (hidrosolubles).

- Explorar la presencia de traustogitriales en otros humedales salinos, particularmente aquellos más cálidos, y en los que haya alta cantidad de materia orgánica como ocurre en los cangrejales. El estudio de las lagunas salinas también puede resultar particularmente interesante debido al alto grado de endemismo de estos ambientes y a la escasa información que se tiene de ellos.

- Mejorar las condiciones de cultivo de aquellas cepas que aún permanecen sin caracterizar bioquímica y molecularmente debido a la imposibilidad de obtener la biomasa necesaria. Completar la diagnosis de aquellas cepas locales que se presumen como nuevas especies, particularmente a partir de la realización de estudios de filogenia molecular con mayor poder de resolución.

- Mejorar la resolución de los estudios de filogenia molecular empleando otros genes además del que codifica el ARNr 18S. Ampliar también la cantidad de traustogitriales estudiadas, a partir del aislamiento de representantes de una amplia variedad de hábitats, con el fin de poblar los clados con pocos representantes. Establecer cultivos de los

materiales tipos (siendo de especial interés *T. proliferum*) que permitan la toma de decisiones taxonómicas. A partir de estas mejoras, continuar con el delineamiento de grupos monofiléticos dentro de los géneros *Ulkenia* sensu lato y *Thraustochytrium*, y verificar la validez de los géneros *Japonochytrium* y *Althornia*.

- La disponibilidad de un gran número de aislamientos de traustochytriales que representen la biodiversidad existente y el hallazgo de sus condiciones de cultivo para la obtención de biomasa abrirían también la puerta a la exploración del uso de caracteres ultraestructurales con fines taxonómicos en este grupo de microorganismos. También resultaría interesante estudiar las variaciones ultraestructurales bajo diferentes condiciones nutricionales, de modo de establecer aquellos rasgos constantes.

- Estandarizar las condiciones para aplicar criterios fisiológicos y la morfología de la colonia en la caracterización de nuevos aislamientos de traustochytriales, como es de amplia difusión en otros grupos de organismos.

- Continuar con la búsqueda de cepas locales que presenten mayores velocidades específicas de crecimiento de modo de poder evaluar su utilización con fines biotecnológicos. Una vez halladas, aplicar las metodologías estadísticas empleadas en la optimización de la obtención de PUFAs omega 3 con la cepa *A. limacinum* SR21.

- Para cada una de las dos etapas del bioproceso propuesto para la producción de DHA con *A. limacinum* SR21, estudiar la cinética de crecimiento utilizando los esquemas de fermentación de lote, lote alimentado (fed-batch) y eventualmente continuo, a fin de seleccionar aquel que resulte más adecuado para la producción de biomasa (en la primer etapa) y de DHA (en la segunda).

- Seleccionar en biorreactores las variables independientes de cultivo del bioproceso en dos etapas que mayor incidencia tengan en la productividad de DHA (g de DHA producidos $l^{-1} h^{-1}$) aplicando la metodología de los DOEs. Entre los parámetros que sería interesante estudiar pueden mencionarse el oxígeno disuelto y el tiempo de cosecha para ambas fases, el volumen y procesamiento del cultivo obtenido en la primer etapa y transferido como inóculo para la segunda, así como otros parámetros propios del

esquema de fermentación elegido (flujo de alimentación, por ejemplo, en el caso de cultivos tipo lote alimentado y continuo).

Silvina M. Rosa

Miguel A. Galvagno

Carlos G. Vélez

TABLAS

Tabla 1.1- Principales componentes de la sal de mar

Componente	Concentración (g l ⁻¹)
NaCl	23,985
MgCl ₂	5,029
Na ₂ SO ₄	4,011
CaCl ₂	1,141
KCl	0,699
KHCO ₃	0,172
KBr	0,100
B(OH) ₃	0,025
SrCl ₂	0,014
NaF	0,003
Total	35,179

Tabla 1.2- Nomenclatura de los PUFAs omega 3 y 6 más comunes

Nombre común	Nombre sistemático	Designación numérica
Familia omega 6 (n-6)		
Linoleico (LA)	<i>cis</i> -9,12-octadecadienoico	18:2 (n-6)
γ-linolénico (GLA)	<i>cis</i> -6,9,12-octadecatrienoico	18:3 (n-6)
dihomo-γ-linolénico (ETA)	<i>cis</i> -8,11,14-eicosatrienoico	20:3 (n-6)
Araquidónico (ARA)	<i>cis</i> -5,8,11,14-eicosatetraenoico	20:4 (n-6)
Docosatetraenoico (DTA)	<i>cis</i> -7,10,13,16-docosatetraenoico	22:4 (n-6)
Docosapentaenoico n-6 (DPA n-6)	<i>cis</i> -4,7,10,13,16-docosapentaenoico	22:5 (n-6)
Familia omega 3 (n-3)		
α-linolénico (ALA)	<i>cis</i> -9,12,15-octadecatrienoico	18:3 (n-3)
Estearidónico	<i>cis</i> -6,9,12,15-octadecatetraenoico	18:4 (n-3)
Eicosatrienoico n-3	<i>cis</i> -11,14,17-eicosatrienoico	20:3 (n-3)
Eicosatetraenoico	<i>cis</i> -8,11,14,17-eicosatetraenoico	20:4 (n-3)
Eicosapentaenoico (EPA)	<i>cis</i> -5,8,11,14,17-eicosapentaenoico	20:5 (n-3)
Docosapentaenoico n-3 (DPA n-3)	<i>cis</i> -7,10,13,16,19-docosapentaenoico	22:5 (n-3)
Docosahexaenoico (DHA)	<i>cis</i> -4,7,10,13,16,19-docosahexaenoico	22:6 (n-3)

Basado en Dupont et al. 1996.

Tabla 2.1- Recetas de los medios de cultivo utilizados para el aislamiento de traustoguitrales

Componentes	Composición del medio (% m/v)					
	GPY ²	H ²	KMV ³	SSA ³	MC ⁴	TMPP ⁴
D-Glucosa	2,00	0,20	0,10	-	0,20	0,10
Peptona	1,00	-	0,01	-	0,10	0,05
Extracto de levadura	0,50	0,02	0,01	-	0,10	0,05
Glutamato monosódico	-	0,05	-	-	0,10	0,05
Hidrolizado de gelatina	-	-	0,10	-	0,20	0,10
Macerado de maíz ¹	-	-	-	-	0,10	0,05
Sal de mar artificial	1,75	1,75	1,75	1,75	1,75	1,75
Suero de caballo ¹	-	-	-	1,00	-	-
Extracto de Caldo Cerebro Corazón	-	-	-	-	-	1,75
Agar	2,00	2,00	1,20	1,20	2,00	2,00

¹ Concentración expresada en % v/v. ² Medios utilizado para *A. limacinum* SR21 (Honda et al. 1998). ³ Medios de uso frecuente para traustoguitrales (Porter 1990). ⁴ Medios propuestos en este capítulo.

Tabla 2.2- Descripción de los sitios y fechas en que se obtuvieron las muestras

Recolección	Fecha	Sitio				Cantidad de muestras y observaciones
		Provincia	Zona	Ambiente	Coordenadas ¹	
I	04/04	Buenos Aires	Punta Rasa	a. Marisma	36°17'57''S; 56°46'31''O	5
				b. Pequeña laguna pluvial aledaña	36°18'03''S; 56°45'58''O	2
II	06/04	Buenos Aires	Laguna La Salada	Laguna salina continental	39°27' S; 62°41' O	1, <i>leg.</i> F. Font
III	03/05	Antártida Arg.	Caleta Potter	Litoral marítimo	62°14' S; 58°39' O	2, <i>leg.</i> G. Mataloni
IV	06/05	Buenos Aires	Albufera Mar Chiquita	a. Arroyo Vivorata	37°44'18''S; 57°26'10''O	5
				b. Arroyo Cangrejos	37°44'38''S; 57°25'51''O	2
				c. Litoral marítimo	37°45'01''S; 57°25'21''O	4
				d. Marisma	37°44'29''S; 57°25'19''O	20
				e. Albufera	37°43'05''S; 57°25'46''O	10
				f. Cangrejal aledaño	37°44'41''S; 57°25'11''O	1
V	05/06	Río Negro	Las Grutas	Litoral marítimo	40°49' S; 65°05' O	1, <i>leg.</i> T. Wenzel
VI	12/06	Chubut	Comodoro Rivadavia y alrededores	a. Laguna salina Rada Tilly	45°55'35''S; 67°34'15''O	2
				b. Litoral marítimo de Rada Tilly	45°56'35''S; 67°33'19''O	3
				c. Arroyo La Mata	45°54'11''S; 67°36'38''O	1
				d. Litoral marítimo C. Rivadavia	45°50'32''S; 67°28'07''O	4
				e. Litoral marítimo de C. Córdova	45°44'21''S; 67°22'39''O	2
				f. Laguna salina de TERMAP	45°44'39''S; 67°22'48''O	1
VII	12/06	Chubut	Puerto Madryn	a. Litoral marítimo de la ciudad	42°45'53''S; 65°01'57''O	1
				b. Litoral marítimo Punta Indio	42°46'48''S; 64°59'59''O	4
				c. Litoral marítimo Punta Este	42°47'07''S; 64°57'25''O	3
VIII	12/06	Chubut	Puerto Pirámides	Litoral marítimo	42°34'24''S; 64°17'02''O	7
IX	12/06	Río Negro	San Antonio Oeste	Marisma	40°43'34''S; 64°56'41''O	4
X	12/06	Río Negro	Las Grutas	Litoral marítimo	40°49'16''S; 65°05'48''O	3
XI	12/06	Buenos Aires	Bahía Blanca	Litoral marítimo de Ing. White	38°47'00''S; 62°16'15''O	2
XII	12/06	Buenos Aires	Laguna La Salada	Laguna salina continental	39°27'51''S; 62°41'18''O	6
XIII	01/07	Tierra del Fuego	Bahía de la Ea. Tunel	Litoral marítimo	54°49' S; 68°08' O	1, <i>leg.</i> E. Barrantes
XIV	07/08	Jujuy	Laguna Vilama	Laguna continental	22°30' S; 66°50' O	1, <i>leg.</i> E. Farias
XV	07/08	Buenos Aires	Bahía Blanca	Marisma de Puerto Rosales	38°53' S; 62°04' O	1, <i>leg.</i> N. Pizani
XVI	01/09	Santa Cruz	Puerto San Julián	Litoral marítimo	49°17' S; 67°42' O	1, <i>leg.</i> L. Ianonne
XVII	01/09	Santa Cruz	Puerto Deseado	Litoral marítimo	47°45' S; 65°53' O	1, <i>leg.</i> L. Ianonne

¹ Los datos de GPS para el caso de las muestras legadas (*leg.*) son aproximados

Tabla 2.3- Cepas, procedencia y medio de aislamiento

BAFC cult. ¹	Cepa ²	Procedencia			Medio de aislamiento
		Sitio ³	Ambiente	Material ⁵	
3109	SB4A	Ia	Cangrejal	Detritus, sedim.	GPY
3110	SB6B	Ia	Cangrejal	Restos vegetales, sedim.	GPY
3111	SB1D	Ib	Margen de laguna pluvial	Fragm. vegetales sumerg.	GPY
3112	LSA1	II	Laguna salina	Fragm. algas carofíceas	GPY
3113	LSA3	II	Laguna salina	Fragm. algas carofíceas	GPY
3481	S1	VIa	Laguna salina pequeña	Restos vegetales, sedim.	SSA
3482	S2sp	VIe	Litoral marítimo, pleamar	Fragm. algas sumerg., sedim.	MC
3483	S2rc	VIe	Litoral marítimo, pleamar	Fragm. algas sumerg., sedim.	MC
3484	S3	VIa	Laguna salina próxima a planta de tratamiento de agua	Fragm. <i>Salicornia</i> y algas, sedim.	TMPP
3485	S6	VIb	Intermareal rocoso	Fragm. algas y crustáceos	MC
3486	S7	VIc	Arroyo salino	Fragm. vegetales y algas clorofitas, sedim.	SSA
3487	S8 ⁴	VI f	Laguna salina artificial prácticamente seca	Fragm. vegetales, alquitrán, sedim.	Cebo(polén)
3488	S12	VI d	Supralitoral, zona de deposición	Fragm. algas, alquitrán, sedim.	MC
3489	S13	VII c	Intermareal rocoso, próximo a la zona sumergida	Fragm. algas, sedim.	TMPP
3490	S14	VII c	Intermareal rocoso próximo a la zona de salpicadura	Fragm. algas, sedim.	MC
3491	S19T	VIII	Frente de marea	Abundantes restos de algas	SSA
3492	S19 Sch	VIII	Frente de marea	Abundantes restos de algas	SSA
3493	S26-1	VIII	Poza marea, playa arenosa	Fragm. algas, sedim.	SSA
3494	S26A	VIII	Poza marea, playa arenosa	Fragm. algas, sedim.	TMPP
3495	S26B	VIII	Poza marea, playa arenosa	Fragm. algas, sedim.	TMPP
3496	S27 ⁴	VIII	Gran piletón rocoso en intermareal	Fragm. algas, sedim.	MC
3497	S29	VII b	Intermareal rocoso	Fragm. algas, sedim.	MC
3498	S32	IX	Marisma (zona recreación)	Fragm. algas, sedim.	MC
3499	S33A	IX	Cangrejal	Fragm. algas, sedim.	MC
3500	S33C	IX	Cangrejal	Fragm. algas, sedim.	MC
3501	S34sp	IX	Área externa del cangrejal con parches de <i>Salicornia</i>	Fragm. <i>Salicornia</i> , algas y crustáceos, sedim.	MC
3502	S34r	IX	Área externa del cangrejal con parches de <i>Salicornia</i>	Fragm. <i>Salicornia</i> , algas y crustáceos, sedim.	MC
3503	S41b	X	Intermareal rocoso	Fragm. algas, sedim.	TMPP
3504	S41sp	X	Intermareal rocoso	Fragm. algas, sedim.	SSA
3505	LGII	V	Intermareal rocoso	Fragm. algas	SSA
3506	S50sp	XI	Cangrejal con aporte de efluentes domiciliarios e industriales	Restos algas y animales, barro orgánico	MC
3507	S50B	XI	Cangrejal con aporte de efluentes domiciliarios e industriales	Restos algas y animales, barro orgánico	TMPP
3508	S50Sch ⁴	XI	Cangrejal con aporte de efluentes domiciliarios e industriales	Restos algas y animales, barro orgánico	Cebo (polén)
3509	TF	XIII	Litoral marítimo	Fragm. algas	TMPP
3510	S44	XII	Margen de laguna salina con vegetación sumergida	Fragm. vegetales (raíces sumergidas, hojas flotando)	MC
3511	S48cmc	XII	Margen de laguna salina con depósito de algas	Restos algas, bioderma, fragm. vegetales, sedim.	MC

Tabla 2.3- Cepas, procedencia y medio de aislamiento (continuación)

BAFC cult. ¹	Cepa ²	Procedencia			Medio de aislamiento
		Sitio ³	Ambiente	Material ⁵	
3512	S48T	XII	Margen de laguna salina con depósito de algas	Restos algas, bioderma, fragm. vegetales, sedim.	SSA
3513	S48Sch	XII	Margen de laguna salina con depósito de algas	Restos algas, bioderma, fragm. vegetales, sedim.	SSA
3514	S49cmc	XII	Fondo de laguna salina a 10 m del margen	Fragm. algas clorofitas y vegetales	MC
3515	S49sp	XII	Fondo de laguna salina a 10 m del margen	Fragm. algas clorofitas y vegetales	MC
3516	LSB	II	Laguna salina	Fragm. algas carofíceas	GPY
3517	A11	III	Litoral marítimo	Fragm. algas y crustáceos	Cebo(<i>Artemia</i>)
3518	AA1	III	Litoral marítimo	Fragm. algas y crustáceos	Cebo(<i>Artemia</i>)
3519	AA3	III	Litoral marítimo	Fragm. algas y crustáceos	Cebo(<i>Artemia</i>)
3520	AA5	III	Litoral marítimo	Fragm. algas y crustáceos	Cebo(<i>Artemia</i>)
3521	MC46B	IVd	Margen fangoso de marisma	Fragm. <i>Dictyota</i> , sedim.	MC
3522	MC7D	IVe	Margen de albufera	Restos y detritus vegetales	MC
3523	MC4B	IVa	Margen de arroyo salino	Fragm. <i>Spartina</i>	MC
3524	MC11F	IVe	Margen de albufera	Fragm. <i>Rhodomenia</i> y briozoos	MC
3525	MC15A	IVe	Margen de albufera y límite del CELPA	Fragm. vegetales en alambrado	MC
3526	MC18A	IVb	Margen de arroyo salino, adyacente a puente	Fragm. vegetales	MC
3527	MC26A	IVd	Margen fangoso de marisma	Fragm. <i>Enteromorpha</i> en red	MC
3528	MC28C	IVd	Margen fangoso de marisma	Fragm. huevo de caracol	MC
3529	MC34A	IVd	Margen fangoso de marisma	Detritus	MC
3530	MC47D	IVd	Cangrejal interno, marisma	Fragm. briozoos	MC
3531	MC48B	IVd	Cangrejal interno, marisma	Restos vegetales, sedim.	MC
3540	SCI	XVI	Litoral marítimo	Fragm. algas	MC
3541	SCII	XVI	Litoral marítimo	Fragm. algas	MC
3542	SCIII	XVI	Litoral marítimo	Fragm. algas	SSA
3543	SCIV	XVI	Litoral marítimo	Fragm. algas	MC
3544	SCV	XVII	Litoral marítimo	Fragm. algas	MC
3545	B5	XV	Marisma	Fragm. <i>Spartina</i> , bioderma	SSA
3546	J	XIV	Laguna salina de altura	Sedim.	SSA

¹ Número de acceso de la Colección de Cultivos de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (BAFCcult.), UBA.

² El nombre interno con el que las cepas fueron designadas consiste en una inicial que indica la recolección de la cual provinieron los materiales originales seguido de un número que hace alusión al número de muestra correspondiente.

³ Ver tabla 2.2.

⁴ Cepas discontinuadas.

⁵ Fragm., fragmentos de; sedim., sedimentos; sumerg., sumergido/a/s

Tabla 2.4- Agrupación de los aislamientos en base a al sitio de origen (y/o campaña de recolección) y las características morfológicas de las colonias

Cepa	Sitio ¹	Características de las colonias	
		Color, elevación, superficie, patrón celular ²	Código ³
SB4A	Ia	c, e, h+, ht (ms)	1
SB6B	Ia	r, e, s, ht (ms)	2
SB1D	Ib	r, e, s, ht (ms)	2
LSA1, LSA3, LSB	II	r, e, s, ht (ms)	2
AA1, A11	III	b, c, s, cp	1
AA3, AA5	III	r, c, s, cm (red ectoplasm. prominente)	2
MC2A, MC2B	IVa	n, c, h, ht (ms)	1
MC2E, MC2H	IVa	c-a, pu, s, cm (mr)	2
MC3D, MC3F, MC3H	IVa	r-n, e, h, ht (ms)	1
MC4A, MC4B, MC4C, MC4D	IVa	n, c, h, ht (ms)	1
MC5A, MC5B	IVa	n, c, h, ht (ms)	1
MC5C	IVa	b, c, h+, cm	3
MC6B, MC6C, MC6F	IVe	n, c, h, ht (ms)	1
MC6H, MC6L	IVe	c-a, pu, s, cm (mr)	2
MC7A, MC7B, MC7D	IVe	n, c, h, ht (ms)	1
MC8A, MC8B, MC8C, MC8D, MC8E	IVe	n-a, c, h+, ht (ms)	4
MC9B	IVe	c, pu, h, ht (ms)	5
MC10A, MC10B	IVe	n, e, h, ht (ms)	1
MC11E, MC11F, MC11H	IVe	n, c, h, ht (ms)	1
MC12C, MC12E, MC12A1	IVe	c, pu, s, cm (mr)	2
MC12A2	IVe	n-a, c, h, cg (mj)	6
MC13B	IVe	n, c, h, ht (ms)	1
MC15A	IVe	c, c, s, cm	7
MC16B, MC16I, MC16R, MC16S	IVc	n, pu, s, ht (ms)	8
MC17A, MC17B, MC17C, MC17E	IVc	n, c-pu, s, ht (ms)	8
MC18A, MC18B, MC18C, MC18D	IVb	n-a, c, h+, ht (ms)	4
MC21D, MC21F	IVf	c-a, pu, s, ht (ms)	2
MC26A, MC26D, MC26E, MC26F	IVd	n, c, h+, ht (ms)	4
MC28B, MC28C, MC28D	IVd	n-a, c, h+, ht (ms)	4
MC32B, MC32C	IVd	b, e, s, cp-cg	9
MC33A, MC33B, MC33C, MC33D	IVd	no pudo evaluarse	-
MC34A, MC34E, MC34F	IVd	n, e-c, h, ht (ms)	1
MC44A	IVd	a-n, p, h, ht (ms)	1
MC45E	IVd	n-r, c, h, ht (ms)	1
MC46A, MC46A2, MC46B2	IVd	n, p, h, ht (ms)	1
MC46B	IVd	h, e, h, cp (ps)	10
MC47B, MC47C, MC47D, MC47E	IVd	n, e, h, ht (ms)	1
MC48A, MC48B	IVd	n, c, h, ht (ms)	1
MC50A, MC50G, MC50B2, MC50D2, MC50E2, MC50H2, MC50I2*, MC50F2	IVd	c-a, pu, h, cm (mr)	2
S1	VIa	b, pl, s, cm (punteada)	1
S2sp	VIe	r-a, c, s, cg	2
S2rc	VIe	r, c, s, cmg	3
S3	VIa	r-a, c, s, ht (ms)	4
S6	VIb	b, pu, s, cp	5
S7	VIc	r, c, s, cm	6
S12	VIId	c, pl, s, cm	7
S13	VIIc	b, pu, s, cm	8
S14	VIIc	b, pu, s, cp-m	9
S19T	VIII	r-a, c, s, cm	10
S19 Sch	VIII	b, pl, s, cp (punteada)	11
S26-1	VIII	h, e, h, ht (ms)	12
S26A, S26B	VIII	b-c, pu, s, cm	13
S27	VIII	r-a, e, h+, cm	14

Tabla 2.4- Agrupación de los aislamientos en base a al sitio de origen (y/o campaña de recolección) y las características morfológicas de las colonias (continuación)

Cepa	Sitio ¹	Características de las colonias	
		Color, elevación, superficie, patrón celular ²	Código ³
S29	VIIb	b, pu, s, cm	8
S32, S34sp	IX	r-a, c, s, cg	2
S33A	IX	r, c, s, cmg	3
S33C	IX	h, e, s, cp	15
S34r	IX	c-a, pu, s, cm (red ectoplasm. prominente)	16
S41b	X	b, pu, s, cm	8
S41sp	X	h, e, h, ht (ms)	12
LGII	V	h-b, e, h, cp	17
S50sp	XI	r-a, c, s, cg	2
S50B	XI	b, pu, s, cm	8
S44, S48cmc, S49cmc	XII	c-a, pu, s, cm (aspecto “cerebroide”)	18
S48T	XII	r, c, h, ht (ms)	19
S48Sch	XII	h, pl, s, cp	20
S49sp	XII	r, c, s, cg	21
TF	XIII	b, c-pu, s, cm	8
J	XIV	c, e, s, cp	1
B5	XV	c, e, s, cm	1
SCI-SCII	XVI	r, e, s, ht (ms)	1
SCIII	XVI	c, e, s, cp	2
SCIV	XVI	c, pl, s, cmg	3
SCV	XVII	r, e-pl, s, ht (ms)	1

¹ Ver tabla 2.2

² Características de las colonias que permiten diferenciar los aislamientos. Se indican a continuación los rasgos observados en orden: Color: h, hialino; b, blanco; c, crema; a, amarillo; n, naranja; r, rosa. Elevación: pl, plana; e, elevada; c, convexa; pu, pulvinada. Superficie: h+, muy húmeda; h, húmeda; s, seca. Tamaño de las células de la colonia: cp, células pequeñas; cm, células medianas; cgr, células grandes; cmg, células muy grandes; ht, células con tamaño heterogéneo. Los patrones celulares particulares (indicados entre paréntesis) se muestran en la fig. 2.3: ms, “mosaico”; mr, mórula; my, mayólica; ps, paquetes sarcinoides.

³ Código numérico que permite identificar a las cepas con colonias de características similares para una misma campaña de recolección, separada de otras campañas por la línea punteada.

Tabla 2.5- Crecimiento comparativo de las cepas patagónicas y la cepa SR21 en diferentes medios de cultivo

Cepa	Valor de Crecimiento Relativo (VCR)						Media del VCR de la cepa
	GPY	H	KMV	SSA	MC	TMPP	
S1	1	1	2	2	1	1	1,33
S2sp	2	2	2	2	4	3	2,50
S2rc	1	2	2	2	3	3	2,17
S3	2	2	3	2	4	4	2,83
S6	4	3	2	2	3	4	3,00
S7	1	2	3	2	3	3	2,33
S12	4	3	3	2	3	3	3,00
S13	4	3	2	2	3	4	3,00
S14	2	3	2	2	4	4	2,83
S19T	1	2	2	2	3	3	2,17
S19 Sch	0	1	2	2	1	0	1,00
S26-1	1	3	3	2	1	1	1,83
S26B	3	2	2	2	3	4	2,67
S29	3	2	2	2	3	4	2,67
S33A	1	3	2	2	3	2	2,17
S33C	1	1	2	2	1	2	1,50
S34sp	1	3	2	2	3	2	2,17
S34r	4	3	3	2	4	3	3,17
S41b	3	2	2	2	3	4	2,67
S41sp	1	2	3	2	1	1	1,67
LGII	0	1	2	2	0	1	1,00
S50sp	1	3	3	2	3	3	2,50
TF	1	2	3	2	3	4	2,50
S44	4	3	3	2	4	4	3,33
S48T	1	3	3	2	3	1	2,17
S48Sch	0	0	1	2	0	1	0,67
S49sp	1	2	3	2	2	2	2,00
SR21	4	4	4	2	4	4	3,67
Media de los VCRs de las cepas para cada medio	1,86	2,25	2,43	2,00	2,61	2,68	
Eficiencia para Cultivo (%)	42.8	82.1	96.4	100	75.0	75.0	

El sombreado separa a los grupos de cepas en base a su crecimiento en medio sólido: gris claro, Grupo 1 (VCRs menores o iguales a 2 en todos los medios ensayados); blanco, Grupo 2 (VCRs bajos en GPY, intermedios en KMV, H y SSA y elevados en MC y TMPP); gris oscuro, Grupo 3 (VCRs elevados en todos los medios ensayados). La Eficiencia para Cultivo de cada medio se estimó como el porcentaje de cepas que registraron VCRs ≥ 2 en él.

Tabla 2.6- Crecimiento relativo (VCR) de diez cepas patagónicas en medios de cultivo con diferentes porcentajes de agar

Cepa	Medio de cultivo											
	H			SSA			MC			TMPP		
	Agar (% m/v)			Agar (% m/v)			Agar (% m/v)			Agar (% m/v)		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
S3	1	1	1	2	2	2	3	3	3	3	3	3
S7	1	1	1	2	2	2	3	3	2	4	3	3
S13	1	1	1	2	2	2	4	4	3	4	4	4
S19T	0	0	0	2	2	1	3	3	2	1	1	1
S26-1	1	1	1	2	2	2	2	2	1	1	1	1
S29	0	0	0	2	2	2	3	3	3	4	3	3
S33A	1	1	2	2	2	2	4	3	3	3	3	2
S34r	1	2	3	2	2	2	3	3	3	4	4	3
S41b	1	1	1	2	2	2	4	4	3	4	4	4
S48T	1	1	1	2	2	2	3	3	2	2	1	1

Tabla 2.7- Condiciones de cultivo para la obtención de biomasa

Medio	Agitación	Temperatura	Cepas
MC	100 rpm	25°C	SB1D, SB4A, SB6B, LSA1, LSA3, LSB, MC11J, MC15A, MC18A, MC28C, MC34A, MC47D, MC48B, S2rc, S6, S29, S33A, S50B, S44, S48cmc, S49cmc, S49sp, SCI, SCII, SCIV, SCV
MC	100 rpm	18°C	MC4B, MC7D, MC26A, S3, S7, S33C, S34r
MC	100 opm	25°C	S2sp, S12, S13, S14, S19T, S26A, S26B, S41b, S32, S34sp, S50sp, S48T, TF
MC	Estático	04°C	AA3, AA5
KMV 10X	100 opm	25°C	B5
KMV	Estático	25°C	MC46B, S1, S19Sch, S26-1, S41sp, LGII
SSA	Estático	25°C	S48Sch, SCIII, J
SSA	Estático	04°C	AA1, A11

Tabla 3.1- Origen de las especies tipo de traustoquitriales. Los taxones se presentan en el orden cronológico en que fueron descriptos y por género.

Especie	Sustrato	Localidad	A ¹	Referencia
<i>T. proliferum</i>	Algas (<i>Bryopsis plumosa</i>)	Woods Hole, Massachussets, USA	T	Sparrow 1936
<i>T. globosum</i>	Algas (Ulothricales)	Hutomi, Prefectura de Tiba, Japón	C	Kobayashi & Ookubo 1953
<i>T. pachydermum</i>	Agua de laguna salina	Montpellier, Francia	T	Scholtz 1958
<i>T. aureum</i>	Agua de mar	Woods Hole, Massachussets, USA	T	Goldstein 1963b
<i>T. motivum</i>	Agua de mar	Woods Hole, Massachussets, USA	T	Goldstein 1963a
<i>T. multirudimentale</i>	Agua de mar	Woods Hole, Massachussets, USA	T	Goldstein 1963a
<i>T. roseum</i>	Agua de mar	Isla grande de Sound, New Haven Connecticut, USA	T	Goldstein 1963c
<i>T. aggregatum</i>	Sedimentos	Estuario de Weser, Alemania	T-F	Ulken 1965
<i>T. kinnei</i>	Agua de mar	Isla de Heligoland, mar del Norte	F	Gaertner 1969
<i>T. striatum</i>	Sedimentos	Mar Báltico oeste, Alemania	T-F	Schneider 1967
<i>T. arudimentale</i>	Agua de mar de la zona litoral	Bahía de Kandalashial, Mar Blanco, Rusia	F	Artemtchuk 1972
<i>T. antarcticum</i>	Agua de mar superficial subantártica	Océano Pacífico Sur	F	Bahnweg & Sparrow 1974
<i>T. rossii</i>	Agua de mar superficial subantártica	Océano Pacífico Sur	F	Bahnweg & Sparrow 1974
<i>T. kerguelensis</i>	Agua de mar superficial subantártica	Océano Indico Sur	F	Bahnweg & Sparrow 1974
<i>T. benthicola</i>	Sedimentos	Fladenground, mar del Norte	T-F	Raghukumar 1980
<i>T. gaertnerium</i>	Agua de manglares	Goa, India	C	Bongiorni et al. 2005
<i>T. caudivorum</i>	Lesiones de gusanos planos	Cultivos de laboratorio de <i>Macrostomum lignano</i>	-	Schärer et al. 2007
<i>J. marinum</i>	Algas (<i>Gracilaria confervoides</i>)	Yokohama, Japón	C	Kobayashi & Ookubo 1953
<i>S. aggregatum</i>	Agua de mar	Isla grande de Sound, New Haven Connecticut, USA	T	Goldstein & Belsky 1964
<i>S. minutum</i>	Agua de mar	Isla de Madiera, Portugal	C	Gaertner 1981
<i>S. octosporum</i>	Agua de mar	Rosfjord, Noruega	F	Raghukumar 1988a
<i>S. mangrovei</i>	Hojas de mangles	Goa, India	C	Raghukumar 1988b
<i>S. limacinum</i>	Agua de manglares	Colonia, islas Yap, Estados Federados de Micronesia	C	Honda et al. 1998
<i>A. crouchii</i>	Valvas de moluscos	Río Crouch, Essex, Inglaterra	T	Jones & Alderman 1971
<i>U. (T.) amoeboidea</i>	Agua de mar superficial subantártica	Océano Pacífico Sur	F	Bahnweg & Sparrow 1974
<i>U. (T.) visurgensis</i>	Sedimentos	Estuario de Weser, Alemania	T-F	Ulken 1965
<i>U. sarkariana</i>	Agua del estuario	Estuario de Weser, Alemania	T-F	Gaertner 1977
<i>U. radiata</i>	Agua de zona intermareal	Isla de Heligoland, mar del Norte	F	Gaertner 1977
<i>U. profunda</i>	Agua de mar	Costa de Portugal	C	Gaertner 1977
<i>U. minuta</i>	Agua de mar	Fladenground, mar del Norte	F	Raghukumar 1977

¹ tipo de ambiente: C, cálido; T, templado; F, frío.

Tabla 3.2- Rasgos morfológicos y determinación taxonómica de las cepas de traustochytriales locales estudiadas según campaña de recolección

Cepa	Origen ¹	Estadio ameboide previo a zoospor.	Div. mitótica de cél. veget.	E esporangio							Color de la colonia	Taxón	Observ.
				Tamaño (µm)	Forma	Clivaje	Pared	Nº de zoosp.	Fundamento	Movilidad de zoosporas			
SB4A	PR	Si	No	13-20 x 13-20	Globosa	Centrípeto	Delgada, no persistente	Numer.	No	Luego de clivarse	Crema	<i>Ulkenia</i> aff. <i>radiata</i>	
SB6B, SB1D	PR	Si	No	8-18 x 8-18	Globosa	Centrípeto	Delgada, no persistente	Numer.	No	Luego de clivarse	Rosa pálido	<i>U. aff. radiata</i>	
LSA1, LSB	LS	Si	No	15-20 x 15-20	Globosa	Irregular	Delgada, no persistente	Numer.	No	Luego de clivarse	Rosa pálido	<i>U. aff. visurgensis</i>	
LSA3	LS	Si	No	15-18 x 15-18	Globosa	Centrípeto	Delgada, no persistente	Numer.	No	Luego de clivarse	Rosa pálido	<i>U. aff. radiata</i>	
LSA4	LS	No	No	19-22 x 19-22	Globosa	Centrípeto	Delgada, no persistente	Numer.	Si (1)	Antes de liberarse	-	<i>Thraustochytrium</i> aff. <i>antarcticum</i>	Discont.
A11	A	No	Si	8-10 x 8-10	Globosa	Irregular	Delgada, no persistente	8	No	Antes de liberarse	Blanca	<i>Schizochytrium</i> aff. <i>octosporum</i>	
AA1	A	No	Si				No determinado				Blanca	<i>S. sp. a</i>	
AA3, AA5	A	No	Si	15-20 x 15-20	Globosa	Irregular	Delgada, no persistente	32 a 64	No	Antes de liberarse	Rosa pálido	<i>S. sp. b</i>	Flagelo post. reducido; crioofilicas
MC2A, MC3D, MC4 (A,B), MC6B, MC11F, MC34A, MC45E, MC46 (A,A2,B2), MC47(C,D), 48(A,B)	MC	Si	No	13-18 x 13-18	Globosa	Irregular en amebas grandes y regular en a. chicas	Delgada, no persistente	Numer.	No	Luego de clivarse	Rosa naranja pálido	<i>U. aff. visurgensis</i>	Cepas MC2A, 3D, 4A, 6B, 45E 46A-A2-B2, 47D, 48A discont.

Tabla 3.2- Rasgos morfológicos y determinación taxonómica de las cepas de traustequitriales locales estudiadas según campaña de recolección (continuación)

Cepa	Origen ¹	Estadio ameboide previo a zoospor.	Div. mitótica de cél. veget.	Esporangio							Color de la colonia	Taxón	Observ.
				Tamaño (µm)	Forma	Clivaje	Pared	Nº de zoosp.	Fundamento	Movilidad de zoosporas			
MC2H	MC	No	Si	8-10 x 8-10	Globosa	Centrípeto	Delgada, parcialmente persistente	4, a veces 8	No	Antes de liberarse	Crema amarillo	S. sp. c	Discont. ²
MC6H, MC21D', MC50 (A, B2, F2, I2)	MC	No	Si	10-18 x 10-18	Globosa	Centrípeto	Delgada, parcialmente persistente	8, 16, 32	No	Antes de liberarse	Crema amarillo	S. sp. d	Esporas retenidas, discont.
MC7D, MC26A	MC	No	No	15-30 x 15-30	Globosa	Centrípeto	Gruesa (1-2 µm), no persistente	Numer.	No	Antes de liberarse	Naranja	<i>T. aff. striatum (a)</i> ³	
MC12A2	MC	No	No	10-15 x 10-15	Globosa	Irregular	Delgada, persistente	8 o más	No	Antes de liberarse	Naranja amarilla	<i>T. aff. globosum</i>	Discont.
MC15A	MC	No	Si	10-13 x 10-13	Globosa	Irregular	Delgada, no persistente	8, 16	No	Antes de liberarse	Crema	S. sp. e	
MC18A, MC28C	MC	No	No	10-18 x 10-18	Globosa	Centrípeto	Gruesa (>2 µm), parcial. persistente	Numer.	Si (1)	En general antes de liberarse	Naranja	<i>T. aff. aureum</i>	Esporas pueden quedar retenidas
MC46B	MC	No	Si	No determinado. Células tróficas: 3-4 x 3-4 µm. Zoosporas: 2 x 2 µm.							Hialina	S. sp. f	
S1	P	Si	No	15-25 x 15-25	Globosa	Irregular	Delgada, no persistente	Numer.	No	Luego de clivarse	Blanca	<i>U. aff. visurgensis</i>	Colonia punteada
S2rc, S33A, S49sp	P, LS	No	No	18-30 x 18-30	Globosa	Centrípeto	Gruesa (1-2 µm), no persistente	Numer.	No	Luego de liberarse	Rosa	<i>T. aff. striatum (b)</i>	

Tabla 3.2- Rasgos morfológicos y determinación taxonómica de las cepas de traustoquitriales locales estudiadas según campaña de recolección (continuación)

Cepa	Origen ¹	Estadio ameboide previo a zoospor.	Div. mitótica de cél. veget.	E esporangio							Color de la colonia	Taxón	Observ.
				Tamaño (µm)	Forma	Clivaje	Pared	Nº de zoosp.	Fundamento	Movilidad de zoosporas			
S2sp, S32, S34sp, S50sp	P, BB	No	No	13-22 x 13-22	Globosa	Centrípeto	Delgada, no persistente	Numer.	No	Antes de liberarse	Rosa naranja	<i>T. aff. striatum</i> (c)	
S3	P	Si	No	13-18 x 13-18	Globosa	Irregular	Gruesa (1-2 µm), no persistente	Numer.	No	Luego de clivarse	Rosa naranja pálido	<i>U. aff. visurgensis</i>	
S6, S13, S14, S26 (A, B), S29, S41b, S50B, TF	P, BB	No	No	10-17 x 17-27	Piriforme	Centrípeto	Delgada, persistente cerca del fundamento	Numer.	Si (1)	Antes de liberarse	Blanca, blanca crema	<i>T. aff. kinnei</i>	
S7	P	No	No	10-15 x 10-15	Globosa	Irregular	Delgada, parcialmente persistente	Numer.	No	Antes de liberarse	Rosa	<i>T. aff. globosum</i>	
S12	P	No	No	9-12 x 9-12	Globosa	Irregular	Delgada, parcialmente persistente	8	No	Antes de liberarse	Crema	<i>T. sp. a</i>	Agregados celulares
S19T	P	No	No	15-25 x 15-25	Globosa	Centrípeto	Gruesa (1-2 µm), no persistente	Numer.	Si (1)	Antes de liberarse	Rosa naranja pálido	<i>T. sp. b</i>	
S19 Sch	P	No	Si				No determinado				Blanca	<i>S. sp. j</i>	Colonia punteada
S26-1, S41sp	P	Si	No	10-12 x 13-15	Piriforme	Irregular	Delgada, no persistente	Numer.	No	Luego de clivarse, a veces	Hialina	<i>U. aff. minuta</i>	

Tabla 3.2- Rasgos morfológicos y determinación taxonómica de las cepas de traustequitriales locales estudiadas según campaña de recolección (continuación)

Cepa	Origen ¹	Estadio ameboide previo a zoospor.	Div. mitótica de cél. veget.	Esporangio							Color de la colonia	Taxón	Observ.
				Tamaño (µm)	Forma	Clivaje	Pared	Nº de zoosp.	Fundamento	Movilidad de zoosporas			
S33C	P	No	Si				No determinado				Hialina	S. sp. j	Crecimiento muy lento
S34r	P	No	Si	13-18 x 13-18	Globosa	Irregular	Delgada, no persistente	4,8,16, con una gútula	No	Antes de liberarse	Crema amarilla	S. sp. g	Red ectopl. muy prominente
LGII	P	No	Si	5-7 x 5-7	Globosa	Irregular	Delgada, no persistente	4 y 8	No	Antes de liberarse	Hialina blanca	S. sp. h	
S44, S48cmc, S49cmc	LS	No	Si	15-25 x 15-25	Globosa	Irregular	Delgada, parcialmente persistente	8, 16, a veces 4	No	Antes de liberarse	Crema amarilla	S. sp. i	Colonias con aspecto cerebroide
S48T	LS	No	No	13-22 x 13-22	Globosa	Centrípeto	Delgada, no persistente	Numer.	Si (1)	Luego de liberarse	Rosa	T. sp. c	
S48Sch	LS	No	Si				No determinado				Hialina	S. sp. j	Crecimiento muy acotado
J, B5, SCIII	LV, BB, SC	No	Si				No determinado				Crema	S. sp. j	Crecimiento muy acotado
SCI, SCII, SCV	SC	Si	No	13-20 x 13-20	Globosa	Irregular	Delgada, no persistente	Numer.	No	Luego de clivarse	Rosa pálido	<i>U. aff. visurgensis</i>	
SCIV	SC	No	No	13-18 x 13-18	Globosa	Irregular	Delgada, parcialmente persistente	Numer.	Si (1)	Antes de liberarse	Crema	<i>T. aff. aureum</i>	

¹ Según campaña de recolección: PR, Punta Rasa; LS, laguna La Salada; A, Antártida; MC, Mar Chiquita; P, estuarios y litoral marítimo de la Patagonia; BB, Bahía Blanca; LV, laguna Vilama; SC, litoral marítimo de Santa Cruz. Para más detalles sobre el origen de la muestra del cual se obtuvo el aislamiento, consultar la tabla 2.2.

² Discont., discontinuada.

³ Se indica entre paréntesis el subgrupo al cual las cepas fueron asignadas.

Tabla 3.3- Estudios de abundancia y distribución de traustoguitrales

Sustrato	Localidad	A ¹	Aporte	Referencia
Agua de mar y sedimentos oceánicos	Océano Atlántico ecuatorial y costa de Brasil (Recife, Natal, Fortaleza)	C	Se registraron traustoguitrales en 2 muestras de agua y 11 del fondo oceánico; colonización de cebos máxima a entre 20° C y 30° C	Ulken 1966
Agua de mar superficial, algas	Mar de los Sargazos (entre 20-30° N y 55-70° O), océano Atlántico	C	Se registraron representantes de los géneros <i>Schizochytrium</i> , <i>Thraustochytrium</i> (<i>T. sp</i> y <i>T. aggregatum</i>) y <i>Ulkenia visurgensis</i>	Ulken 1979
Agua y sedimentos de manglar	Veracruz (México), Sinai (Israel), Bermudas, Cananéis (Brasil), Pearl Harbour (Hawai, USA)	C	Se registraron representantes de los géneros <i>Schizochytrium</i> , <i>Ulkenia</i> y <i>Thraustochytrium</i> , especialmente en zonas con alta salinidad.	Ulken 1983
Sedimentos de manglar	Estuario del río Morales, Costa Rica	C	Se registraron representantes de los géneros <i>Schizochytrium</i> , <i>Thraustochytrium</i> y <i>Ulkenia</i> , que presentaron variaciones estacionales (mayor cantidad en estación lluviosa)	Ulken et al. 1990
Agua de mar	Mar Báltico oeste	T-F	Se registraron diecisiete formas diferentes de traustoguitrales, cuya abundancia presentó variaciones estacionales	Schneider 1969a
Agua de mar	Mar Báltico oeste	T-F	Se registraron siete nuevas formas de traustoguitrales, estudiando su respuesta a la salinidad, la temperatura y la contaminación.	Schneider 1969b
Agua, sedimentos y detritus	Gran Lago Salado, Utah, USA	F	Se registraron varios representantes de los géneros <i>Schizochytrium</i> y <i>Thraustochytrium</i> , con predominancia de la especie <i>T. globosum</i>	Amon, 1978
Hielo	Mar de Weddell, Antártida	F	Se registraron células con morfología similar a especies de <i>Schizochytrium</i> y <i>Aplanochytrium</i> sobre tubos de mucílago de diatomeas colonizadas por bacterias	Riemann & Schaumann 1993
Hojas senescentes de manglares	Isla Panay, Filipinas	C	Se registraron traustoguitrales en todas las muestras siendo <i>S. mangrovei</i> la especie más abundante	Leaño 2001
Agua y sedimentos marinos y estuarios	Costa de Taiwan	C	Se registraron 6 especies diferentes de <i>Thraustochytrium</i> , todas con fundamentos basales	Chen & Chien 2002

Tabla 3.3- Estudios de abundancia y distribución de traustoguitrales (continuación)

Sustrato	Localidad	A ¹	Aporte	Referencia
Hojas senescentes de manglares	Mai Po, Three Fathoms Cove y Ting Kok, Hong Kong	C	Se aislaron 6 cepas de traustoguitrales siendo <i>S. mangrovei</i> la especie más abundante	Fan et al. 2002
Agua de mar y sedimentos	Mar del Norte, Bahía de Alemania	T-F	Se registraron fluctuaciones estacionales de traustoguitrales con diferente patrón en 1965 y 1966, en agua de mar y en sedimentos	Gaertner 1968
Agua de mar y sedimentos	Mar del Norte	T-F	Se registraron fluctuaciones estacionales de traustoguitrales en el agua de mar superficial, pero no en sedimentos, donde hubo mayor abundancia. En la columna de agua predominó <i>U. minuta</i> y en los sedimentos <i>T. multirudimentale</i>	Gaertner & Raghukumar 1980
Agua de mar (superficial y hasta 100 m de profundidad)	Mar de Arabia y estuario de Zuari, Goa, India	T-C	Se registró una mayor abundancia de traustoguitrales en la zona costera en la temporada de los vientos monsonicos, con variaciones en la distribución vertical en las distintas estaciones	Raghukumar et al. 1990
Agua de mar (superficial y de profundidad)	Mar de Arabia, India	T-C	Se encontraron números sustanciales de traustoguitrales en la columna de agua de hasta 150 m, que se correlacionaron positivamente con el número de bacterias y la materia orgánica particulada; también se registraron poblaciones densas en profundidades de hasta 2000 m.	Raghukumar et al. 2001
Agua de mar (a 1, 5 y 15 m de profundidad)	Mar Interior de Seto, Japón	T	Se relacionó la abundancia de traustoguitrales con el bacterioplancton y el carbono orgánico disuelto y particulado	Kimura et al. 2001
Agua de mar y sedimentos (arena) de zona costera	Mar de Liguria, Mediterraneo noroeste	T	Se estudió la distribución, variabilidad estacional y estructura de la comunidad de traustoguitrales	Bongiorni & Dini 2002
Agua de mar superficial	Mar de Noruega y Groenlandia	F	Se relaciono la abundancia de traustoguitrales con el bacterioplancton y la concentración de ATP particulado	Naganuma et al. 2006

Tabla 3.3- Estudios de abundancia y distribución de traustoguitriales (continuación)

Sustrato	Localidad	A ¹	Aporte	Referencia
Agua de mar, restos vegetales y detritus	Lagunas saladas del Colorado y de Utah, playas de Utah y California, estuario de Tiajuana, USA	T	Se obtuvieron más de 150 aislamientos de traustoguitriales que produjeron altos rendimientos de DHA	Barclay 1994
Agua de mar de arrecifes de coral	Islas Yap, Estados Federados de Micronesia	C	Se obtuvieron 400 aislamientos de traustoguitriales para evaluar su producción de DHA y DPA; se seleccionó la cepa SR21	Nakahara et al. 1996
Hojas de manglares, agua, algas, sedimentos y fragmentos vegetales	Costas frías templadas (59–61°N), templadas (50–51°N) y manglares subtropicales (25–27°N)	F,T y C	Se obtuvieron 57 aislamientos de traustoguitriales, presentando mayor concentración de DHA los provenientes de ambientes fríos	Bowles et al. 1999
Agua de mar costera	Hiroshima, Ibaragi, Miyagi y Nagasaki, Japón y Fiji	C	Se aislaron 7 cepas de traustoguitriales que produjeron altas concentraciones de DHA	Huang et al. 2003
Agua, sedimentos y fragmentos vegetales	19 localidades de la costa atlántica de Canadá	T-F	Se obtuvieron 68 aislamientos de traustoguitriales para evaluar su capacidad como productoras de DHA	Burja et al. 2006
Hojas de manglares, agua, macroalgas, sedimentos	Costas, arrecifes de coral, y estuarios de Taiwán	C	Se obtuvieron 25 aislamientos de traustoguitriales para evaluar su capacidad como productoras de DHA	Yang et al. 2009

¹A, tipo de ambiente: C, cálido; T, templado; F, frío.

Tabla 4.1- Oligonucleótidos utilizados para la amplificación y secuenciación del gen ARNr 18S

Código	DS ¹	Secuencia	Hibrida con	Referencia
SR1	D	5'-TACCTGGTTGATCCTGCCAG-3'	1-20 ²	Rausch et al. 1989
SR12	R	CCTTCCGCAGGTTCACCTAC	1781-1762 ²	Rausch et al. 1989
FT1	D	CTACCACATCCAAGGAAGGC	415-434 ³	Este capítulo
RT1	R	ATTGCCACAACTTCCTTCC	1405-1424 ³	Este capítulo
RA2	R	TCCCCAAACTTTCGTTCTTG	970-989 ³	Este capítulo

¹ DS = Dirección de síntesis: D = Directo, R = Reverso

² Sitio de hibridación con el gen ARNr 18S de *Volvox carter*

³ Sitio de hibridación con el gen ARNr 18S de *Thraustochytrium kinnei* (Número de acceso: L34668)

Tabla 4.2- Cepas locales utilizadas en el análisis de filogenia molecular con los números de acceso a sus secuencias depositadas en Genbank

Taxón ¹	Cepa	Número de acceso
<i>Aurantiochytrium</i> sp.	B5	HQ228949
<i>Oblongichytrium</i> sp.	AA3	HQ228948
<i>Parietichytrium</i> sp.	SB4A	HQ228977
<i>Schizochytrium</i> sp.	S34r	HQ228969
<i>Schizochytrium</i> sp.	S48cmc	HQ228971
<i>Thraustochytrium</i> aff. <i>aureum</i>	MC18A	HQ228955
<i>Thraustochytrium</i> aff. <i>aureum</i>	MC28C	HQ228957
<i>Thraustochytrium</i> aff. <i>aureum</i>	S48T	HQ228972
<i>Thraustochytrium</i> aff. <i>aureum</i>	SCIV	HQ228981
<i>Thraustochytrium</i> aff. <i>kinnei</i>	S6A	HQ228962
<i>Thraustochytrium</i> aff. <i>kinnei</i>	S13	HQ228963
<i>Thraustochytrium</i> aff. <i>kinnei</i>	S14	HQ228964
<i>Thraustochytrium</i> aff. <i>kinnei</i>	S26A	HQ228965
<i>Thraustochytrium</i> aff. <i>kinnei</i>	S26B	HQ228966
<i>Thraustochytrium</i> aff. <i>kinnei</i>	S29	HQ228967
<i>Thraustochytrium</i> aff. <i>kinnei</i>	S41b	HQ228970
<i>Thraustochytrium</i> aff. <i>kinnei</i>	S50B	HQ228974
<i>Thraustochytrium</i> aff. <i>kinnei</i>	TF	HQ228983
<i>Thraustochytrium</i> aff. <i>striatum</i>	MC7D	HQ228953
<i>Thraustochytrium</i> aff. <i>striatum</i>	MC26A	HQ228956
<i>Thraustochytrium</i> aff. <i>striatum</i>	S33A	HQ228968
<i>Thraustochytrium</i> aff. <i>striatum</i>	S49sp	HQ228973
<i>Thraustochytrium</i> aff. <i>striatum</i>	S50sp	HQ228975
<i>Ulkenia</i> aff. <i>visurgensis</i>	LSA1	HQ228950
<i>Ulkenia</i> aff. <i>visurgensis</i>	LSA3	HQ228951
<i>Ulkenia</i> aff. <i>visurgensis</i>	LSB	HQ228952
<i>Ulkenia</i> aff. <i>visurgensis</i>	MC11J	HQ228954
<i>Ulkenia</i> aff. <i>visurgensis</i>	MC34A	HQ228958
<i>Ulkenia</i> aff. <i>visurgensis</i>	MC47D	HQ228959
<i>Ulkenia</i> aff. <i>visurgensis</i>	MC48B	HQ228960
<i>Ulkenia</i> aff. <i>visurgensis</i>	S3	HQ228961
<i>Ulkenia</i> aff. <i>visurgensis</i>	SB1D	HQ228976
<i>Ulkenia</i> aff. <i>visurgensis</i>	SB6B	HQ228978
<i>Ulkenia</i> aff. <i>visurgensis</i>	SCI	HQ228979
<i>Ulkenia</i> aff. <i>visurgensis</i>	SCII	HQ228980
<i>Ulkenia</i> aff. <i>visurgensis</i>	SCV	HQ228982

¹ Los taxones a los cuales corresponden las cepas secuenciadas se determinaron luego de realizar estudios morfológicos, análisis de filogenia molecular y perfiles de PUFAs, es decir, luego de analizar los resultados de los capítulos III y IV.

Tabla 4.3- Cepas utilizadas en el análisis de filogenia molecular con los números de acceso a sus secuencias disponibles en bancos de datos

Taxón	Cepa	Número de acceso	Referencia
Traustochytriales			
<i>Aurantiochytrium limacinum</i>	NIBH SR21 (IFO 32693)	AB022107	Honda et al. 1999
<i>Aurantiochytrium mangrovei</i>	RCC893	DQ367049	-
<i>Botryochytrium radiatum</i>	SEK353	AB022115	Honda et al. 1999
<i>Japonochytrium</i> sp.	ATCC 28207	AB022104	Honda et al. 1999
<i>Oblontiochytrium minutum</i>	KMPB N-BA-77	AB022108	Honda et al. 1999
<i>Oblontiochytrium multirudimentale</i>	KMPB N-BA-113	AB022111	Honda et al. 1999
<i>Parietichytrium sarkarianum</i>	SEK351	AB355411	Yokoyama & Honda 2007
<i>Schizochytrium aggregatum</i>	ATCC 28209	AB022106	Honda et al. 1999
<i>Schizochytrium</i> sp.	SEK 210 (NBRC 102615)	AB290576	Yokoyama & Honda 2007
<i>Sicyoidochytrium minutum</i>	SEK354	AB355412	Yokoyama & Honda 2007
<i>Thraustochytrium aureum</i>	ATCC 34304	AB022110	Honda et al. 1999
<i>Thraustochytrium aggregatum</i>	KMPB N-BA-110	AB022109	Honda et al. 1999
<i>Thraustochytrium caudivorum</i>	SJ clon 1	EF114355	Scharer et al. 2007
<i>Thraustochytrium gaertrierum</i>	NIOS6-A00-2	AY705753	Bongiorni et al. 2005
<i>Thraustochytrium kinnei</i>	KMPB 1694d	L34668	Cavalier-Smith et al. 1994
<i>Thraustochytrium motivum</i>	T91-12	AF265337	Leander & Porter 2001
<i>Thraustochytrium pachydermum</i>	KMPB N-BA-114	AB022113	Honda et al. 1999
<i>Thraustochytrium striatum</i>	ATCC 24473	AB022112	Honda et al. 1999
<i>Ulkenia amoeboides</i>	SEK214	AB290355	Yokoyama & Honda 2007
<i>Ulkenia profunda</i>	#29 (Raghukumar)	AB022114	Honda et al. 1999
<i>Ulkenia visurgensis</i>	ATCC 28208	AB022116	Honda et al. 1999
Aplanochytriales			
<i>Aplanochytrium kerguelense</i>	KMPB N-BA-107	AB022103	Honda et al. 1999
<i>Aplanochytrium stocchinoi</i>	No disponible	AJ519935	Moro et al. 2003
<i>Aplanochytrium yorkensis</i>	No disponible	AF265333	Leander & Porter 2001
Labirintulales			
<i>Labyrinthula</i> sp.	AN-1565 (NBRC 33215)	AB022105	Honda et al. 1999
Grupo externo			
<i>Ochromonas danica</i>	No disponible	M32701	-

Tabla 4.4- Contenido de FAs de las cepas

FAs		Cepas								
Nombre	Fórmula	S3	SB1D	LSA1	LSA3	B	MC11J	MC48B	SB4A	SB6B
Mirístico	C14:0	3,61	0,97	2,28	2,23	2,04	1,44	1,76	1,17	0,91
Pentadecanoico	C15:0	3,47	0,39	0,91	0,70	0,62	0,00	0,62	0,38	0,00
Palmitico	C16:0	61,04	33,15	53,18	56,37	56,65	38,77	51,04	25,80	30,19
Palmitoleico	C16:1	1,55	0,07	1,92	1,34	1,34	0,42	0,76	0,66	1,07
Estéarico	C18:0	1,95	3,97	6,74	4,96	5,09	1,39	11,44	4,67	0,99
Oleico	C18:1 (n-9)	7,31	14,49	20,96	24,07	23,91	5,44	21,63	7,66	7,81
Linoleico	C18:2 (n-6)	1,63	1,07	1,45	0,17	0,28	0,18	0,74	2,92	2,84
γ -linolénico	C18:3 (n-6)	0,00	0,00	0,31	0,00	0,11	0,00	0,28	0,37	0,00
α -linolénico	C18:3 (n-3)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Eicosadienocio	C20:2 (n-6)	1,78	0,00	0,00	0,00	0,00	6,04	0,00	0,49	5,88
Dihomo- γ -linolénico	C20:3 (n-6)	0,00	0,21	0,00	0,00	0,00	0,00	0,13	0,85	0,88
Araquidónico (ARA)	C20:4 (n-6)	2,33	3,47	0,79	0,20	0,24	6,59	0,77	5,17	12,63
Eicosapentaenoico (EPA)	C20:5 (n-3)	1,34	3,46	0,22	0,15	0,12	2,52	0,36	5,40	2,02
Docosadienoico	C22:2 (n-6)	0,00	0,00	0,00	0,05	0,00	0,00	0,00	7,55	0,00
Docosatrienoico	C22:3 (n-6)	0,00	0,91	0,35	0,06	0,08	1,10	0,32	1,43	2,57
Docosatetraenoico (DTA)	C22:4 (n-6)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,75	0,00	0,00	0,00
Docosapentaenoico n-6 (DPA n-6)	C22:5 (n-6)	1,39	5,07	0,76	0,31	0,30	6,58	0,86	14,34	15,50
Docosapentaenoico n-3 (DPA n-3)	C22:5 (n-3)	0,00	0,54	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Docosahexaenoico (DHA)	C22:6 (n-3)	9,30	18,68	2,10	2,04	1,74	21,92	3,68	13,59	7,91
Otros		3,29	13,58	8,02	7,34	7,47	6,86	5,60	7,57	8,80
% PUFAS/FAs		17,78	33,40	5,98	2,98	2,87	45,68	7,15	52,10	50,22
% FAs/biomasa		11,84	6,19	6,90	11,65	11,38	5,09	8,80	3,33	5,09

Tabla 4.4- Contenido de FAs de las cepas (continuación)

FAs		Cepas								
Nombre	Fórmula	MC4B	MC3A	MC47D	SCI	SCII	SCV	S26-1	S41sp	S1
Mirístico	C14:0	1,36	0,86	0,72	1,20	0,65	0,64	1,19	0,90	3,33
Pentadecanoico	C15:0	1,30	0,56	0,69	0,34	0,51	0,67	3,70	5,15	3,32
Palmítico	C16:0	34,47	22,59	23,93	34,64	43,45	30,98	47,26	35,03	36,91
Palmitoleico	C16:1	0,18	0,66	0,69	0,80	0,58	0,71	2,91	1,34	0,58
Esteárico	C18:0	14,13	2,57	0,90	11,26	3,15	2,16	2,78	2,79	1,67
Oleico	C18:1 (n-9)	2,49	16,22	7,07	26,99	11,17	10,58	7,41	2,79	2,17
Linoleico	C18:2 (n-6)	2,50	3,21	2,27	3,87	1,15	1,71	0,49	1,23	0,29
γ -linolénico	C18:3 (n-6)	0,91	0,84	0,97	0,58	0,58	0,47	0,00	0,00	0,00
α -linolénico	C18:3 (n-3)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,10	0,00	0,00	0,00
Eicosadienocio	C20:2 (n-6)	1,74	4,77	7,13	0,45	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Dihomo- γ -linolénico	C20:3 (n-6)	0,77	1,44	1,55	0,69	0,40	0,70	0,00	0,00	0,00
Araquidónico (ARA)	C20:4 (n-6)	3,98	10,03	12,63	2,90	4,37	6,17	0,14	0,00	0,00
Eicosapentaenoico (EPA)	C20:5 (n-3)	2,36	3,88	3,85	0,00	1,68	5,96	0,74	1,15	0,22
Docosadienoico	C22:2 (n-6)	0,00	0,52	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Docosatrienoico	C22:3 (n-6)	3,89	2,19	3,17	1,58	1,56	2,57	0,00	0,00	0,14
Docosatetraenoico (DTA)	C22:4 (n-6)	0,00	0,75	0,51	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Docosapentaenoico n-6 (DPA n-6)	C22:5 (n-6)	12,72	13,23	17,12	4,93	7,67	9,91	4,63	4,62	2,85
Docosapentaenoico n-3 (DPA n-3)	C22:5 (n-3)	1,21	0,54	0,28	0,00	0,00	0,94	0,33	4,62	0,64
Docosahexaenoico (DHA)	C22:6 (n-3)	8,78	12,35	12,11	5,00	3,99	13,50	15,97	15,38	25,48
Otros		7,24	2,79	4,40	4,77	19,10	12,23	12,46	25,01	22,41
% PUFAS/FAs		38,85	53,75	61,60	20,00	21,38	42,03	22,30	26,99	29,61
% FAs/biomasa		6,62	7,93	5,74	6,58	2,31	5,01	7,17	8,03	11,93

Tabla 4.4- Contenido de FAs de las cepas (continuación)

FAs		Cepas									
Nombre	Fórmula	S34r	S44	S48cmc	S49cmc	MC15A	AA3	B5	MC46B	L6II	S33C
Mirístico	C14:0	3,68	2,41	1,89	1,67	7,77	22,49	1,99	6,13	2,79	0,63
Pentadecanoico	C15:0	0,00	0,28	0,20	0,31	0,40	2,19	14,89	2,25	4,97	0,77
Palmítico	C16:0	56,75	27,39	28,98	27,22	45,82	21,42	6,23	13,85	26,66	13,93
Palmitoleico	C16:1	1,49	0,71	0,85	0,61	1,84	0,29	0,00	0,00	0,62	1,36
Esteárico	C18:0	3,97	7,22	5,43	1,38	4,62	1,18	0,99	1,55	0,96	4,23
Oleico	C18:1 (n-9)	0,00	27,88	17,32	12,79	10,80	0,00	0,82	2,61	4,73	21,97
Linoleico	C18:2 (n-6)	15,07	12,95	16,08	11,12	13,24	0,00	0,97	0,60	4,73	35,75
γ -linolénico	C18:3 (n-6)	0,60	0,61	1,57	0,90	1,82	0,20	0,00	0,00	0,00	0,44
α -linolénico	C18:3 (n-3)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,09	0,00	0,00	0,21	1,27
Eicosadienocio	C20:2 (n-6)	1,87	1,30	0,98	2,06	0,25	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Dihomo- γ -linolénico	C20:3 (n-6)	0,00	3,33	2,67	4,46	2,20	0,44	0,00	0,00	0,00	0,00
Araquidónico (ARA)	C20:4 (n-6)	5,26	4,15	6,81	10,61	1,84	2,11	0,00	0,68	0,00	0,00
Eicosapentaenoico (EPA)	C20:5 (n-3)	1,25	1,24	1,66	2,93	1,56	8,92	4,27	1,08	2,55	0,63
Docosadienoico	C22:2 (n-6)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Docosatrienoico	C22:3 (n-6)	1,14	1,00	1,87	2,92	0,20	0,40	0,58	0,00	0,00	0,00
Docosatetraenoico (DTA)	C22:4 (n-6)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Docosapentaenoico n-6 (DPA n-6)	C22:5 (n-6)	1,39	2,00	4,37	5,10	0,83	0,58	3,21	4,45	0,18	0,00
Docosapentaenoico n-3 (DPA n-3)	C22:5 (n-3)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,80	1,96	0,81	0,37	0,00
Docosahexaenoico (DHA)	C22:6 (n-3)	3,65	4,59	6,84	11,32	3,47	23,06	42,98	40,19	35,93	9,75
Otros		3,89	2,93	2,48	4,58	3,34	13,83	21,12	25,81	15,32	9,26
%											
% PUFAS/FAs		30,23	31,17	42,86	51,44	25,42	38,60	53,97	47,80	43,96	47,85
% FAs/biomasa		8,48	15,34	10,77	9,16	14,28	6,45	2,72	5,83	5,47	5,00

Tabla 4.4- Contenido de FAs de las cepas (continuación)

FAs		Cepas												
Nombre	Fórmula	S2sp	S32	S34sp	S50sp	MC7D	MC26A	S2rc	S33A	S49sp	S7	S12	S19T	SCIV
Mirístico	C14:0	0,65	0,74	1,41	0,83	1,66	1,03	0,64	1,09	0,99	5,11	2,72	0,65	2,56
Pentadecanoico	C15:0	0,49	0,35	0,57	0,57	0,34	1,53	0,19	0,23	0,18	3,07	0,12	0,39	0,69
Palmítico	C16:0	21,07	23,62	34,46	17,20	26,43	35,35	22,93	36,45	33,07	56,74	29,45	23,61	20,26
Palmitoleico	C16:1	0,24	0,12	0,25		0,27	0,30	0,08	0,09	0,35	3,02	1,05	0,08	6,84
Estearico	C18:0	6,27	7,77	11,91	7,29	6,66	10,47	11,43	11,71	7,59	4,08	2,84	8,94	8,94
Oleico	C18:1 (n-9)	14,78	17,23	22,26	19,13	18,01	21,46	31,02	31,16	15,66	7,62	14,33	21,99	15,39
Linoleico	C18:2 (n-6)	2,71	2,17	3,97	2,70	8,48	3,11	1,41	2,83	0,69	3,92	23,50	2,66	17,33
γ -linolénico	C18:3 (n-6)	0,50	0,46	0,56	0,80	0,57	0,93	0,19	0,49	0,30	0,00	0,76	0,37	0,55
α -linolénico	C18:3 (n-3)	0,14	0,07	0,08	0,00	0,24	0,08	0,04	0,00	0,00	0,00	0,00	0,06	0,54
Eicosadienocio	C20:2 (n-6)	0,00	0,00	0,60	0,00	0,66	0,00	1,47	0,73	0,55	2,28	2,64	0,00	0,95
Dihomo- γ -linolénico	C20:3 (n-6)	0,92	0,52	0,93	1,09	1,40	0,77	0,86	0,49	0,75	0,00	3,41	1,76	1,50
Araquidónico (ARA)	C20:4 (n-6)	6,62	3,70	1,99	5,02	2,82	4,15	2,72	0,83	3,81	2,53	5,42	2,88	1,55
Eicosapentaenoico (EPA)	C20:5 (n-3)	3,24	4,57	1,66	4,10	2,95	5,37	0,99	0,34	2,24	1,48	1,14	2,56	5,65
Docosadienoico	C22:2 (n-6)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,11	0,09	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Docosatrienoico	C22:3 (n-6)	5,77	2,01	1,56	3,89	1,49	2,79	3,99	1,57	1,65	0,00	1,24	3,02	0,34
Docosatetraenoico (DTA)	C22:4 (n-6)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Docosapentaenoico n-6 (DPA n-6)	C22:5 (n-6)	16,59	16,14	6,14	13,41	10,44	2,28	8,77	2,88	13,75	1,73	3,24	12,56	0,98
Docosapentaenoico n-3 (DPA n-3)	C22:5 (n-3)	1,61	1,04	0,53	1,88	0,53	1,24	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,32	1,15
Docosaheptaenoico (DHA)	C22:6 (n-3)	9,30	14,03	4,94	8,98	9,39	2,19	5,15	1,83	8,63	5,56	6,00	11,31	11,36
Otros		9,11	5,45	6,20	13,11	7,67	6,95	8,00	7,20	9,77	2,84	2,13	5,82	3,43
% PUFAS/ FAs		47,39	44,73	22,94	41,87	38,96	22,92	25,71	12,08	32,38	17,51	47,35	38,50	41,90
% FAs /biomasa		5,81	6,97	7,91	6,27	8,71	5,43	7,21	9,35	4,74	13,81	7,81	12,13	10,07

Tabla 4.4- Contenido de FAs de las cepas (continuación)

FAs		Cepas											
Nombre	Fórmula	MC28C	MC18A	S48T	S6A	S13	S14	S26B	S29	S41B	S50B	S26A	TF
Mirístico	C14:0	2,45	1,17	1,68	3,87	6,70	6,99	3,86	4,13	4,52	4,62	0,00	0,00
Pentadecanoico	C15:0	2,25	1,60	0,00	4,88	0,71	1,04	1,65	1,48	0,67	1,43	0,00	0,00
Palmítico	C16:0	41,96	37,57	23,67	16,13	43,90	46,50	36,36	38,95	22,40	27,35	5,46	13,65
Palmitoleico	C16:1	0,00	0,00	0,00	0,08	0,23	0,34	0,52	0,42	0,08	0,13	0,00	0,00
Estéarico	C18:0	0,95	2,54	3,69	0,73	3,38	4,70	3,34	6,38	1,00	2,16	2,94	6,93
Oleico	C18:1 (n-9)	2,34	2,94	7,66	0,68	2,70	2,39	2,65	4,10	1,07	1,35	7,76	22,44
Linoleico	C18:2 (n-6)	1,72	1,55	8,87	0,17	1,92	2,04	2,08	2,61	1,14	1,28	12,21	28,01
γ -linolénico	C18:3 (n-6)	0,00	0,00	0,00	0,07	0,14	0,20	0,18	0,26	0,00	0,16	0,00	0,00
α -linolénico	C18:3 (n-3)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Eicosadienocio	C20:2 (n-6)	6,53	3,59	5,86	0,00	0,00	0,00	0,00	0,33	0,00	0,00	0,00	0,00
Dihomo- γ -linolénico	C20:3 (n-6)	0,00	0,00	0,76	0,21	0,35	0,41	0,95	1,10	0,21	0,19	0,00	0,00
Araquidónico (ARA)	C20:4 (n-6)	4,03	3,09	6,45	0,98	1,25	0,65	1,89	2,68	1,42	1,20	0,00	0,00
Eicosapentaenoico (EPA)	C20:5 (n-3)	4,57	2,45	5,92	7,86	6,76	5,84	7,16	5,74	4,00	7,30	0,00	0,00
Docosadienoico	C22:2 (n-6)	0,00	0,56	3,37	0,06	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	20,13	1,16
Docosatrienoico	C22:3 (n-6)	0,00	0,63	1,74	0,00	0,24	0,15	0,36	0,53	0,16	0,23	7,55	3,23
Docosatetraenoico (DTA)	C22:4 (n-6)	0,00	0,82	3,33	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	13,54	10,80
Docosapentaenoico n-6 (DPA n-6)	C22:5 (n-6)	5,68	9,41	5,86	4,35	2,27	1,32	2,44	0,27	3,69	3,19	0,00	0,00
Docosapentaenoico n-3 (DPA n-3)	C22:5 (n-3)	0,00	0,00	3,24	0,43	1,38	1,05	1,59	1,41	1,77	1,64	11,80	9,70
Docosaheptaenoico (DHA)	C22:6 (n-3)	17,00	28,56	0,00	46,31	23,87	20,45	31,63	24,90	54,12	45,59	2,76	0,00
Otros		10,52	3,52	17,91	13,19	4,19	5,94	3,34	4,70	3,75	2,19	15,85	4,07
% PUFAS/FAs		39,53	50,66	45,39	60,43	38,19	32,11	48,29	39,84	66,51	60,77	67,99	52,91
% FAs/biomasa		3,64	7,26	2,69	8,50	3,49	3,66	3,65	4,25	6,34	7,37	9,24	3,10

Tabla 6.1- Ejemplos representativos de concentraciones de biomasa, lípidos y DHA obtenidas con distintas cepas de traustoguitriales. Según Raghukumar (2008)

Organismo	Tiempo	Biomasa (g l ⁻¹)	%lípidos /biomasa	% DHA /lípidos	DHA (g l ⁻¹)	Referencia
<i>T. aureum</i> ATCC 34304	4 d	4,9	20,3	51,0	0,5	Bajpai et al. (1991a)
<i>T. aureum</i> ATCC 34304	3 d	5,7	8,0	40,0	0,2	Iida et al. (1996)
<i>T. roseum</i> ATCC 28210 (F)*	5 d	17,1	25,0	50,0	2,1	Singh and Ward (1997a)
<i>Thraustochytrium</i> sp. 20892	4 d	6,1	15,2	53,1	0,7	Singh et al. (1996)
<i>Thraustochytrium</i> sp. ONC-T18	4 d	28,0	81,7	31,5	4,6	Burja et al. (2006)
<i>Thraustochytrium</i> sp. KK17-3	3 d	7,1	19,9	52,1	0,3	Huang et al. (2001)
<i>Schizochytrium</i> KH105 (F)	4 d	30,0	43,0	25,8	3,4	Yamasaki et al. (2006)
<i>A. limacinum</i> SR21	5 d	38,0	50,0	43,1	4,2	Yokochi et al. (1998)
<i>A. limacinum</i> SR21 (F)	4 d	48,0	77,5	35,6	13,3	Yaguchi et al. (1997)
<i>A. limacinum</i> SR21	7 d	22,1	-	-	4,9	Chi et al. (2007)

*(F), ensayos realizados en fermentadores. El resto corresponde a cultivos en frasco agitado

Tabla 6.2- Diseño de selección Factorial Fraccional (FFr1) y respuesta (peso seco) para la producción de biomasa

Ensayo	Nivel del factor *								Peso seco
	Glucosa (X ₁)		pH (X ₂)	CSL (X ₃)		SW (X ₄)			
1	+1	9,0	+1	7,0	-1	1,1	-1	0,35	6,30
2	+1	9,0	+1	7,0	+1	11,0	-1	3,50	38,36
3	-1	2,0	+1	7,0	-1	1,1	-1	0,35	5,34
4	0	5,5	0	5,7	0	6,0	0	1,92	21,66
5	-1	2,0	+1	7,0	+1	11,0	-1	0,35	6,40
6	+1	9,0	+1	7,0	+1	11,0	+1	3,50	38,56
7	-1	2,0	-1	4,5	+1	11,0	+1	3,50	9,20
8	+1	9,0	-1	4,5	+1	11,0	-1	0,35	32,40
9	+1	9,0	-1	4,5	-1	1,1	-1	0,35	5,16
10	-1	2,0	+1	7,0	+1	11,0	+1	3,50	8,28
11	-1	2,0	-1	4,5	-1	1,1	-1	0,35	5,04
12	-1	2,0	-1	4,5	-1	1,1	+1	3,50	4,14
13	+1	9,0	-1	4,5	+1	11,0	+1	3,50	32,28
14	0	5,5	0	5,7	0	6,0	0	1,92	20,70
15	+1	9,0	-1	4,5	-1	1,1	+1	3,50	8,94
16	-1	2,0	-1	4,5	+1	11,0	-1	0,35	6,12
17	-1	2,0	+1	7,0	-1	1,1	+1	3,50	4,18
18	0	5,5	0	5,7	0	6,0	0	1,92	21,44
19	+1	9,0	+1	7,0	-1	1,1	+1	3,50	9,10

* La concentración de glucosa y SW está expresada en % m/v, la de CSL en % v/v y la de peso seco en g l⁻¹. 3,5% m/v de SW es equivalente a la salinidad media marina.

Tabla 6.3- Análisis del diseño de selección Factorial Fraccional (FFr1) para la producción de biomasa

Término	Coefficiente de Regresión	Error estándar	Valor de P
Intercepto	14,926	1,588	0,00255 **
X ₁	7,650	1,730	0,02149 *
X ₂	0,827	1,730	0,66518
X ₃	7,712	1,730	0,02102 *
X ₄	0,597	1,730	0,75266
X ₁ : X ₂	0,865	1,730	0,65151
X ₁ : X ₃	6,300	1,730	0,03572 *
X ₂ : X ₃	0,622	1,730	0,74287
X ₁ : X ₄	0,235	1,730	0,90057
X ₂ : X ₄	-0,132	1,730	0,94378
X ₃ : X ₄	0,032	1,730	0,98619
X ₁ : X ₂ :X ₃	0,745	1,730	0,69586
X ₁ : X ₂ :X ₄	0,050	1,730	0,97876
X ₁ : X ₃ :X ₄	-0,845	1,730	0,65878
X ₂ : X ₃ :X ₄	0,022	1,730	0,99044
X ₁ : X ₂ :X ₃ :X ₄	0,140	1,730	0,94061

Codificación de factores: X₁, glucosa; X₂, pH; X₃, CSL; X₄, SW; “:” significa interacción entre factores.

Codificación para la significancia estadística: * P < 0,05; ** P < 0,005

Error estándar residual: 6,921 con 3 grados de libertad

R cuadrado: 0,9472; R cuadrado ajustado: 0,6834

Tabla 6.4- Experimentos para seleccionar las variables significativas para la producción de biomasa con *A. limacinum* SR21

DOE	Factores significativos						Otros factores ensayados no significativos
	Glucosa		CSL		Log (inóculo)		
	Rango (%)	Pendiente	Rango (%)	Pendiente	Log (cél ml ⁻¹)	Pendiente	
PB1	0,5-3,5	***3,181	0.5-2.0	-0,028	6,2	-	SW (0,35-3,15%), YE (0,1-0,8%)
PB2	2,0-9,0	*1.128	0,5-5,0	**0,070	5,9	-	SW (0.70-3.50%), pH (4-7)
PB3	2,0-10,0	*10.201	3,0-14,0	*7,451	6,3	-	SW (0,70-3,50%)
FFr1	2,0-9,0	*7.650	1,0-11,0	*7,712	6,3	-	SW (0,35-3,50%), pH (4,5-7,0)
FFr2	6,5-13,5	*-2.778	**2,5-15,0	**4,941	3,0-6,0	*3,247	KH ₂ PO ₄ (0,1-1,0%)

Códigos para el nivel de significancia: * P < 0,05; ** P < 0,005; *** P < 0,0005

Tabla 6.5- Agrupamiento de los datos de los diseños de selección

		Grupo					
		1	2	3	4	5	6
Ensayos por grupo		8	10	26	13	12	4
Número de ensayos que contribuyeron al experimento	PB1			13			
	PB2		3	6	4		
	PB3	4	3	3		3	
	FFr1	4		4	5	4	
	FFr2		4		4	5	4
Peso seco promedio (SE)		14,0 (3,0)	25,3 (2,0)	8,4 (0,8)	13,6 (2,5)	34,8 (2,6)	38,4 (1,9)

Las dos primeras filas de la tabla muestran el número de tratamientos discriminados por experimento que fueron asignados a cada grupo. La última columna muestra el promedio del peso seco para cada grupo y su error estándar (SE).

Tabla 6.6- Efecto de la edad del inóculo y de la relación molar C:N del medio de producción sobre la producción de biomasa (peso seco), lípidos y DHA

Relación C:N	Edad del inóculo (d)	Peso seco (g l ⁻¹)	Lípidos (g l ⁻¹)	DHA(g l ⁻¹)
10:1	2,0	5,20 ± 0,01	1,10 ± 0,42	0,14 ± 0,01
10:1	5,0	9,65 ± 0,49	0,75 ± 0,21	0,29 ± 0,03
55:1	3,5	45,8 ± 0,85	29,25 ± 2,47	7,00 ± 0,50
100:1	2,0	42,05 ± 0,92	29,40 ± 0,71	5,00 ± 0,50
100:1	5,0	44,05 ± 1,20	28,50 ± 0,75	6,50 ± 0,50

Tabla 6.7- Efecto del tratamiento y del tamaño del cultivo en MOC antes de la transferencia a MP sobre la producción de biomasa (peso seco), lípidos y DHA

Tratamiento anterior a la transferencia a MP		Peso seco (g l ⁻¹)	Lípidos (g l ⁻¹)	DHA (g l ⁻¹)
Centrifugación	Lavados			
Transferencia completa (100%)				
Si	Si	43,70 ± 0,28	26,60 ± 0,71	9,50 ± 1,00
Si	No	44,95 ± 0,78	26,90 ± 0,42	9,75 ± 1,00
Transferencia parcial (10%)				
No	No	37,80 ± 0,01	25,65 ± 0,07	7,75 ± 1,00

FIGURAS

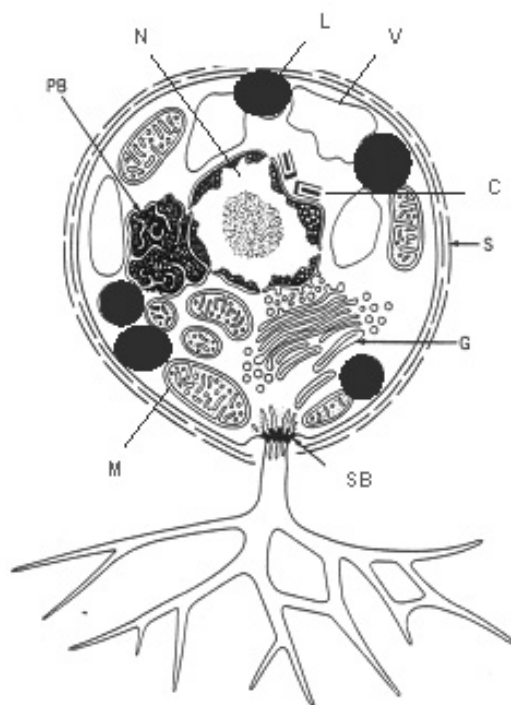


Figura 1.1- Características ultraestructurales de una célula vegetativa de *Thraustochytrium* (*Labyrinthulomycetes*). El citoplasma contiene mitocondrias con crestas tubulares (M), gránulos de lípidos (L), vacuolas irregulares (V) y el aparato de Golgi (G). Adyacentes al núcleo (N) se encuentran un par de centriolos (C) y el retículo endoplasmático que se presenta como un cuerpo paraneuronal (PB). La pared está compuesta por varias capas de escamas (S), interrumpida únicamente por la red ectoplasmática (EN), la cual se forma a partir del sagenogeno basal (SB). Según Porter (1990).

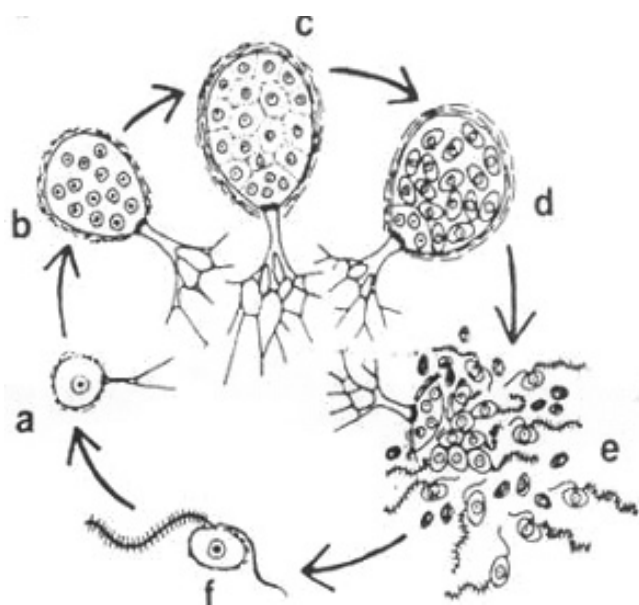


Figura 1.2- Ciclo asexual de *Thraustochytrium* (*Labyrinthulomycetes*). La célula vegetativa joven (a) incrementa de tamaño y experimenta divisiones nucleares (b). El protoplasma se cliva progresivamente (c) y la pared se disuelve (d), liberando zoosporas (e), que nadan hasta encontrar un sustrato (f) sobre el cual se fijan, y crecen para formar una nueva célula vegetativa joven (a). Según Porter (1990).

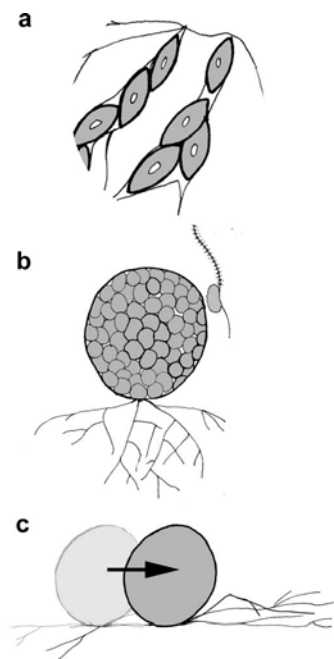


Figura 1.3- Grupos principales de *Labyrinthulomycetes*. (a) Labirintuales, con células en forma de huso, envueltas dentro de la red ectoplasmática. (b) Traustochytriales, con células globosas unidas al sustrato mediante la red ectoplasmática y formación de esporas flageladas (zoosporas). (c) Aplanoquitriales, con aplanosporas que se desplazan arrastrándose sobre el sustrato mediante la red ectoplasmática. Según Leander et al. (2004).

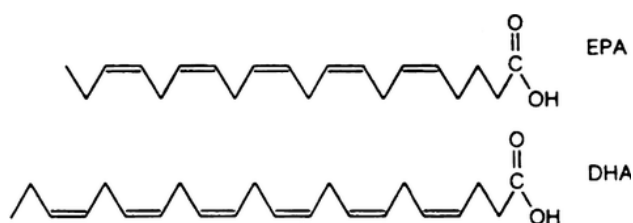


Figura 1.4- Representación esquemática de los ácidos eicosapentaenoico (EPA) y docosahexaenoico (DHA) pertenecientes a la familia de los omega 3 por presentar el primer doble enlace en la posición 3 a partir del extremo metilo Según Sijsma & de Swaaf (2004).

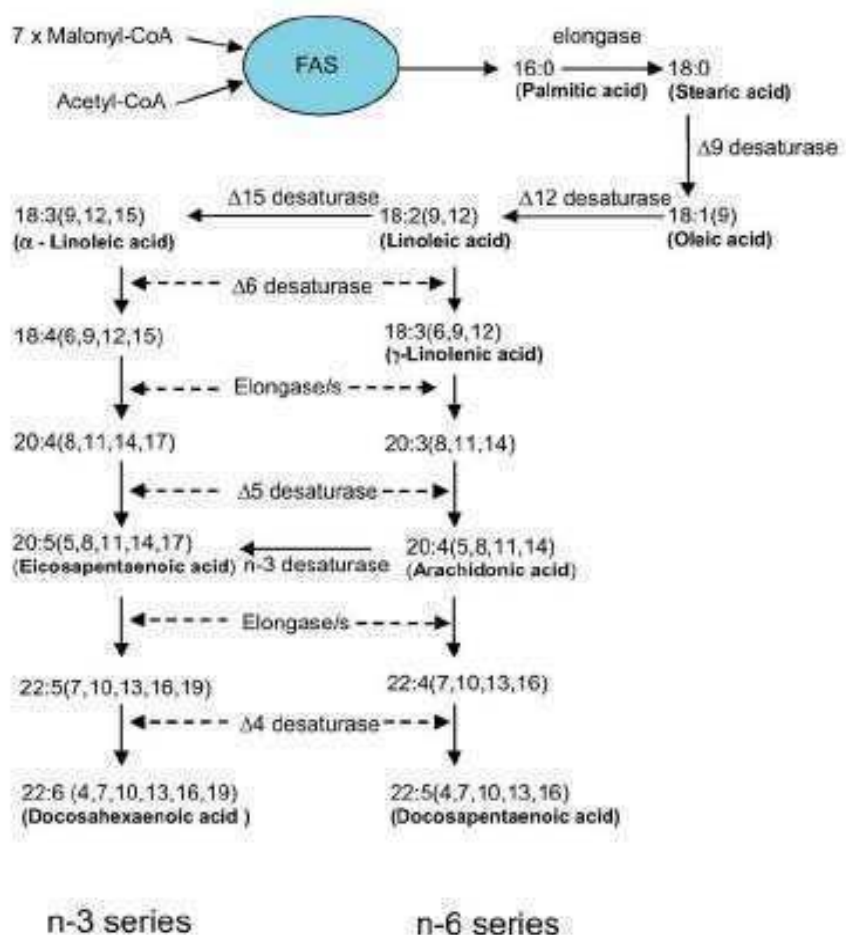


Figura 1.5- Vía biosintética de PUFAs en los organismos que utilizan la ruta FAS convencional. La n-3 desaturasa que permite la conversión de ARA en EPA ha sido solamente documentada para *M. alpina* y *S. diclina*. Según Radledge (2004).



Figura 2.1- Sitios de recolección de material según campañas:

I. Punta Rasa
 II y XII. Laguna La Salada (Bs. As.)
 III. Caleta Potter
 IV. Mar Chiquita
 V y X. Las Grutas
 VI. Comodoro Rivadavia y alrededores.
 VII. Puerto Madryn.
 VIII. Puerto Pirámides
 IX. San Antonio Oeste
 XI y XV. Bahía Blanca
 XIII. Bahía de Ea. El Túnel (Tierra del Fuego)
 XVI. Puerto San Julián
 XVII. Puerto Deseado.
 Para información adicional ver
 Materiales y Métodos.
 Mapa extraído de www.ign.gob.ar,
 Instituto Geográfico Nacional de la
 República Argentina.

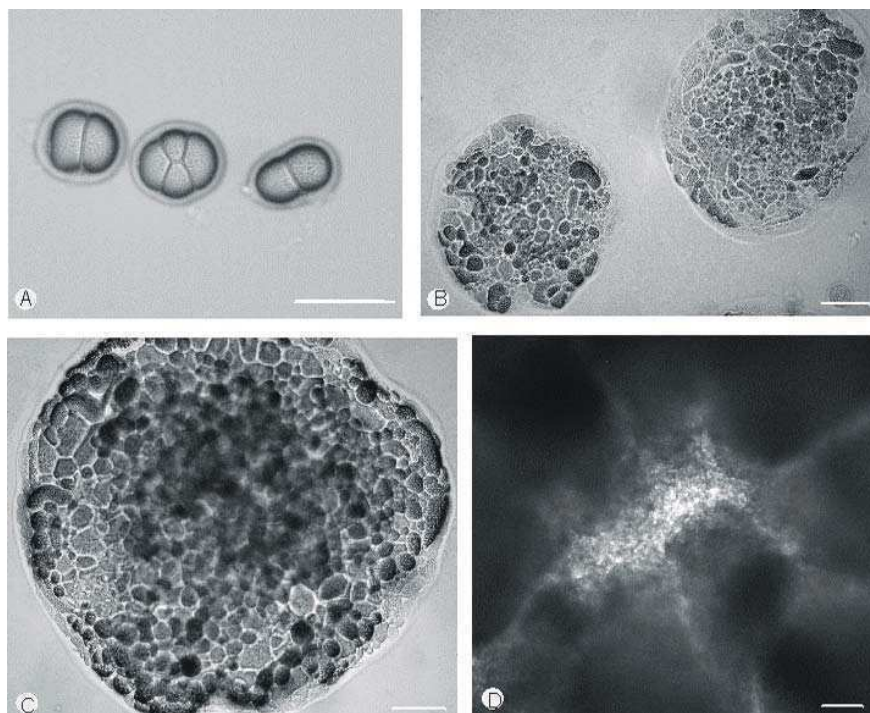


Figura 2.2- Cultivos representativos de cada Valor de Crecimiento Relativo (VCR). A. VCR 1: Células aisladas o en grupos pequeños de no más de 4. B. VCR 2: Colonias pequeñas (diámetro < 0,5 mm), células en una sola capa (crecimiento en dos dimensiones). C. VCR 3: Colonias de mayor tamaño (diámetro > 0,5 mm), las células en el centro de la colonia están fuera de foco debido al crecimiento en tres dimensiones. D. VCR 4: Cultivo confluyente, las colonias no pueden identificarse. Las escalas indican 0,1 mm.

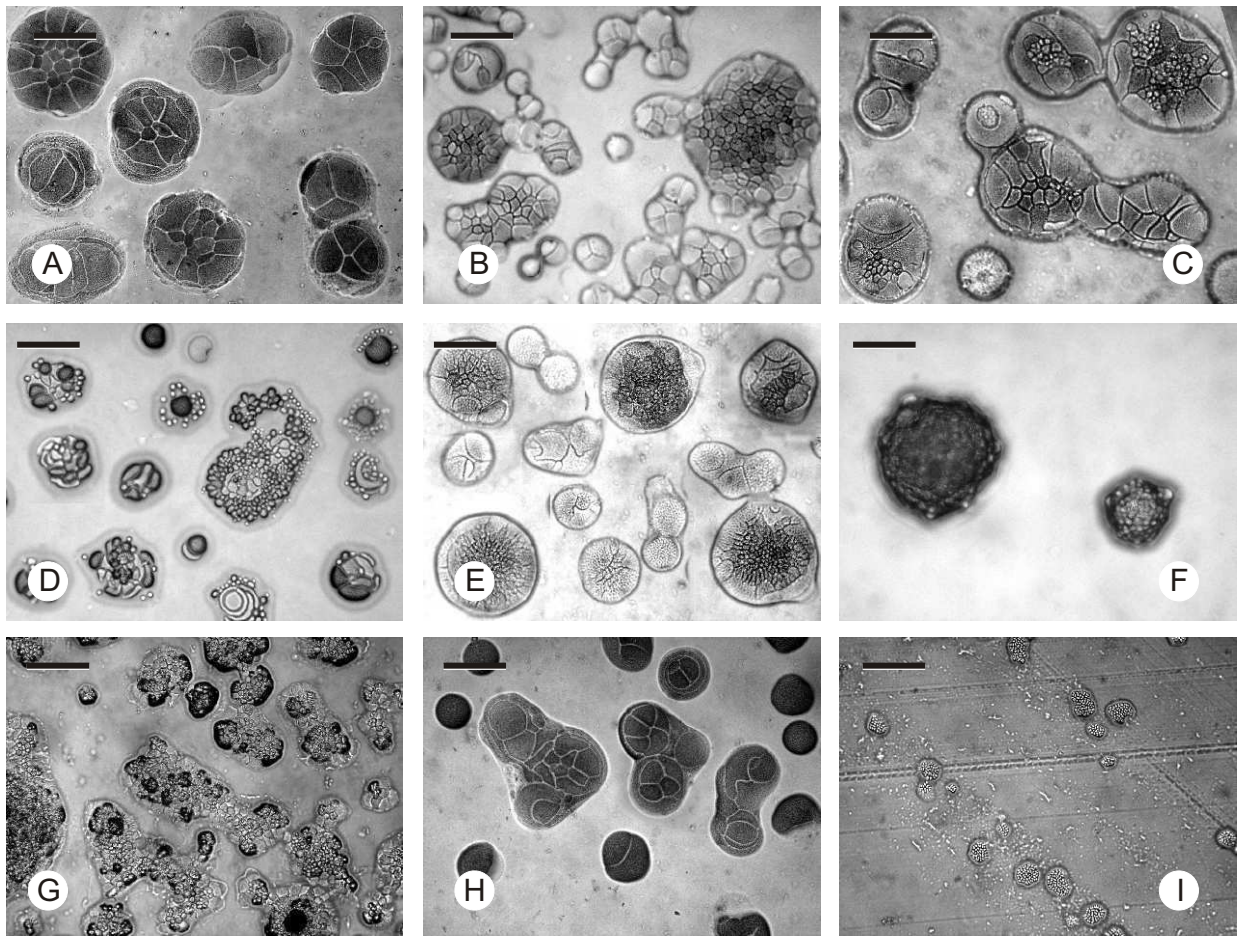


Figura 2.3- Patrones particulares de colonias de los aislamientos de Mar Chiquita. A. Mosaico básico (cepas MC2A, MC4A, MC6B, MC47C-D y MC48A). B. Mosaico con arreglo similar al de los vitreales (cepas MC46A-C). C. Mosaico con células vacuoladas (cepa MC45E). D. Mosaico, que prospera sólo en medio SSA (cepa MC3D). E. Mayolica (cepa MC12A2). F. Mórula acotada (cepa MC2H). G. Mórula expandida (cepas MC6H, MC21D', MC50A-B2-F2-I2). H. Mosaico con características marcadamente similares a los vitreales (cepa MC18A). I. Paquetes sarcinoides (cepa MC46B). Las escalas indican 100 µm.

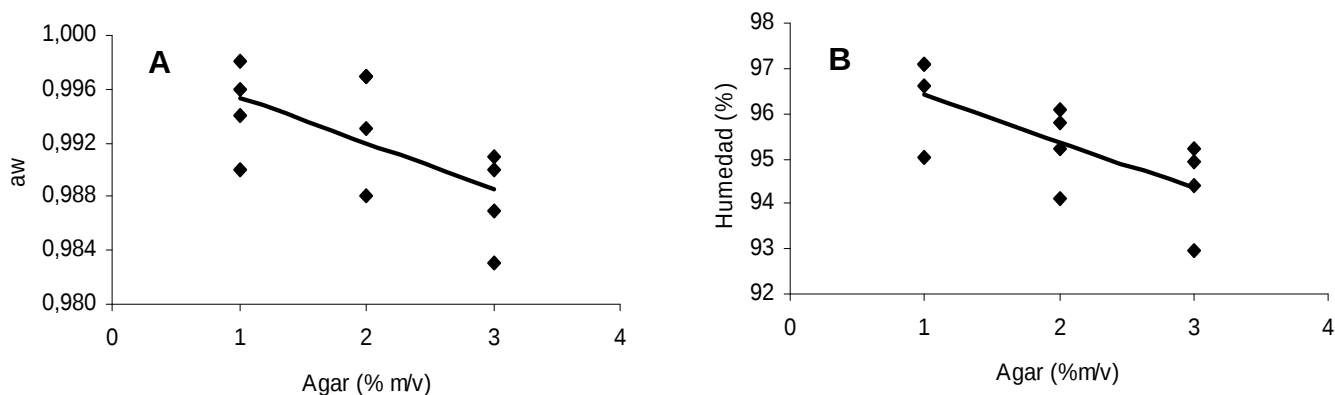


Figura 2.4- Relación entre el porcentaje de agar y A. la actividad agua (a_w) o B. el porcentaje de humedad. Los datos se ajustaron al modelo lineal $Y = a + b \times X$, obteniéndose las ecuaciones:
 $a_w = 0,99875 - 0,003375 \times \text{agar (\% m/v)}$ y $\text{humedad (\%)} = 97,45 - 1,0375 \times \text{\% agar (\% m/v)}$.

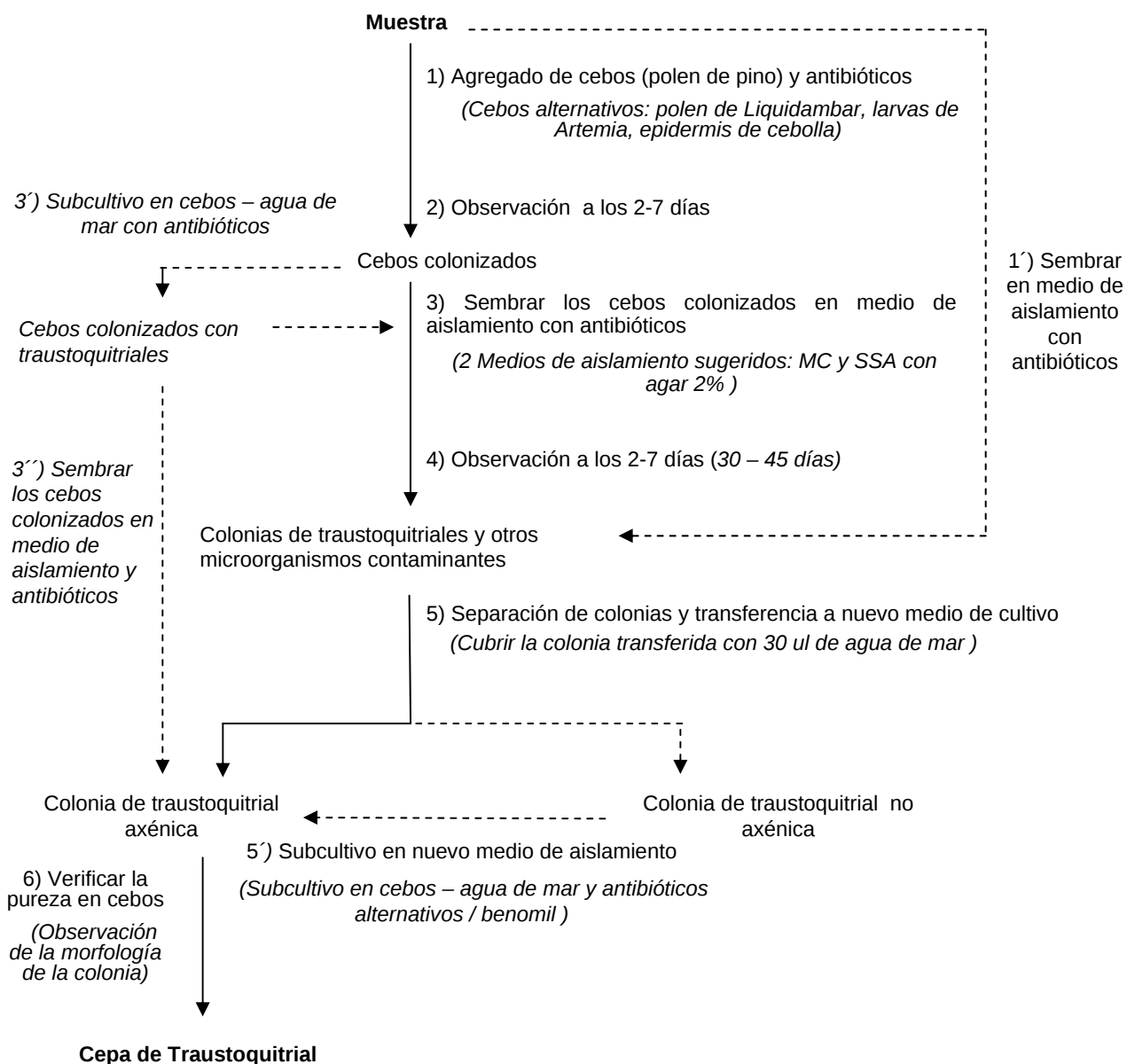


Figura 2.5- Diagrama de flujo de los procedimientos básicos (líneas continuas) y alternativos (líneas punteadas) propuestos para el aislamiento de una cepa de traustequitrial a partir de una muestra. Los ajustes sugeridos en este capítulo se muestran en letra cursiva

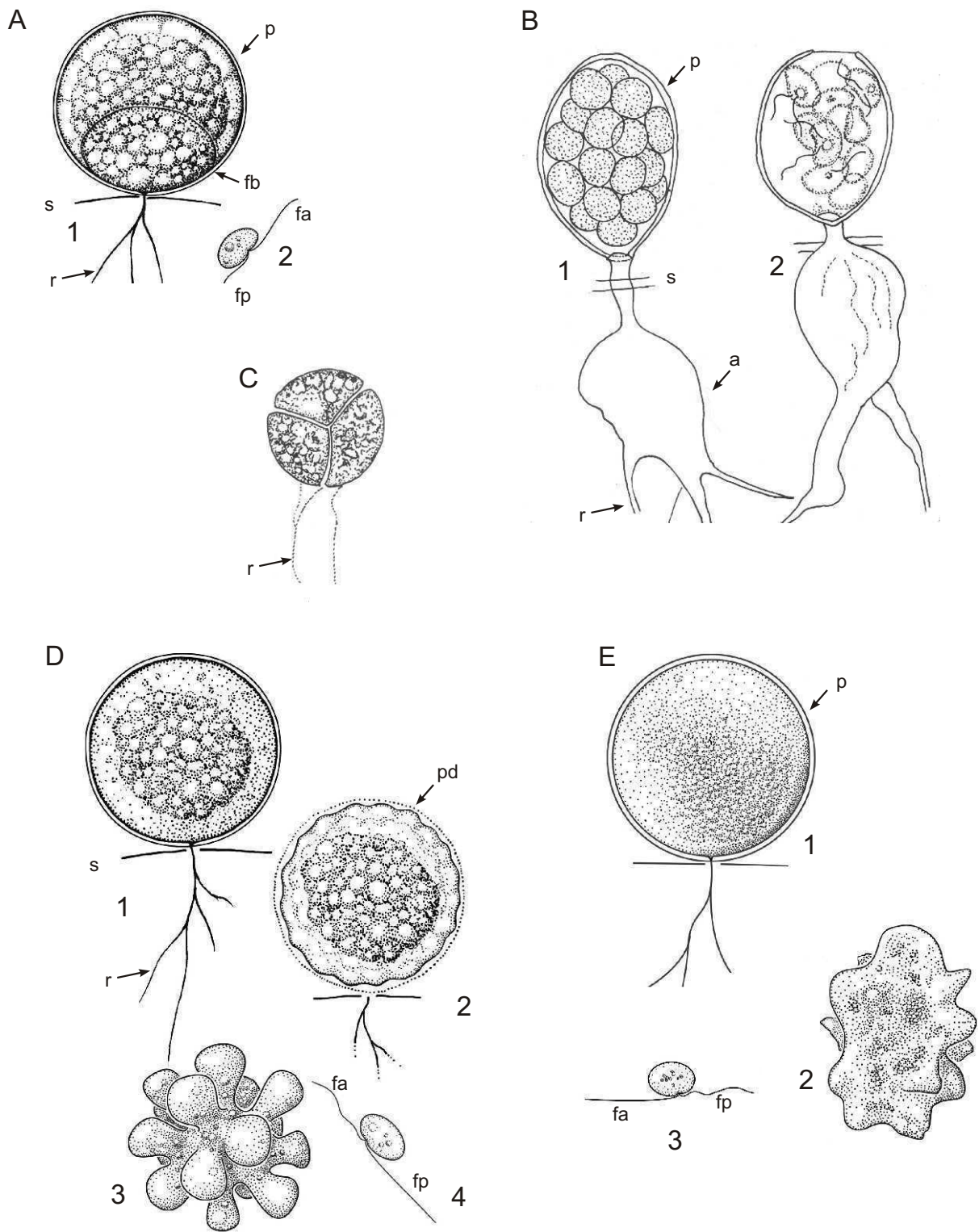


Figura 3.1- Aspecto general de las células vegetativas y/o esporangios de los principales géneros de traustochytriales. A. *Thraustochytrium* sp. 1: esporangio maduro con un fundamento basal. 2: zoospora. B. *Japonochytrium* sp. 1: célula vegetativa joven con apófisis y rizoides. 2: esporangio maduro conteniendo zoosporas incipientemente formadas. C. *Schizochytrium* sp.: tétrada de células con rizoides. D. *Ulkenia radiata*. 1: esporangio maduro. 2: liberación del protoplasto ameboidal por disolución de la pared celular. 3: protoplasto con forma estrellada. 4: zoospora. E. *Ulkenia visurgensis*. 1: esporangio maduro. 2: protoplasto ameboidal. 3: zoospora. Abreviaturas: a, apófisis; fa, flagelo anterior; fp, flagelo posterior; p, pared celular; pd, pared celular en disolución; r, sistema rizoidal; s, sustrato. A, D y E según Rosa et al. 2006; B y C según Karling 1981.

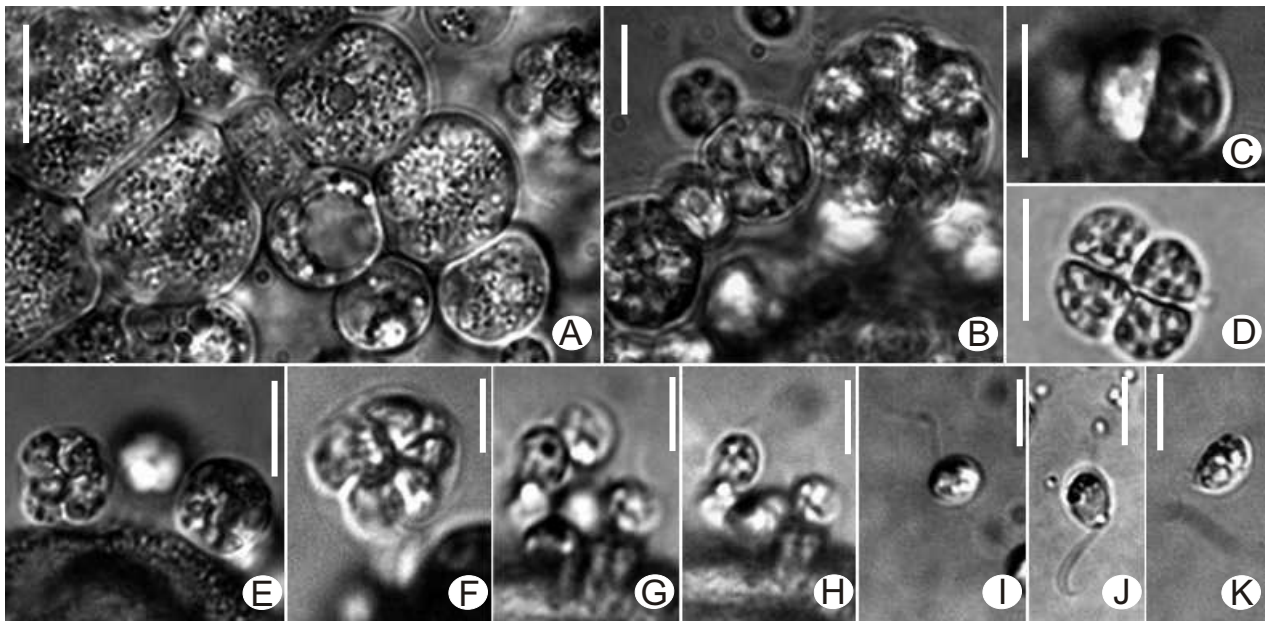


Figura 3.2.- Aspecto general del crecimiento y la zoosporulación de *Schizochytrium* aff. *octosporum* (cepa A11). A y B: Crecimiento sobre *Artemia* y granos de polen, respectivamente. Nótese que en el cebo animal las células alcanzan un tamaño mayor y presentan una considerable acumulación de lípidos. C y D: Grupos de dos y cuatro células originadas por división vegetativa. E-H: Secuencia de zoosporulación. Nótese que las ocho zoosporas salen nadando del esporangio, cuya pared no persiste. I-K: Zoosporas heterocontas. Temperatura de incubación: 25°C. Las escalas indican 10 µm para A, B, D y E, y 5 µm para C y F-K.

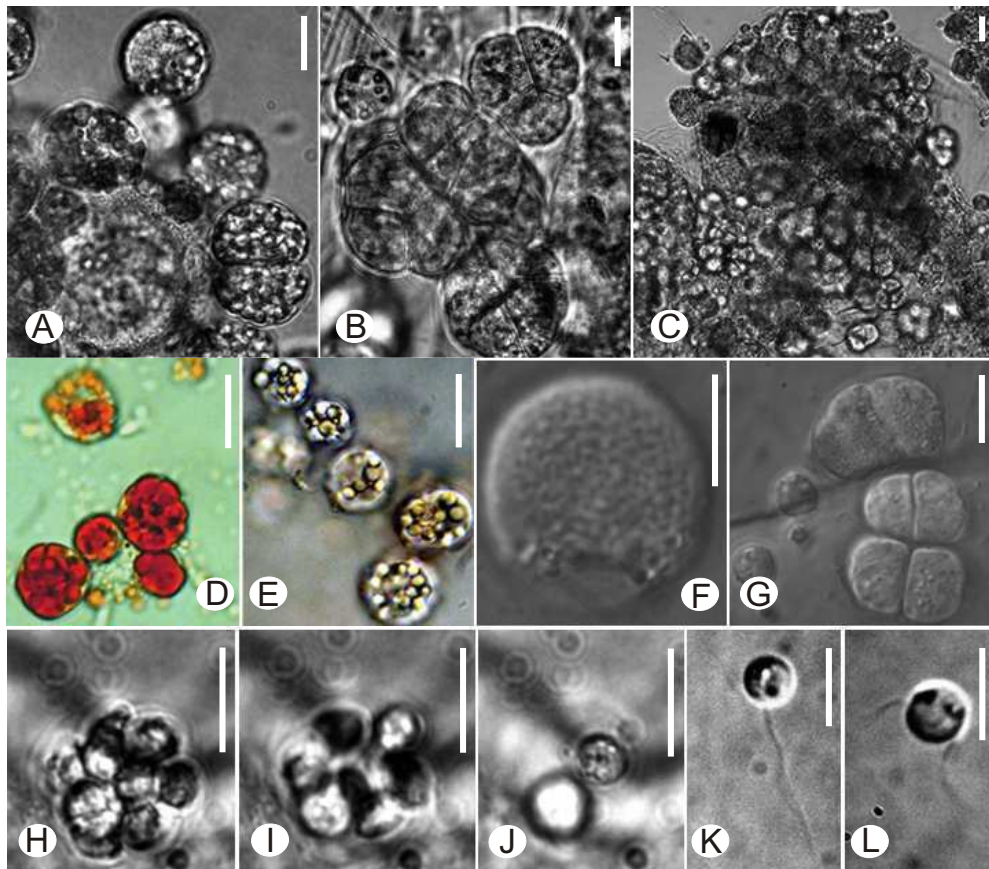


Figura 3.3.- Aspecto general del crecimiento y la zoosporulación de *Schizochytrium* sp. b (cepa AA5). A-C: Crecimiento sobre granos de polen (A) y *Artemia* (B y C). Nótese que en el cebo animal presenta células de tamaño mayor que forman grandes grupos (B) y que lo coloniza por completo (C). D y E: Células con gran contenido lipídico, que se detectó tiñendo con Sudan IV (D). F: Esporangio joven. G: Grupos de dos y cuatro células originadas por división vegetativa. H-J: Sec. de zoosporulación. Nótese que el esporangio contiene numerosas zoosporas. K-L: Zoosporas heterocontas.. Temperatura de incubación: 4°C. Las escalas indican 10 µm para A- J y 5 µm para K-L.

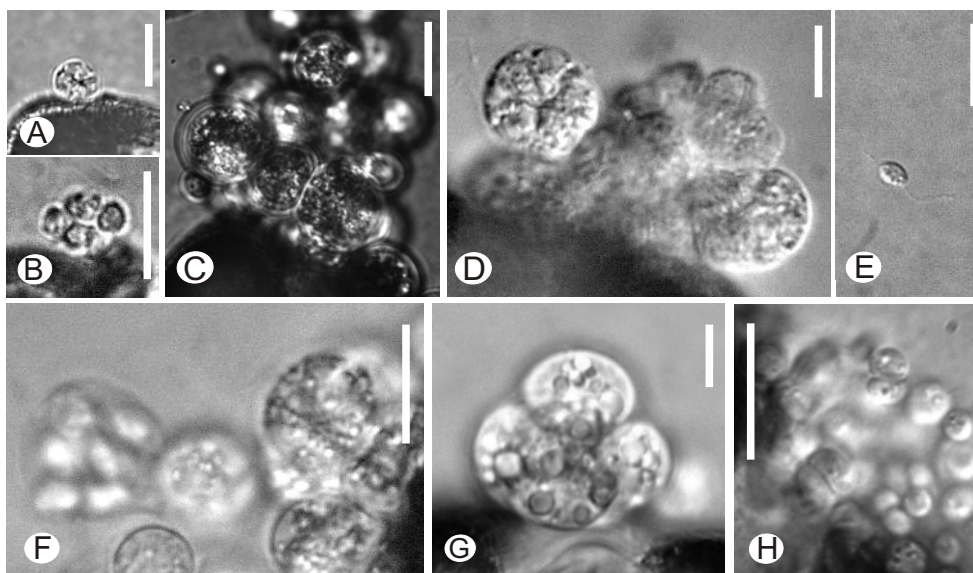


Figura 3.4.- Aislamientos de *Schizochytrium* sp. de la zona de la laguna de Mar Chiquita. A-C: *Schizochytrium* sp. c. (aislamiento MC2H). A: Esporangio joven, con los primeros signos de clivaje. B: Esporangio clivado conteniendo cuatro zoosporas y sin fundamento basal. C: Células tróficas secundarias, originadas por división vegetativa, que darán origen a futuros esporangios. D-G: *Schizochytrium* sp. d (aislamiento MC50A). D: Esporangio joven, con los primeros signos de clivaje. E: Zoospora heteroconta. F: Esporangio conteniendo 8 zoosporas moviéndose en su interior, por lo que se encuentran fuera de foco. G: Grupo de células originadas a partir de divisiones vegetativas. H: *Schizochytrium* sp. f (aislamiento MC46B): Grupos de 2 células pequeñas, producto de la división vegetativa. Las escalas indican 10 µm.

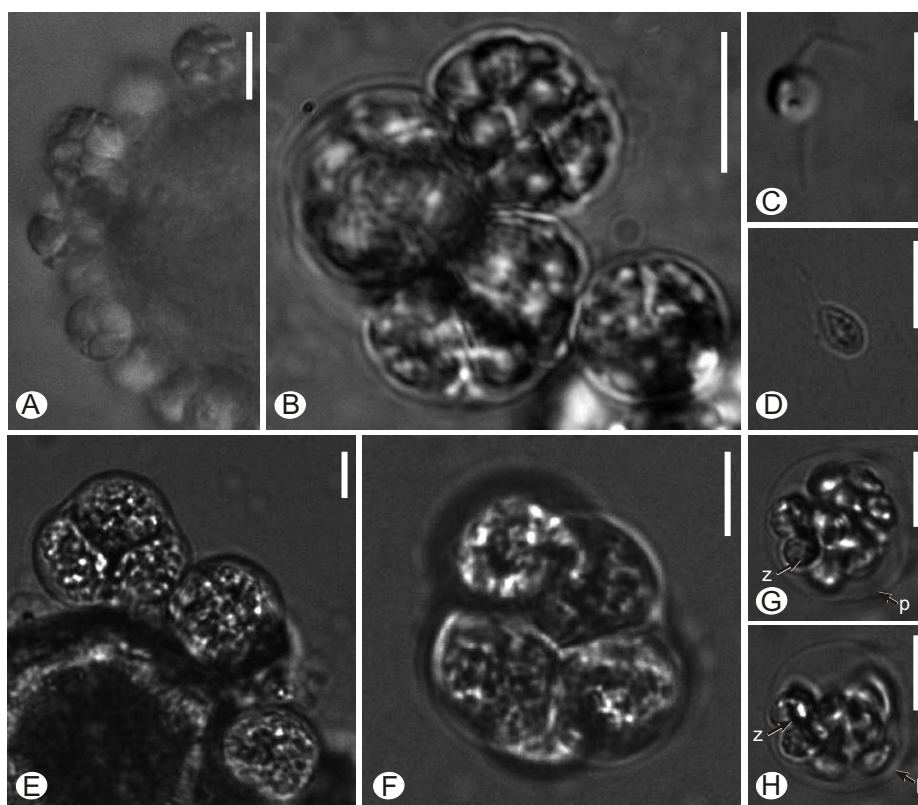


Figura 3.5.- Cepas de la región patagónica asignadas al género *Schizochytrium*. A-C: *S. sp. h* (aislamiento LGII). A: Células vegetativas sobre grano de polen. B: Grupos de células originadas por división vegetativa. C: Zoospora heteroconta. D-H: *S. sp. i* (aislamiento S48cmc). D: Zoospora heteroconta. E: Células tróficas originadas por división vegetativa sobre grano de polen. F: Agregado celular. G-H: Esporangios con zoosporas (z) nadando en el interior, contenidas por la pared (p). Las escalas indican 10 µm.

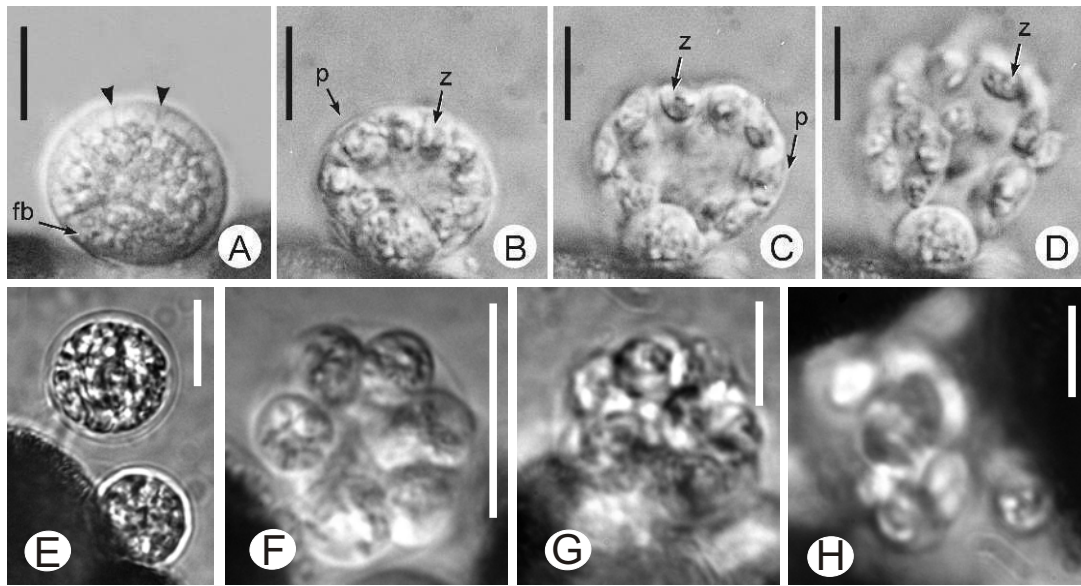


Figura 3.6.- Aislamientos de *Thraustochytrium*. A-D: *T. aff. antarcticum* (aislamiento LSA4). A: esporangio en maduración mostrando el fundamento basal (fb) y la periferia hialina de la zona esporógena con signos de clivaje (puntas de flecha). B-D: secuencia fotográfica (aproximadamente 5 s) de la rápida liberación de las zoosporas (z), acompañada por la disolución de la pared del esporangio (p). E-F: *T. aff. aureum* (aislamiento MC18A). E: Célula vegetativa con pared gruesa. F: Grupo de células que quedaron contenidas dentro del esporangio. G-H: *T. aff. globosum* (aislamiento MC12A2). G: Esporangio clivado, sin fundamento basal. H: Zoosporas moviéndose, fuera de foco; pared del esporangio parcialmente persistente. Las escalas indican 10 μ m.

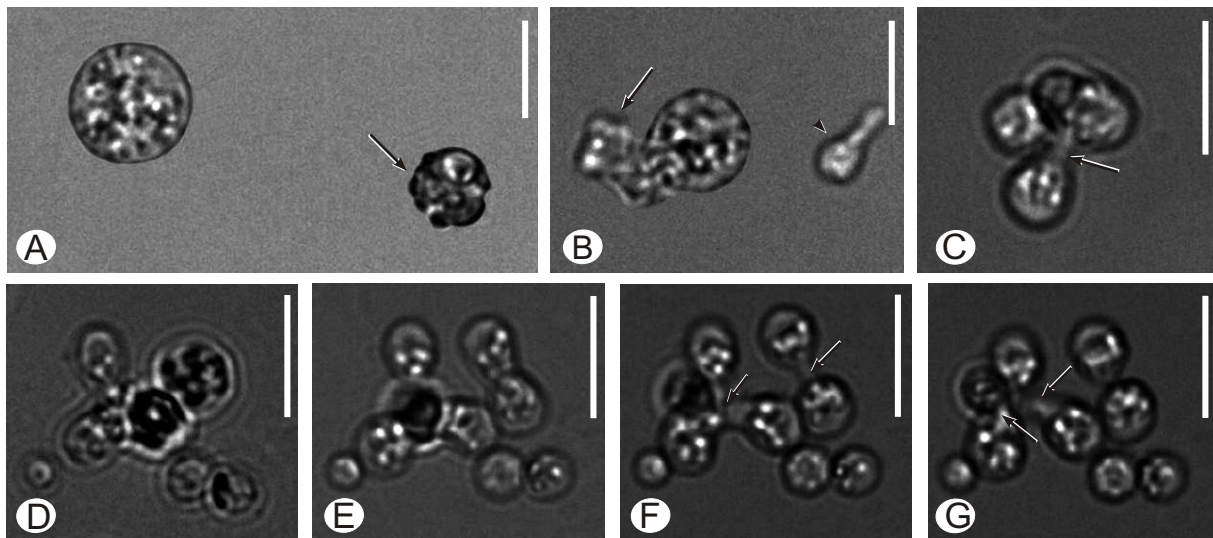


Figura 3.8.- Aislamiento de *Ulkenia aff. minuta* (S26-1). A: Célula vegetativa y protoplasto ameboidal secundario (flecha). B: Protoplasto ameboidal con prolongaciones lobuladas (flecha, fuera de foco por el movimiento) y amebospora (punta de flecha). C-G: Protoplasto ameboidal que por biparticiones sucesivas genera amebosporas, las cuales luego se diferenciarán en zoosporas; obsérvense las delicadas bridas de protoplasma (flecha) que conectan las 2 amebosporas al diferenciarse por bipartición. Las escalas indican 10 μ m.

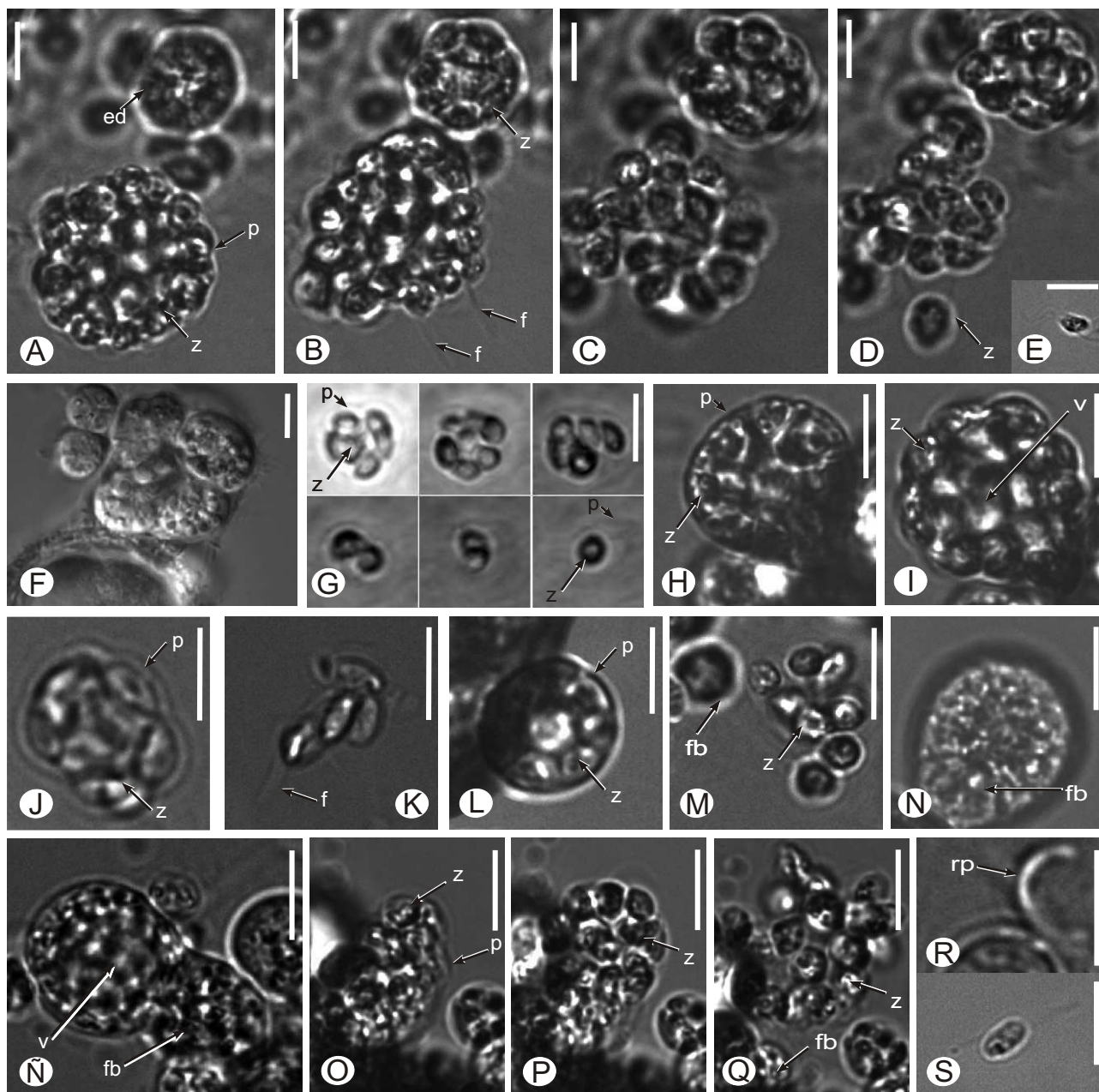


Figura 3.7- Cepas de la región patagónica asignadas al género *Thraustochytrium*. A-E: *T. aff. striatum* (b) (aislamiento S33A). A-D: Zoosporogénesis. A: Esporangio en el que las zoosporas (z) aún están contenidas por la pared (p); también se observa un esporangio en desarrollo (ed) de menor tamaño, en el que comienzan a diferenciarse las zoosporas. B: Grupo de zoosporas, algunas de las cuales han desarrollado los flagelos (f) y comienzan a moverse; la pared se ha disuelto completamente; el esporangio joven presenta zoosporas en la periferia. C-D: Las zoosporas se alejan nadando; el esporangio joven termina de diferenciar las zoosporas. E: Zoospora heteroconta. F-G: *T. sp. a* (aislamiento S12). F: Células vegetativas sobre grano de polen. G: Zoosporogénesis. H-I: *T. aff. striatum* (c) (aislamiento S50sp). H: Esporangio mostrando los primeros signos de clivaje de las zoosporas (z). I: Esporangio en un estadio posterior mostrando las zoosporas en la periferia que son empujadas por una vacuola central (v). J-K: *T. aff. striatum* (c) (aislamiento S2sp). J: Esporangio con las zoosporas moviéndose en la periferia, contenidas por la pared (p). K: Grupo de zoosporas luego de la disolución completa de la pared, mostrando los flagelos (f) en activo movimiento. L-M: *T. sp. c* (aislamiento S48T). L: Esporangio. M: Grupo de zoosporas que se alejan nadando del fundamento basal (fb). N-S: *T. aff. kinnei* (aislamiento S26B). N-Ñ: Esporangios piriformes en los que se diferencia el fundamento basal y la vacuola central (v) que empuja las zoosporas contra la pared. O-Q: Zoosporulación. R: Resto de pared (rp) de la base del esporangio que persiste luego de que las zoosporas se liberaron. S: Zoospora heteroconta. Las escalas indican 10 µm.

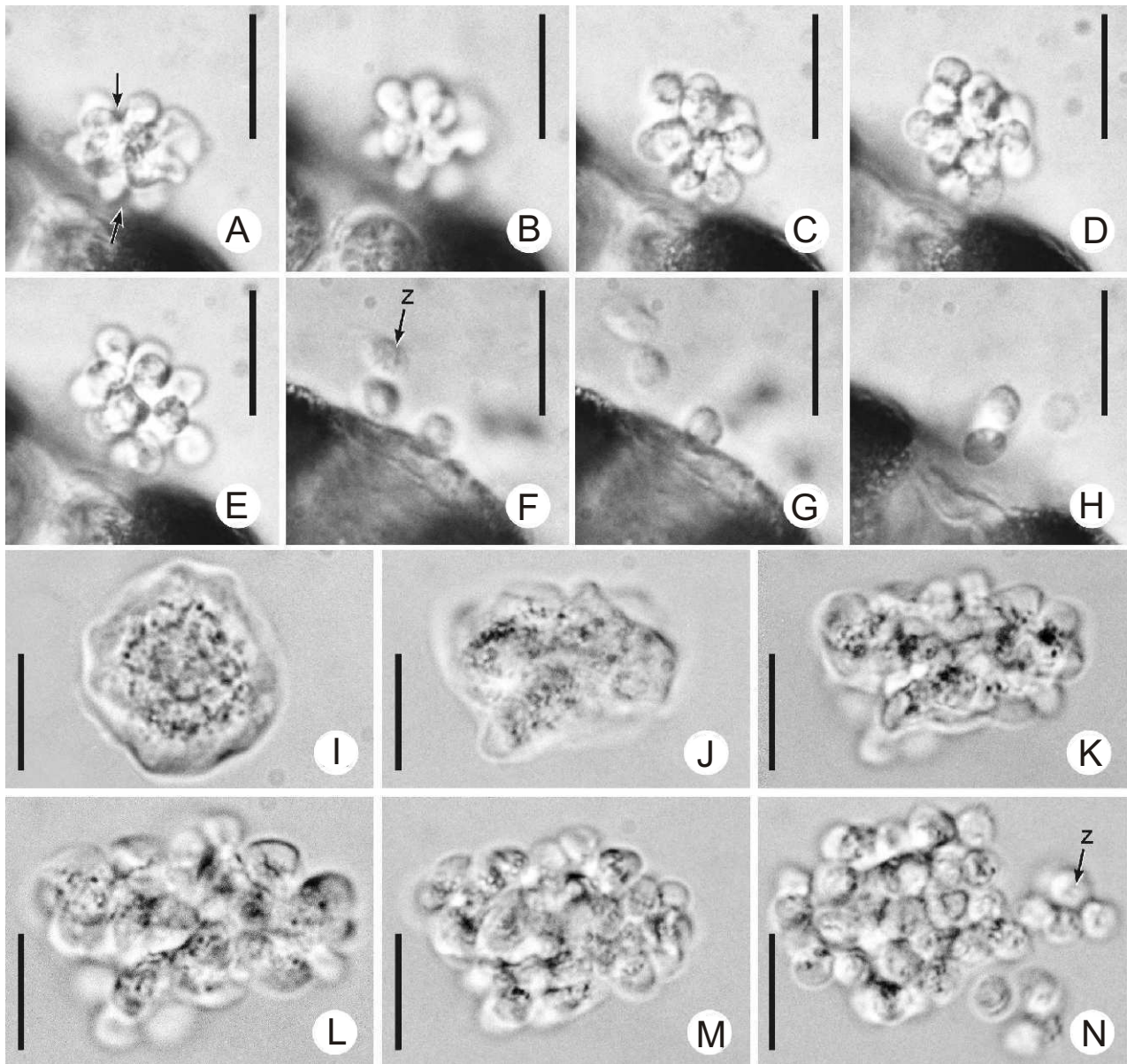


Figura 3.9- Aislamientos de *Ulkenia* de Punta Rasa y La Salada. A-H *Ulkenia* aff. *radiata* (cepas SB4A, SB6B, SB1D y LSA3): zoosporogénesis (lapso de aproximadamente 10 min). A: el protoplasto ameboidal ya liberado del esporangio, comienza a clivarse centripetamente (flechas) originando la característica forma estrellada. B: las incisiones se hacen más profundas. C: el cuerpo de las futuras esporas ya se ha definido, permaneciendo unidas por delicadas bridas citoplasmáticas, para luego, D: ir separándose lentamente. E-H: secuencia fotográfica de la disgregación del grupo de zoosporas (z.), seguida de la adquisición de movilidad de las mismas. I-N: *U. aff. visurgensis* (cepas LSA1 y LSB): zoosporogénesis (lapso de aproximadamente 10 min). I: el protoplasto acaba de emerger del esporangio y J: cambia su forma de modo irregular como una ameba. K-M: se evidencian lóbulos, que luego de clivarse definen el cuerpo de las futuras zoosporas. N: las jóvenes zoosporas (z.) adquieren movilidad sucesivamente y se alejan nadando. Las escalas indican 10 μ m. Según Rosa et al. 2006.

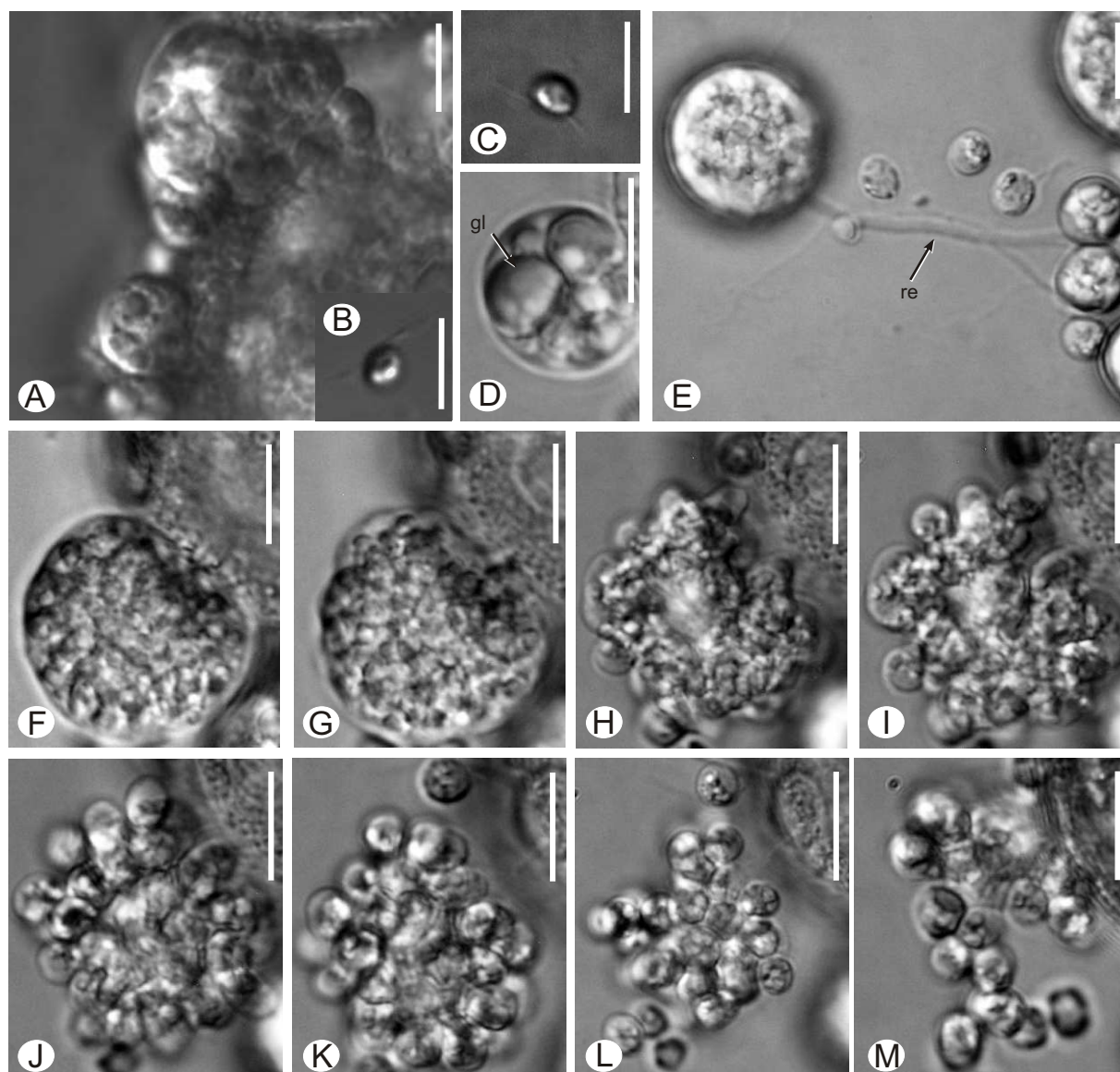


Figura 3.10- Cepas de la región patagónica asignadas a *Ulkenia* aff. *visurgensis*. A-B: aislamiento S3. A: Células vegetativas sobre grano de polen. B: Zoospora heteroconta. C-M: aislamiento S1. C: Célula vegetativa conteniendo numerosas gúttulas lipídicas (gl). D: Zoospora heteroconta. E: Célula vegetativa con una red ectoplasmática (re). F-M: Zoosporogénesis. Las escalas indican 10 μ m.

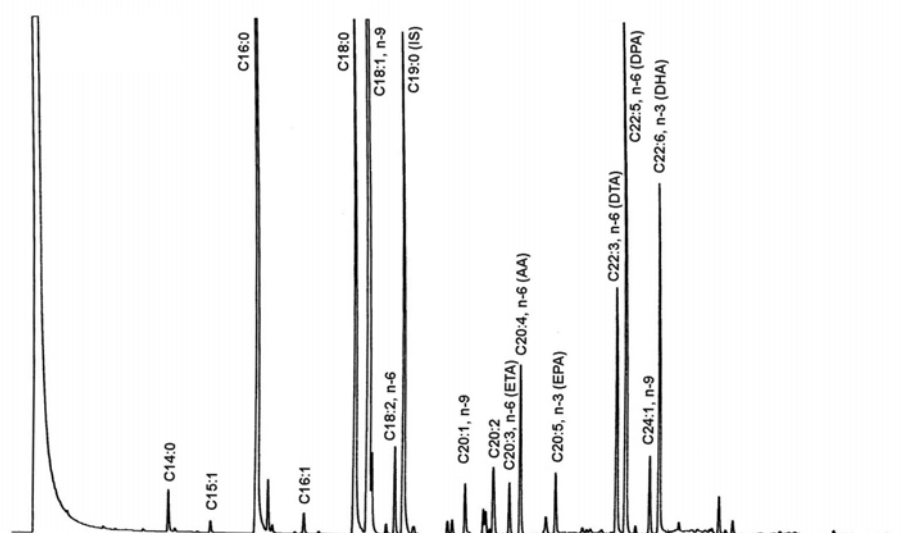


Figura 4.1- Cromatograma típico de identificación cuantitativa de ácidos grasos derivatizados (FAMES) correspondiente a la cepa S2rc. Se puede observar la presencia de PUFAs de cadena larga, en particular de ETA, AA, EPA, DTA, DPA y DHA. Los otros ácidos grasos con gran presencia son el palmítico (C16:0), esteárico (C18:0) y oleico (C18:1, n-9). El ácido nonadecanoico (C19:0) ha sido incluido como patrón interno a efectos cuantitativos.

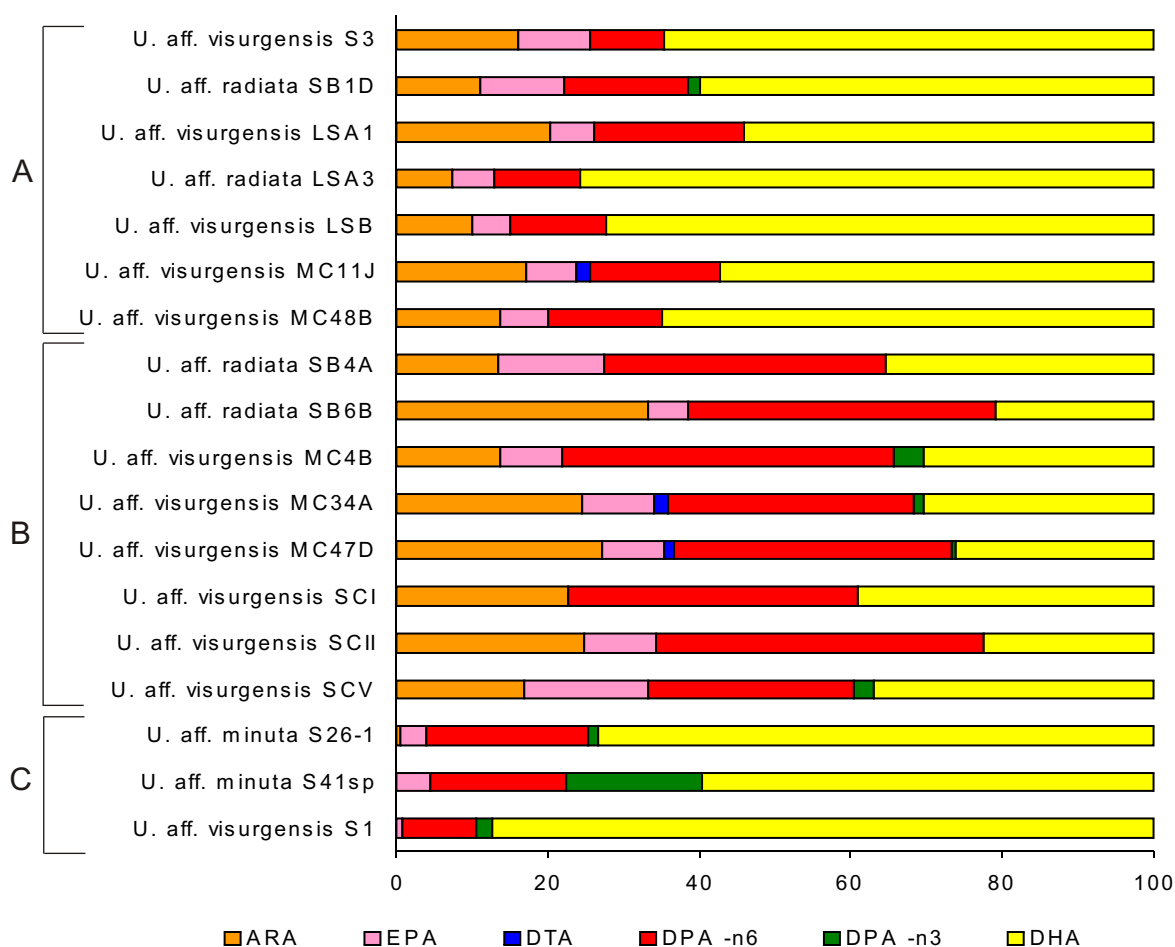


Figura 4.2- Agrupamiento de las cepas de *Ulkenia* sensu lato en base a su perfil de PUFAs con 4 o más insaturaciones. Las abreviaturas utilizadas se muestran en las tablas 1.2, 4.3 y en el texto.

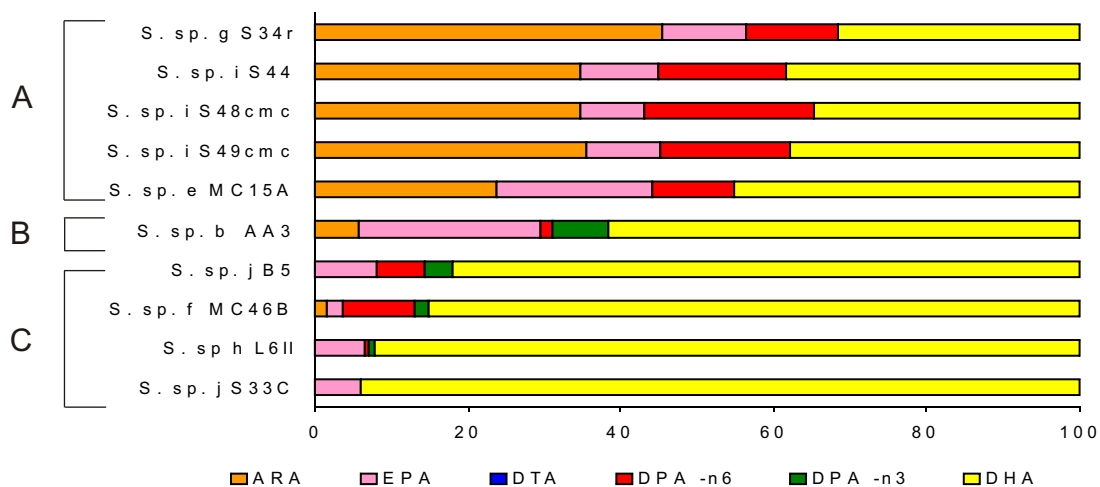


Figura 4.3- Agrupamiento de las cepas de *Schizochytrium* sensu lato en base a su perfil de PUFAs con 4 o más insaturaciones. Las abreviaturas utilizadas se muestran en las tablas 1.2, 4.3 y en el texto.

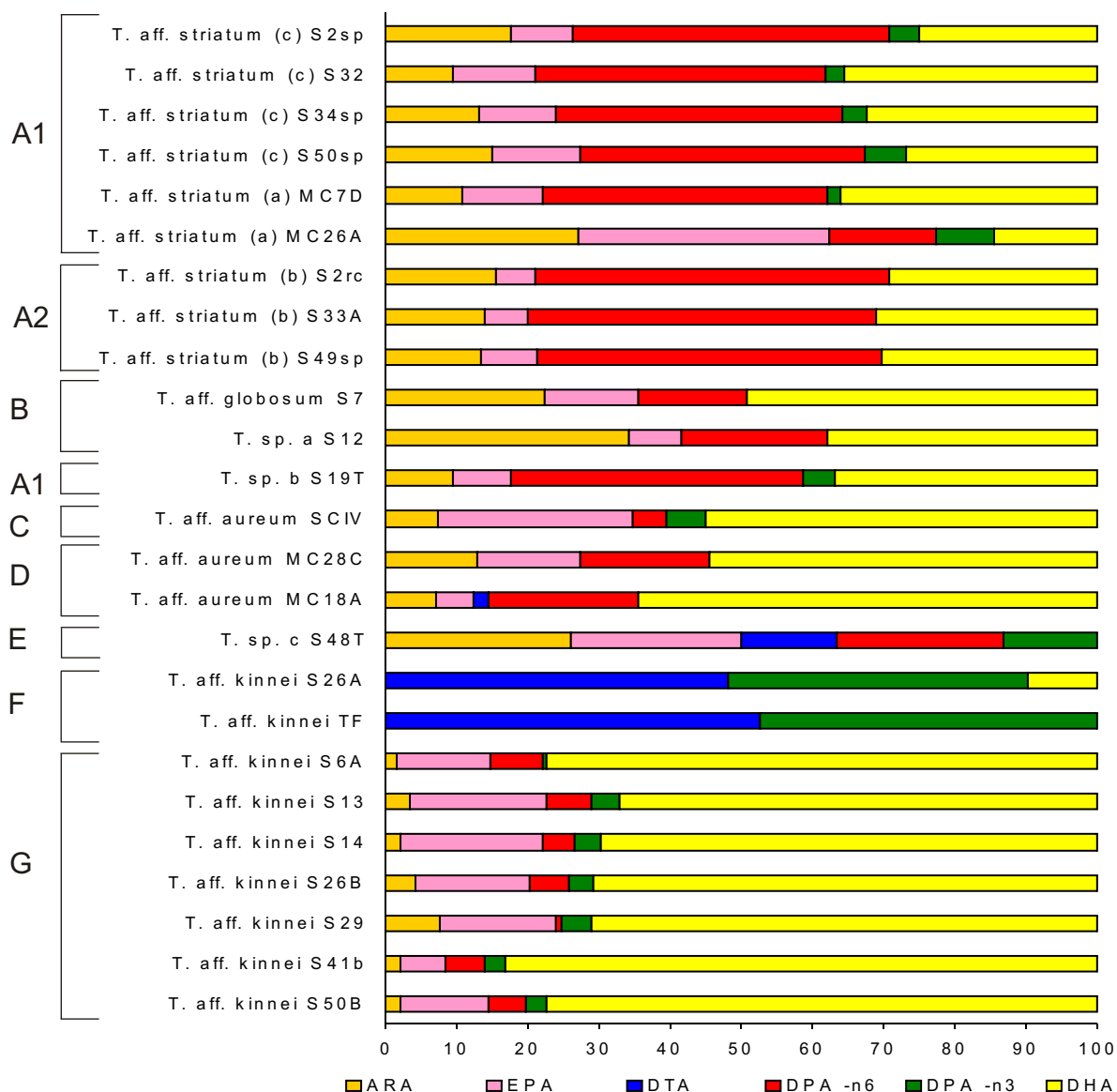


Figura 4.4- Agrupamiento de las cepas de *Thraustochytrium* en base a su perfil de PUFAs con 4 o más insaturaciones. Las abreviaturas utilizadas se muestran en las tablas 1.2, 4.3 y en el texto.

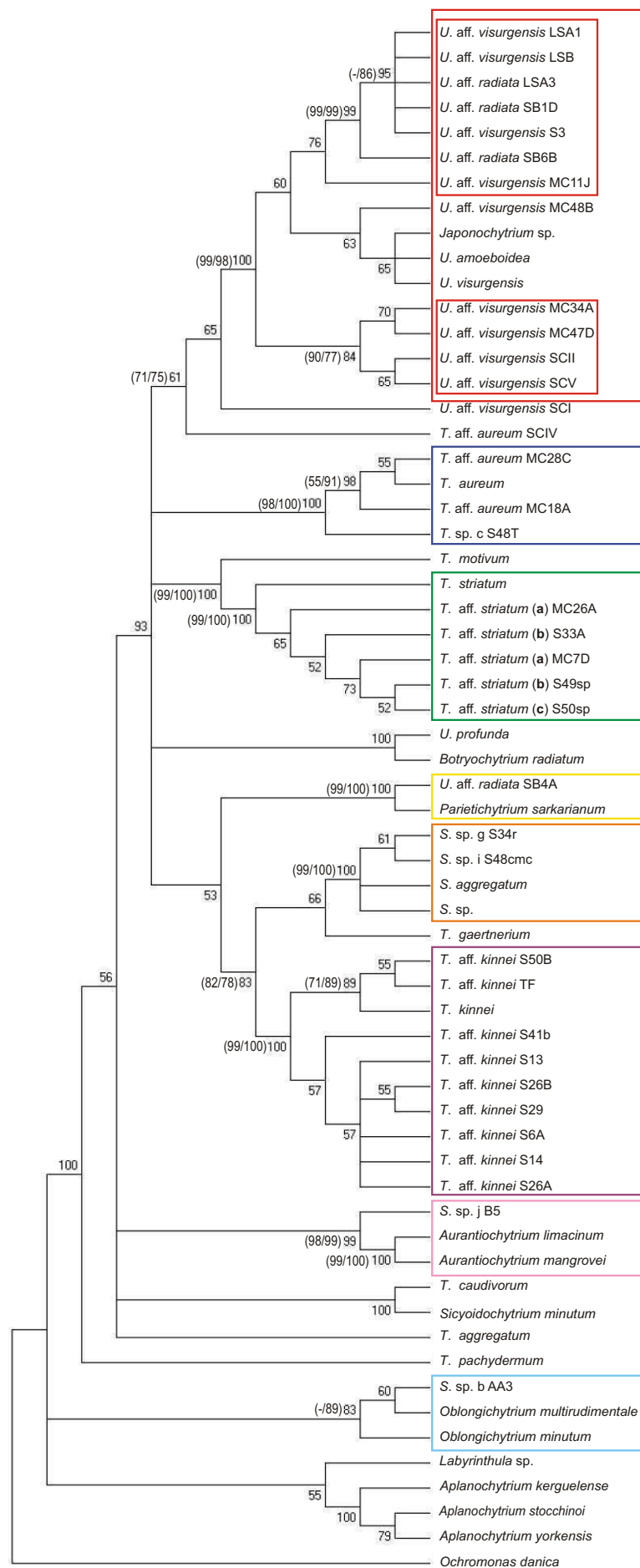


Figura 4.5- Árbol filogenético condensado (NJ) basado en el gen ARNr18S de las traustochytriales locales y aquellas disponibles en bases de datos con *O. danica* como grupo externo. Los números en cada rama interna muestran los valores de bootstrap para 1000 réplicas; en aquellos nodos comunes a los mejores árboles generados por los tres métodos empleados, se indican además entre paréntesis los valores de bootstrap de los análisis de MP y EM respectivamente. Para las cepas de *T. aff. striatum* se indica entre paréntesis el subgrupo al que fueron asignadas (ver tabla 3.2). Los recuadros de color remarcan los agrupamientos fuertemente soportados de las cepas locales con otras conocidas (ver capítulo IV, sección 4.4.3, para más detalles).

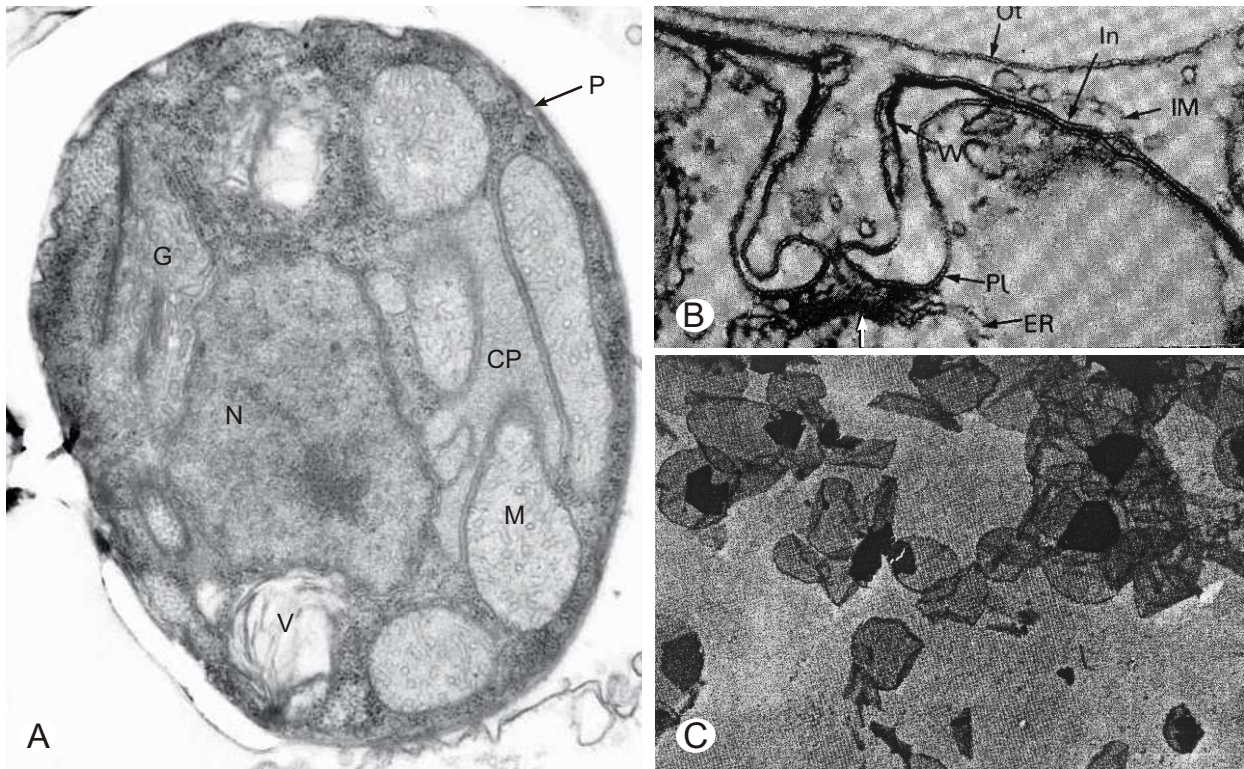


Figura 5.1- Micrografías de estructuras características de las traustochitriales. A. Célula vegetativa de *Oblongichytrium* sp. SEK 347 en la que pueden observarse el núcleo (N), la pared (P) formada por escamas, mitocondrias con crestas tubulares (M), el cuerpo paranuclear (CP), el aparato de Golgi (G) y vacuolas (V) (x28.000). B. Sagenógeno (señalado con una flecha vacía) mostrando la continuidad entre la membrana plasmática (PI) y la membrana interna de la red ectoplasmática. (In); también se indican las membranas internas (IM) y la membrana externa (Ot) de la red ectoplasmática (x80.000). C. Escamas circulares de *Schizochytrium aggregatum* obtenidas por sonicado de la pared celular (x24.000). A, según Yokoyama y Honda 2007; B, según Perkins 1976; C, según Darley et. al 1973.

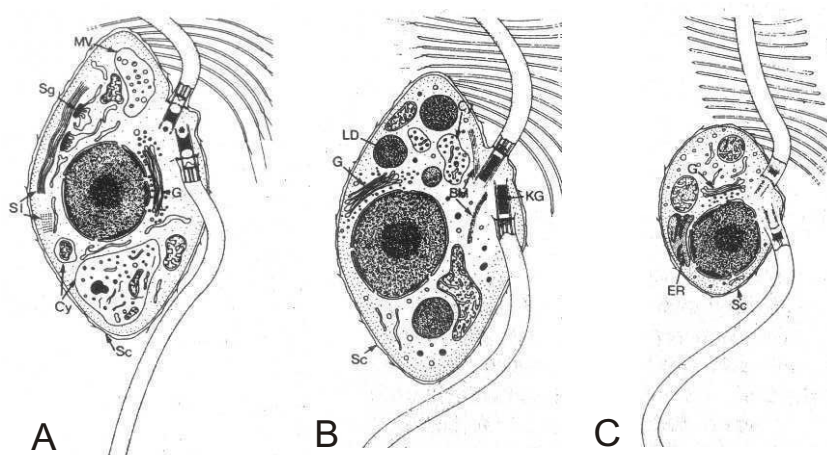


Figura 5.2- Diagrama de las zoosporas descritas en la literatura. A. *Thraustochytrium* sp. B. *S. aggregatum*. C. *A. crouchii*. Abreviaturas: BM, conjunto de microtúbulos; Cy, citolisosoma; ES, cuerpo paranuclear; G, aparato de Golgi; KG, cuerpo denso del kinetosoma; LD, gútula lipídica; MV, cuerpo multivesicular; Sc, escamas; Sg, sagenógeno; SI, inclusiones estriadas. Según Perkins 1976.

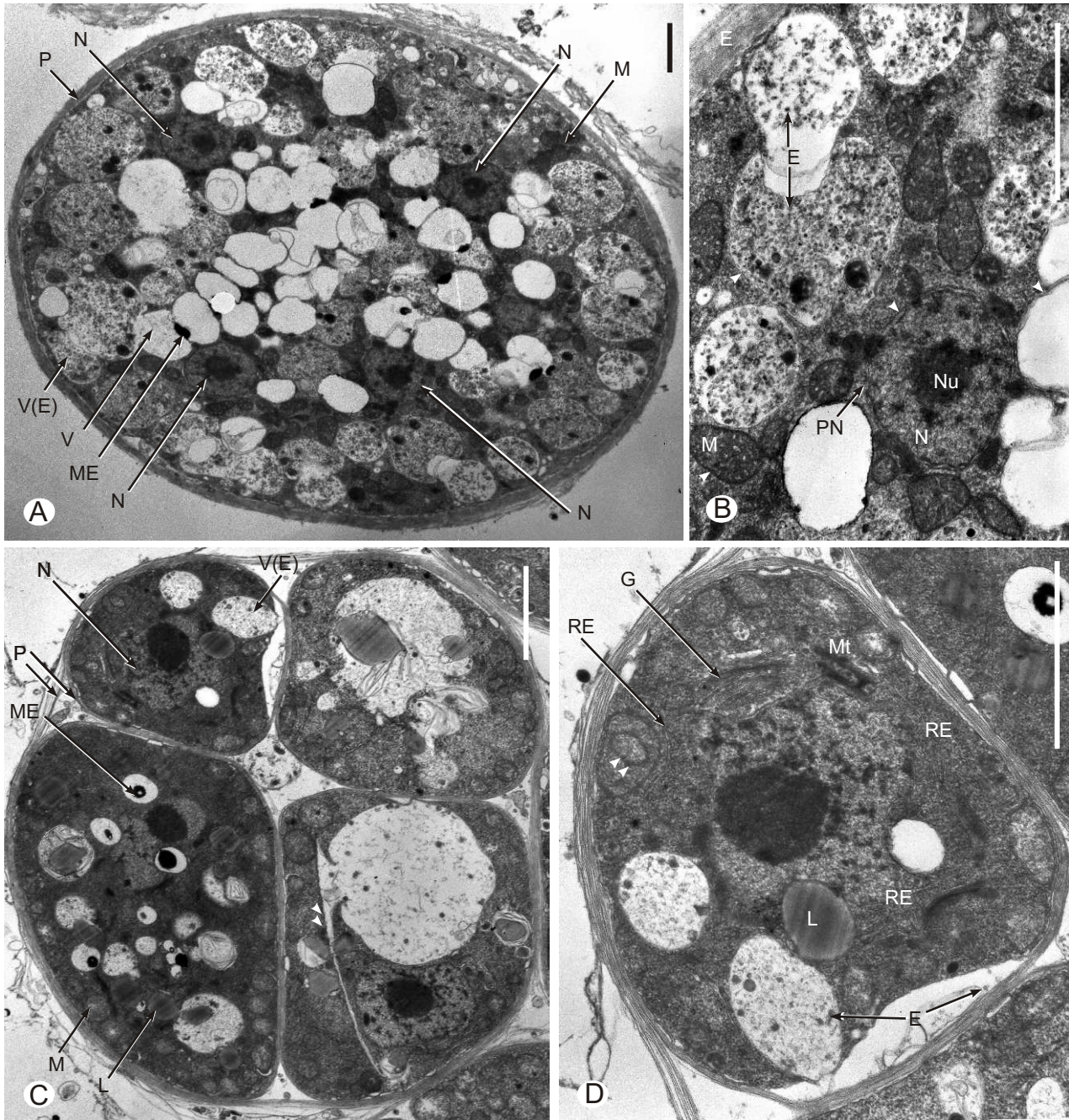


Figura 5.3- Micrografías electrónicas de *Ulkenia* aff. *visurgensis* (A-B, aislamiento S3) y *Schizochytrium* sp. (C-D, aislamiento S48cmc). A. Estadío multinuclear mostrando la pared (P) formada por escamas, 4 núcleos (N), numerosas mitocondrias (M), y vacuolas (V), algunas de ellas conteniendo escamas (VE) o material electrodenso (ME). B. Detalle del estadío multinuclear en el que se señalan las escamas (E) formando la pared o dentro de vacuolas, las membranas internas (indicadas con puntas de flechas), el nucleolo (Nu), uno de los poros de la membrana nuclear (PN) y una mitocondria con crestas tubulares (M). C. Tetrada de células rodeadas por una pared (P) común y otra individual; observe la presencia de gutulas de lípidos (L) y una zona en la que ha comenzado a depositarse material de pared (señalado con puntas de flecha). D. Detalle de una célula de la tetrada, mostrando el extenso retículo endoplasmático (RE), un desarrollado aparato de Golgi (G) y un arreglo de microtubulos (Mt), asociados al núcleo; las puntas de flecha señalan un sistema de membranas dobles concéntricas en el interior de una mitocondria. Las escalas indican 2,5 μ m.

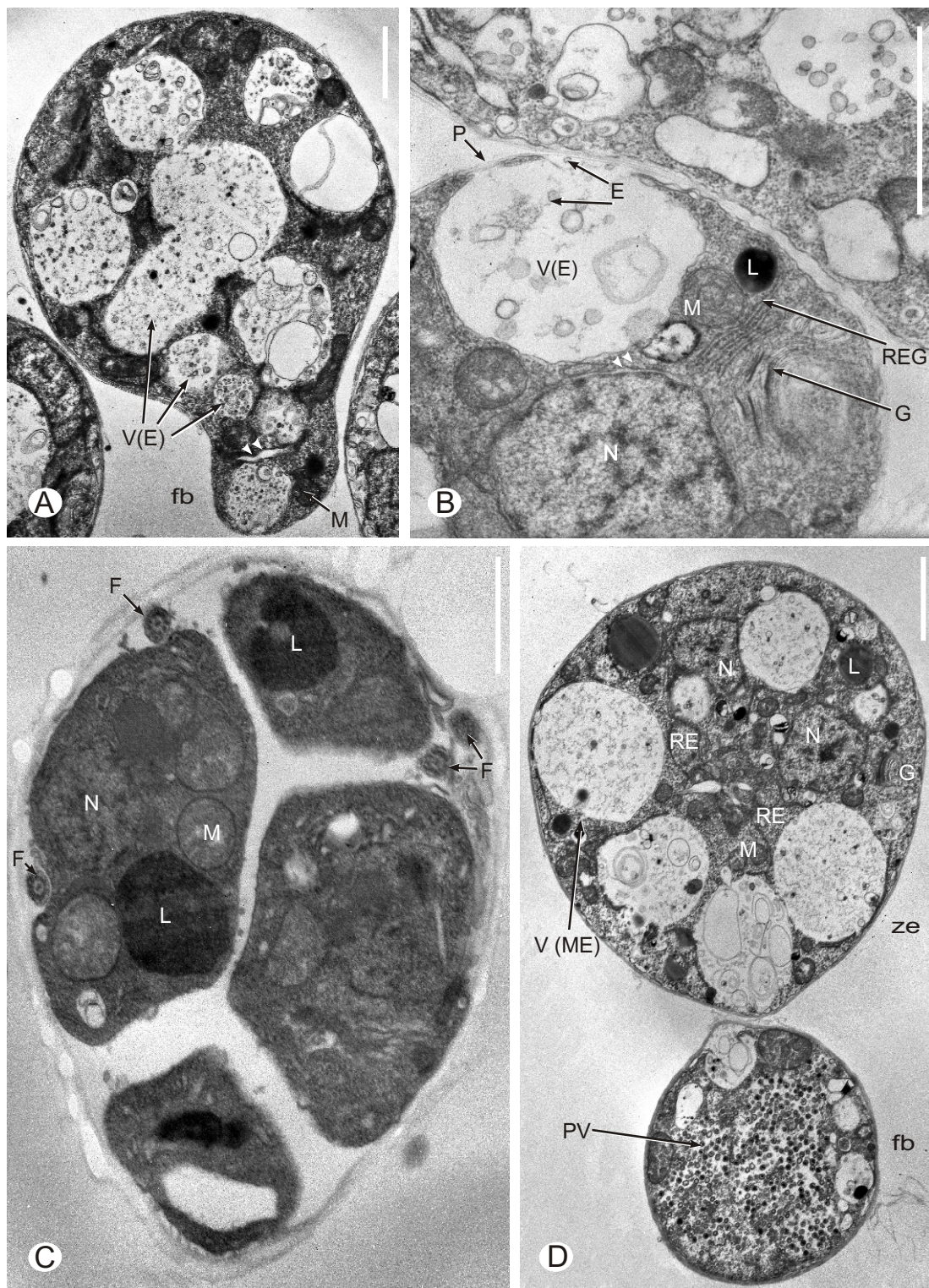


Figura 5.4- Micrografías electrónicas de *Thraustochytrium* aff. *kinnei* (aislamiento S26B). A. Célula vegetativa piriforme con numerosas vacuolas conteniendo escamas (VE) y mitocondrias (M); las puntas de flecha señalan un sector de deposición de elementos de pared en la zona del fundamento basal (fb). B. Detalle de fundamento basal con un núcleo (N) rodeado por su doble membrana (indicada con puntas de flecha), continua con el retículo endoplasmático rugoso (REG); también se muestran una gutula lipídica (L), una mitocondria con crestas tubulares (M) con un sistema de membranas dobles concéntricas en su interior, el aparato de Golgi (G) y las escamas (E) contenidas en una vacuolas (VE) que se depositan como elementos de pared (P). C. Esporangio diferenciando zoosporas; se señalan los axonemas de los flagelos (F) en corte transversal con el típico arreglo 9 + 2 de microtubulos. D. Esporangio con una zona esporógena (ze) multinucleada, vacuolas con material electrodensó (V(ME)) y organelas típicas, y fundamento basal (fb) con partículas virales (PV). Las escalas indican 2,5 μ m.

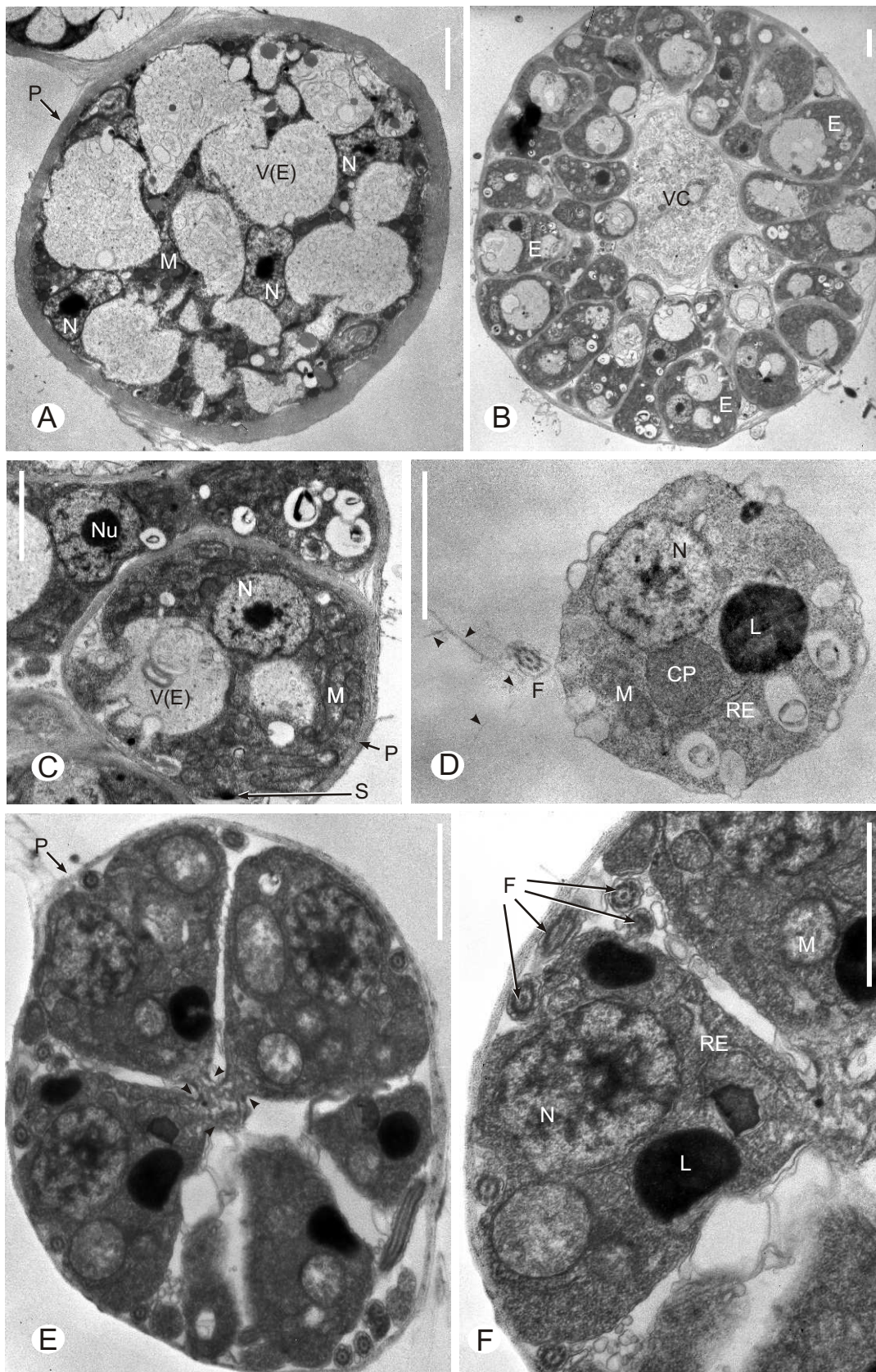


Figura 5.5- Micrografías electrónicas de *Thraustochytrium* aff. *striatum* (A-C, aislamiento S33A) y *Thraustochytrium* aff. *aurem* (D-F, aislamiento S48T). A. Célula vegetativa multinucleada con gruesa pared (P). B. Esporangio con esporas (E) diferenciadas en su interior y vacuola central (VC). C. Detalle de una de las esporas dentro del esporangio, señalando un posible sagenogeno (S). D. Zoospora con cuerpo paranuclear (CP) asociado al núcleo, con el flagelo anterior (F) en corte transversal; se señalan los mastigonemas con puntas de flecha. E. Esporangio diferenciando las zoosporas; las puntas de flecha señalan una zona de estrangulamiento del protoplasma. F. Detalle de una de las porciones diferenciadas dentro del esporangio. Las abreviaturas utilizadas son las mismas que empleadas en las figuras 5.3 y 5.4. Las escalas indican 2,5 μ m.

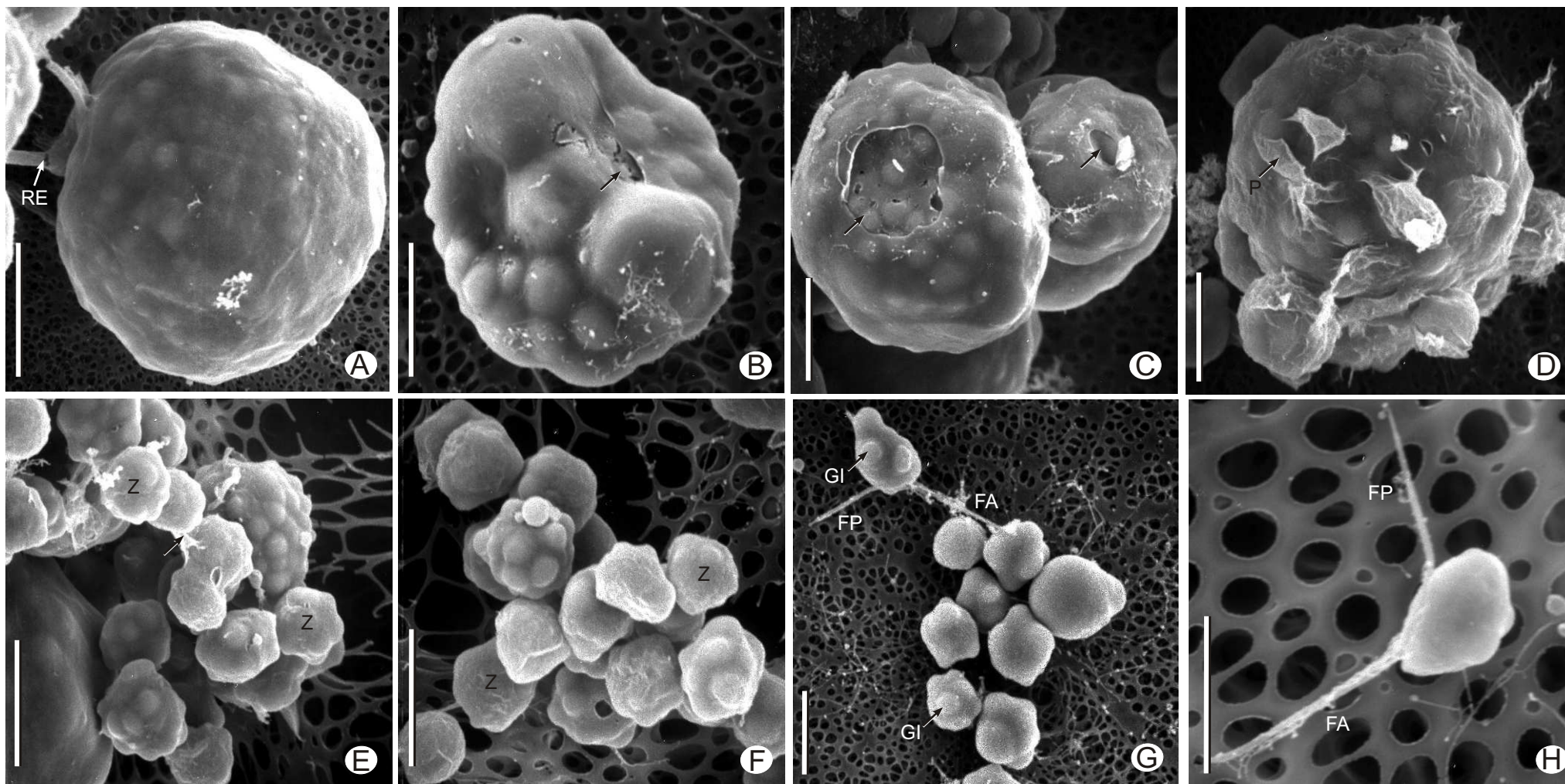


Figura 5.6.- Zoosporogénesis en *Ulkenia* aff. *visurgensis* (cepa SB1D). A. Esporangio unido al sustrato por la red ectoplasmática (RE). B-C. Esporangios con los primeros signos de disolución de la pared (flecha) y protoplastos que comienza a deformarse. D. Esporangio con lobulaciones conspicuas del protoplasto y restos de pared (P) aún adheridos. E-F. Masa ameboidal a partir de la cual comienzan a diferenciarse las zoosporas (Z) por estrangulamiento (flecha). G. Grupo de zoosporas ya diferenciadas con granulos internos (GI); la mayoría aún no ha desarrollado los flagelos. H. Zoospora con el flagelo anterior (FA) con mastigonemas y el flagelo posterior (FP) liso. Las escalas indican 5 μ m.

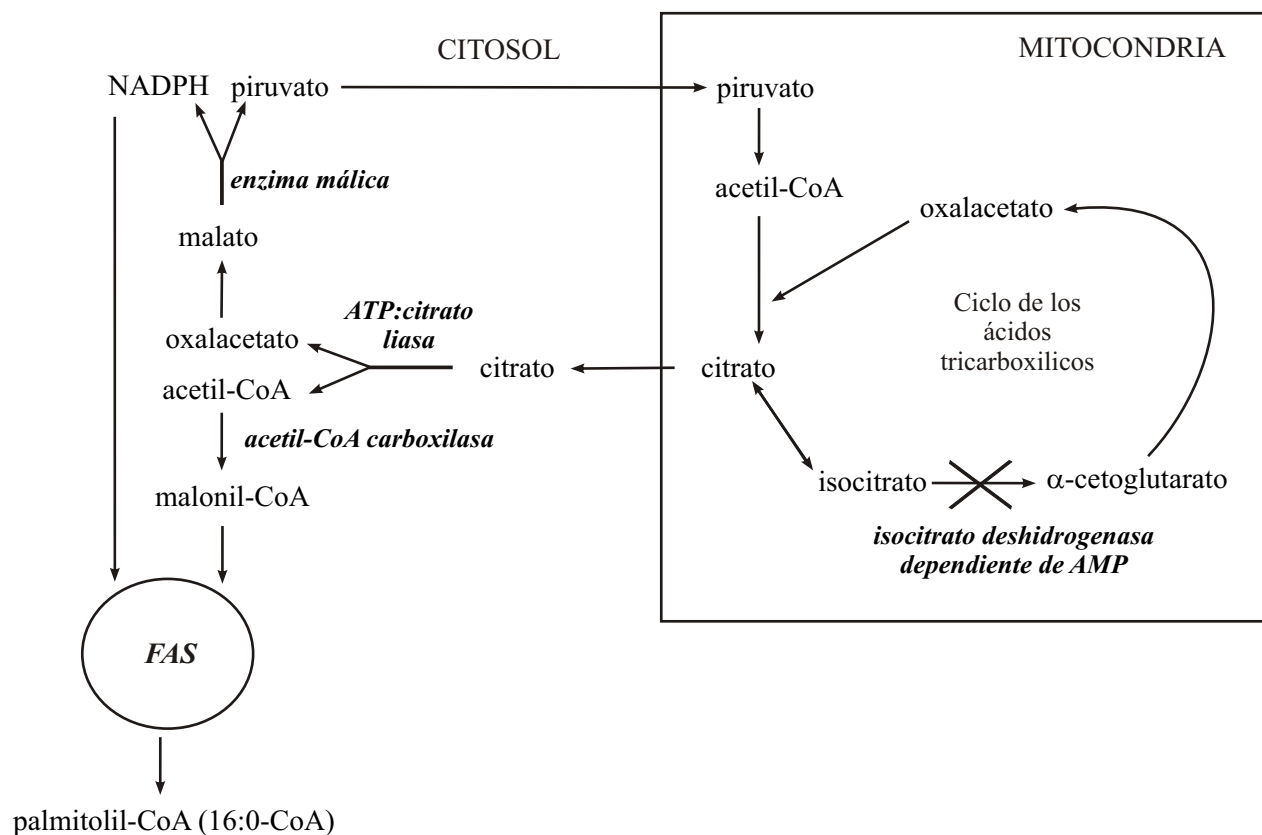


Figura 6.1- Representación esquemática de la bioquímica de los organismos oleaginosos. La inhibición de la enzima isocitrato deshidrogenasa dependiente de AMP en condiciones de déficit de nitrógeno se señala con una cruz. Se indican en cursiva los nombres de las principales enzimas involucradas en la regulación.

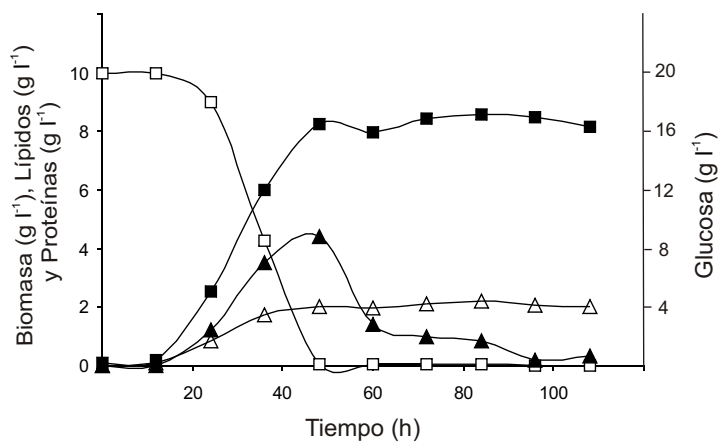


Figura 6.2- Perfil de crecimiento de *A. limacinum* SR21 en medio de propagación GPY. Se muestra la variación en el tiempo de la glucosa residual (□) y de la producción de biomasa (■), de lípidos (▲) y de proteínas (△).

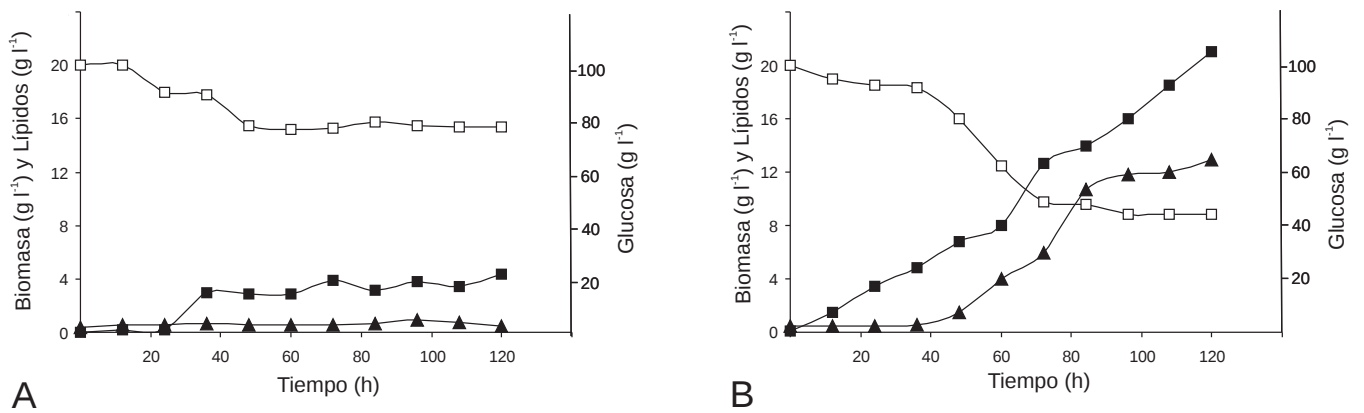


Figura 6.3- Perfil de crecimiento de *A. limacinum* SR21 en medio de producción de lípidos MBP. Se muestra la variación en el tiempo de la glucosa residual ($\square$) y de la producción de biomasa ($\blacksquare$) y de lípidos ($\blacktriangle$), partiendo de un inoculo de A. 10^3 células ml^{-1} y B. 10^6 células ml^{-1}

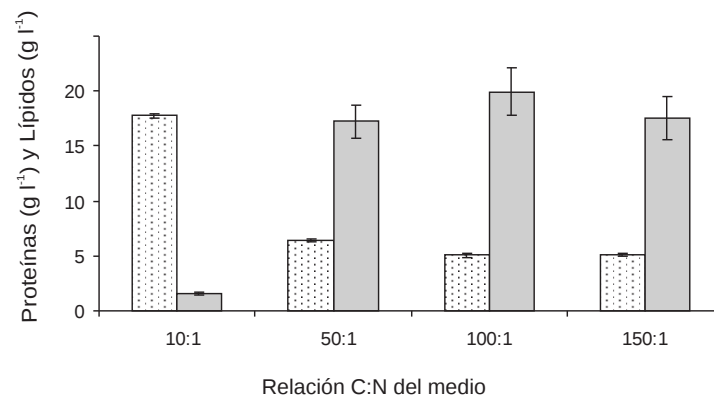


Figura 6.4- Efecto de la relación molar C:N del medio de cultivo sobre el crecimiento (estimado por la concentración de proteínas, relleno punteado) y la producción de lípidos (relleno gris). Todos los medios de cultivo fueron preparados con 10% m/v de glucosa y una concentración variable de acetato de amonio (2,20, 0,44, 0,22 y 0,15 % m/v para alcanzar las relaciones 10:1, 50:1, 100:1 y 150:1 respectivamente).

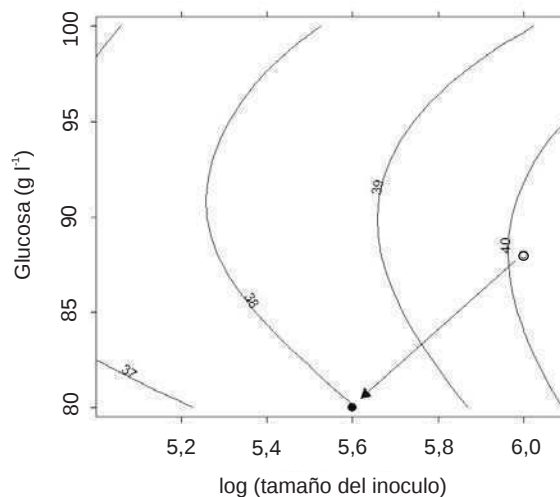


Figura 6.5- Gráfico de contorno producido a partir de un subconjunto de 336 predicciones para una concentración fija de 12% de CSL. El círculo blanco muestra el punto máximo de biomasa determinado por el GA, y el círculo negro representa el punto operativo elegido.

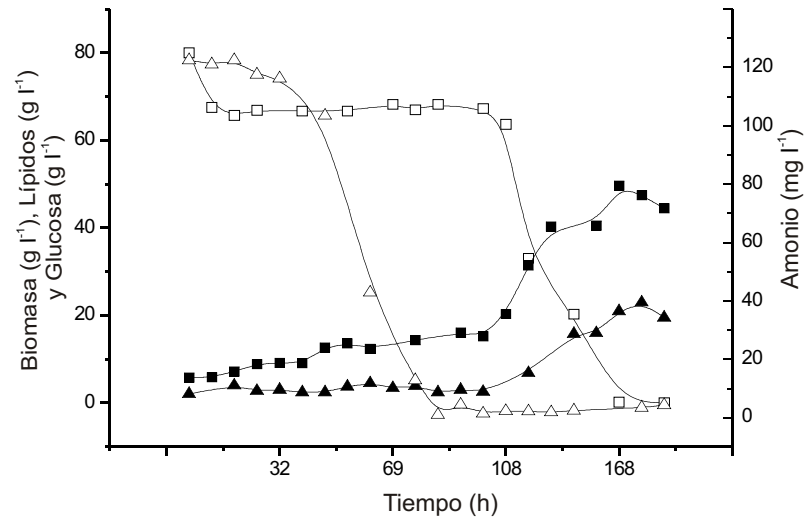


Figura 6.6- Perfil de crecimiento de *A. limacinum* SR21 en frascos agitados de 500 ml con 100 ml de Medio Optimizado de Crecimiento (MOC). Se muestra la variación en el tiempo de la glucosa (□) y el amonio (△) residuales y de la producción de biomasa (■) y de lípidos (▲).

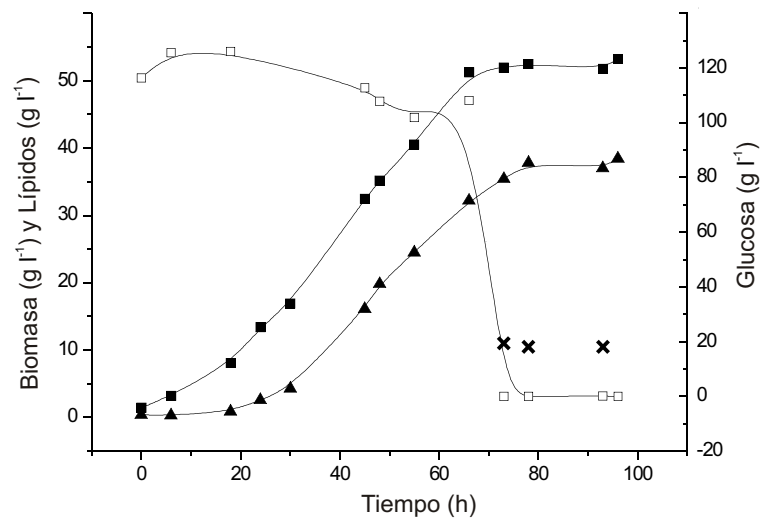


Figura 6.7- Perfil de crecimiento de *A. limacinum* SR21 en un biorreactor de 3.5 l con Medio de Producción (MP). Se muestra la variación en el tiempo para la glucosa (□) residual y para la producción de biomasa (■), de lípidos (▲) y de DHA (X).

APÉNDICE

1. PUBLICACIONES

Este trabajo ha dado origen a las siguientes publicaciones:

ROSA, S., GALVAGNO, M. y VELEZ C.G. 2006. Primeros aislamientos de Thraustochytriales (Layrinthulomycetes, Heterokonta) de ambientes estuariales y salinos de Argentina”. Darwiniana 44 (1-2): 81-88. ISSN 0011-6793.

ROSA, S. M., SORIA, M. A., VÉLEZ C.G y GALVAGNO, M. A. 2010. Improvement of a two-stage fermentation process for docosahexaenoic acid production by *Aurantiochytrium limacinum* SR21 applying statistical experimental designs and data analysis. Bioresource Technology 101(7): 2367-2374. ISSN: 0960-8524.

ROSA, S. M., CARSTENS, M. R., PURPORA, R., ARRÚA DAY, P., GALVAGNO, M. A VÉLEZ, C. G. & ROST, E. Characterization of Thraustochytrids (Labyrinthulomycetes, Heterokonta) from San Jorge Gulf coast areas subject to oil contamination. “Naturalia Patagónica”. Aceptado.

ROSA, S. M., y GALVAGNO, M. A & VÉLEZ C.G. Adjusting culture conditions to isolate “elusive” Thraustochytrids from Southern Argentina temperate and cold environments. Enviado el 10/04/10 a la revista “Mycoscience”.

2. TABLAS

Tabla A.1- Medios alternativos utilizados para el cultivo de traustoguitrales

Componentes	Composición del medio (% m/v)			
	PDA ¹	YEP ²	GSA ³	B1 ⁴
D-Glucosa	2,00	-	2,00	-
Peptona	-	0,10	-	0,10
Extracto de levadura	-	0,10	-	0,10
Extracto de papa	0,40	-	-	-
Hidrolizado de poroto de soja	-	-	1,00	-
Sal de mar	1,75	0,52	1,75	3,50
Agar	1,50	1,30	2,00	1,00

¹ Hayashi et al. 2002, ² Fan et al. 2002, ³ Zhu et al. 2007, ⁴ Burja et al. 2006.

Tabla A.2- Análisis de Varianza para el crecimiento de las cepas patagónicas en diferentes medios de cultivo

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados Medios	Valor de F	Valor de P
Efectos principales					
A: Cepa	88,0179	27	3,25992	5,48	0,0000
B: Medio	15,1964	5	3,03929	5,11	0,0003
Residuos	80,3036	135	0,59484		
Total (corregido)	183,5180	167			

Tabla A.3- Contraste Múltiple de Rangos para el Crecimiento de las cepas patagónicas según el Medio de cultivo

Medio	Recuento	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
GPY	28	1,85714	0,145754	X
SSA	28	2,00000	0,145754	X
H	28	2,25000	0,145754	XX
KMV	28	2,42857	0,145754	XX
MC	28	2,60714	0,145754	XX
TMPP	28	2,67857	0,145754	X
Contraste		Diferencias		+/- Límites
GPY - H		-0,392857		0,407658
GPY - KMV		* -0,571429		0,407658
GPY - MC		* -0,750000		0,407658
GPY - SSA		-0,142857		0,407658
GPY - TMPP		* -0,821429		0,407658
H - KMV		-0,178571		0,407658
H - MC		-0,357143		0,407658
H - SSA		0,250000		0,407658
H - TMPP		* -0,428571		0,407658
KMV - MC		-0,178571		0,407658
KMV - SSA		* 0,428571		0,407658
KMV - TMPP		-0,250000		0,407658
MC - SSA		* 0,607143		0,407658
MC - TMPP		-0,071429		0,407658
SSA - TMPP		* -0,678571		0,407658

En la parte superior de la tabla se identifican 3 grupos homogéneos según la alineación del signo X en la columna. Dentro de cada columna, los niveles que tienen signo X forman un grupo de medias entre las cuales no hay diferencias estadísticamente significativas. La mitad inferior de la tabla muestra la diferencia estimada entre cada par de medias. El asterisco que se encuentra al lado de los pares, indica que éstos muestran diferencias estadísticamente significativas a un nivel de confianza 95,0%. El método utilizado para discernir entre las medias fue el procedimiento de las menores diferencias significativas de Fisher (LSD).

Tabla A.4- Análisis de Varianza para el crecimiento de 10 cepas patagónicas en diferentes medios de cultivo con distintas concentraciones de agar

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados Medios	Valor de <i>F</i>	Valor de <i>P</i>
Efectos principales					
A: Agar (%)	1,3167	2	0,658333	6,69	0,0025
B: Cepa	26,6750	9	2,96389	30,10	0,0000
C: Medio	74,0250	3	24,67500	250,62	0,0000
Interacciones					
AB	1,3500	18	0,075000	0,76	0,7326
AC	3,3500	6	0,558333	5,67	0,0001
BC	30,5583	27	1,131790	11,50	0,0000
Residuos	5,3167	54	0,098457		
Total (corregido)	142,5920	119			

Tabla A.5- Contraste Múltiple de Rangos para el Crecimiento de las cepas patagónicas según la concentración de agar del medio de cultivo

Agar (%)	Recuento	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
3	40	2,000	0,0496127	X
2	40	2,175	0,0496127	X
1	40	2,250	0,0496127	X
Contraste		Diferencias	+/- Límites	
1 - 2		0,075	0,140669	
1 - 3		* 0,250	0,140669	
2 - 3		* 0,175	0,140669	

La alineación del signo X en la última columna en la parte superior de la página identifica 2 grupos homogéneos. El asterisco que se encuentra al lado de los pares, indica que éstos muestran diferencias estadísticamente significativas a un nivel de confianza 95,0%. Para más detalles del análisis estadístico ver la tabla A.3.

Tabla A.6- Diseño de selección Factorial Fraccional 2 (FFr2) y respuesta (peso seco) para la producción de biomasa

Ensayo	Nivel del factor *								Peso seco
	Glucosa (X ₁)		CSL (X ₂)	KH ₂ PO ₄ (X ₃)		Log (inóculo) (X ₄)			
1	-1	6,5	-1	2,50	-1	0,10	-1	3	26,25
2	+1	13,5	-1	2,50	-1	0,10	-1	3	19,20
3	-1	6,5	+1	15,00	-1	0,10	-1	3	38,20
4	+1	13,5	+1	15,00	-1	0,10	-1	3	19,00
5	-1	6,5	-1	2,50	+1	1,00	-1	3	21,20
6	+1	13,5	-1	2,50	+1	1,00	-1	3	23,95
7	-1	6,5	+1	15,00	+1	1,00	-1	3	33,00
8	+1	13,5	+1	15,00	+1	1,00	-1	3	19,50
9	-1	6,5	-1	2,50	-1	0,10	+1	6	24,75
10	+1	13,5	-1	2,50	-1	0,10	+1	6	16,25
11	-1	6,5	+1	15,00	-1	0,10	+1	6	41,15
12	+1	13,5	+1	15,00	-1	0,10	+1	6	38,50
13	-1	6,5	-1	2,50	+1	1,00	+1	6	22,70
14	+1	13,5	-1	2,50	+1	1,00	+1	6	32,45
15	-1	6,5	+1	15,00	+1	1,00	+1	6	41,25
16	+1	13,5	+1	15,00	+1	1,00	+1	6	35,20
17	0	10,0	0	8,75	0	0,55	0	4	32,45
18	0	10,0	0	8,75	0	0,55	0	4	32,50
19	0	10,0	0	8,75	0	0,55	0	4	24,55

* La concentración de glucosa y KH₂PO₄ está expresada en % m/v, la de CSL en % v/v y la de peso seco en g l⁻¹. La unidad del tamaño del inóculo es células ml⁻¹, por lo tanto log (inóculo) = 3 implica una concentración de 3 10³ células ml⁻¹.

Tabla A.7- Análisis del diseño de selección Factorial Fraccional 2 (FFr2) para la producción de biomasa (peso seco)

Término	Coefficiente de Regresión	Error estándar	Valor de P
Intercepto	28,523	0,961	$1,8 \cdot 10^{-9}$ ***
X ₁	-2,778	1,047	0,02914 *
X ₂	4,941	1,047	0,00151 **
X ₃	0,371	1,047	0,73172
X ₄	3,247	1,047	0,01466 *
X ₁ : X ₂	-2,397	1,047	0,05138 (*)
X ₁ : X ₃	1,897	1,047	0,10771
X ₂ : X ₃	-1,359	1,047	0,23048
X ₁ : X ₄	1,847	1,047	0,11585
X ₂ : X ₄	2,553	1,047	0,04071 *
X ₃ : X ₄	0,997	1,047	0,36906

Codificación de factores: X₁, glucosa; X₂, CSL; X₃, KH₂PO₄; X₄, Log (inóculo); “:” significa interacción entre factores.

Codificación para la significancia estadística: * P < 0,05; ** P < 0,005; *** P < 0,0005

Error estándar residual: 4,189 con 3 grados de libertad

R cuadrado: 0,8809; R cuadrado ajustado: 0,7321

Tabla A.8- Diseño de selección Plackett-Burman 1 (PB1) y respuesta (peso seco) para la producción de biomasa

Ensayo	Nivel del factor *								Peso seco
	Glucosa (X ₁)		YE (X ₂)		CSL (X ₃)		SW (X ₄)		
1	+1	3,5	+1	0,875	-1	0,25	+1	3,15	14,90
2	-1	0,5	+1	0,875	+1	1,75	+1	3,15	5,40
3	0	2,0	0	0,500	0	1,00	0	1,75	8,38
4	-1	0,5	-1	0,125	-1	0,25	-1	0,35	3,04
5	+1	3,5	+1	0,875	-1	0,25	+1	3,15	18,50
6	-1	0,5	+1	0,875	+1	1,75	-1	0,35	4,36
7	-1	0,5	-1	0,125	-1	0,25	+1	3,15	2,38
8	+1	3,5	+1	0,875	+1	1,75	-1	0,35	10,00
9	-1	0,5	+1	0,875	-1	0,25	-1	0,35	2,66
10	+1	3,5	-1	0,125	+1	1,75	+1	3,15	13,72
11	+1	3,5	-1	0,125	-1	0,25	-1	0,35	9,64
12	0	2,0	0	0,500	0	1,00	0	1,75	10,04
13	+1	3,5	-1	0,125	+1	1,75	-1	0,35	12,86
14	-1	0,5	-1	0,125	+1	1,75	+1	3,15	4,52
15	0	2,0	0	0,500	0	1,00	0	1,75	9,88

* La concentración de glucosa, YE y SW está expresada en % m/v, la de CSL en % v/v y la de peso seco en g l⁻¹.

Tabla A.9- Análisis del diseño de selección Plackett-Burman 1 (PB1) para la producción de biomasa

Término	Coefficiente de Regresión	Error estándar	Valor de P
Intercepto	-0,478	1,4725	0,75236
X ₁	3,181	0,3539	$4,2 \cdot 10^{-6}$ ***
X ₂	2,147	1,4154	0,16032
X ₃	-0,029	0,7077	0,96824
X ₄	0,035	0,0133	0,02444 *

Codificación de factores: X₁, glucosa; X₂, YE; X₃, CSL; X₄, SW. “:” significa interacción entre factores.

Codificación para la significancia estadística: * P < 0,05; ** P < 0,005; *** P < 0,0005

Error estándar residual: 1,838 con 3 grados de libertad

R cuadrado: 0,900; R cuadrado ajustado: 0,860

Tabla A.10- Diseño de selección Plackett-Burman 2 (PB2) y respuesta (peso seco) para la producción de biomasa

Ensayo	Nivel del factor *								Peso seco
	Glucosa (X ₁)		pH (X ₂)		CSL (X ₃)		SW (X ₄)		
1	+1	9,0	+1	7,0	-1	0,250	+1	3,5	3,12
2	0	5,5	0	5,5	0	1,375	0	2,1	20,44
3	+1	9,0	+1	7,0	-1	0,250	+1	3,5	4,12
4	-1	2,0	-1	4,0	-1	0,250	+1	3,5	6,82
5	+1	9,0	-1	4,0	+1	2,500	+1	3,5	35,10
6	+1	9,0	-1	4,0	+1	2,500	-1	0,7	31,28
7	+1	9,0	+1	7,0	+1	2,500	-1	0,7	27,60
8	-1	2,0	-1	4,0	-1	0,250	-1	0,7	8,18
9	+1	9,0	-1	4,0	-1	0,250	-1	0,7	3,22
10	-1	2,0	-1	4,0	+1	2,500	+1	3,5	9,64
11	0	5,5	0	5,5	0	1,375	0	2,1	19,66
12	-1	2,0	+1	7,0	+1	2,500	-1	0,7	11,28
13	0	5,5	0	5,5	0	1,375	0	2,1	20,22
14	-1	2,0	+1	7,0	-1	0,250	-1	0,7	7,62
15	-1	2,0	+1	7,0	+1	2,500	+1	3,5	13,54

* La concentración de glucosa y SW está expresada en % m/v, la de CSL en % v/v, la de peso seco en g l⁻¹, y el pH en unidades arbitrarias

Tabla A.11- Análisis del diseño de selección Plackett-Burman 2 (PB2) para la producción de biomasa

Término	Coefficiente de Regresión	Error estándar	Valor de P
Intercepto	9,218	9,1179	0,33588
X ₁	1,128	0,5760	0,07873 (*)
X ₂	-1,498	1,3439	0,29114
X ₃	0,071	0,0179	0,00277 **
X ₄	-0,035	0,0504	0,50220

Codificación de factores: X₁, glucosa; X₂, pH; X₃, CSL; X₄, SW. “:” significa interacción entre factores.

Codificación para la significancia estadística: * P < 0,05; ** P < 0,005; *** P < 0,0005

Error estándar residual: 6,983 con 3 grados de libertad

R cuadrado: 0,678; R cuadrado ajustado: 0,549

Tabla A.12- Diseño de selección Plackett-Burman 3 (PB3) y respuesta (peso seco) para la producción de biomasa

Ensayo	Nivel del factor *						Peso seco
	Glucosa (X ₁)		CSL (X ₂)		SW (X ₃)		
1	0	6	0	3	0	2,1	31,48
2	-1	2	-1	1	-1	0,7	9,94
3	0	6	0	3	0	2,1	29,6
4	+1	10	+1	5	+1	3,5	48,54
5	-1	2	+1	5	-1	0,7	12,88
6	-1	2	+1	5	+1	3,5	18,68
7	+1	10	-1	1	-1	0,7	19,24
8	+1	10	-1	1	+1	3,5	26,46
9	-1	2	+1	5	+1	3,5	19,54
10	-1	2	-1	1	-1	0,7	10,08
11	+1	10	+1	5	-1	0,7	42,38
12	-1	2	-1	1	+1	3,5	10,62
13	+1	10	-1	1	+1	3,5	21,04
14	0	6	0	3	0	2,1	31,06
15	+1	10	+1	5	-1	0,7	43,02

* La concentración de glucosa, YE y SW está expresada en % m/v, la de CSL en % v/v y la de peso seco en g l⁻¹.

Tabla A.13- Análisis del diseño de selección Plackett-Burman 3 (PB3) para la producción de biomasa

Término	Coefficiente de Regresión	Error estándar	Valor de P	
Intercepto	25,363	1,9073	0,00091	***
X ₁	10,201	2,2365	0,01976	*
X ₂	7,451	2,2365	0,04466	*
X ₃	2,149	2,2365	0,40754	

Codificación de factores: X₁, glucosa; X₂, CSL; X₃, SW. “:” significa interacción entre factores.

Codificación para la significancia estadística: * P < 0,05; ** P < 0,005; *** P < 0,0005

Error estándar residual: 6,326 con 3 grados de libertad

R cuadrado: 0,926; R cuadrado ajustado: 0,752

3. FIGURAS

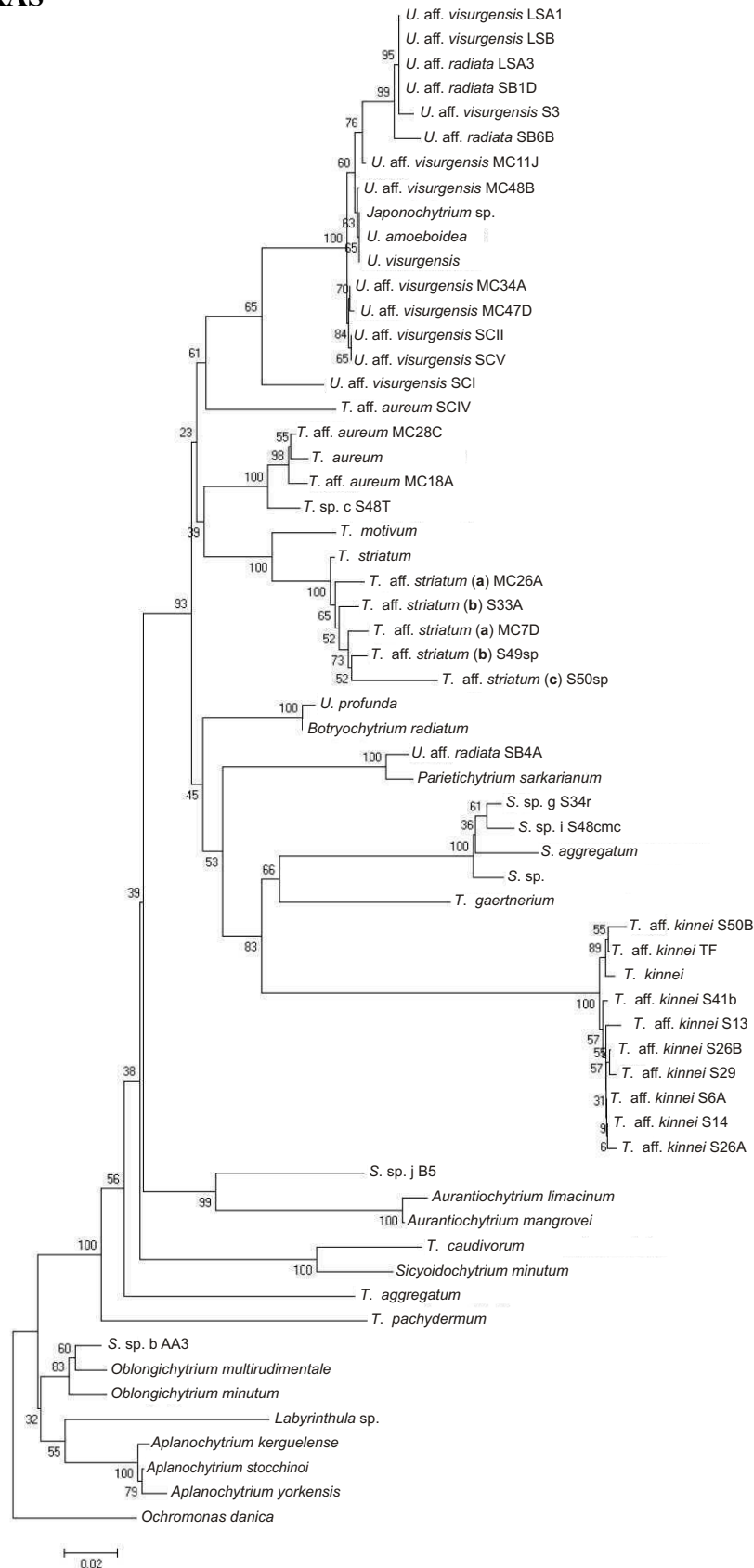


Figura A.1- Árbol filogenético basado en el gen ARNr18S de las traustochytriales locales y aquellas disponibles en bases de datos con *O. danica* como grupo externo obtenido mediante el método de Neighbor-Joining. El mejor árbol fue construido a partir de las distancias estimadas por el método de máxima verosimilitud compuesta con el modelo de Tamura-Nei. Los números en cada rama interna muestran los valores de “bootstrap” para 1000 replicas. La barra indica la cantidad de sustituciones por sitio (0,02).

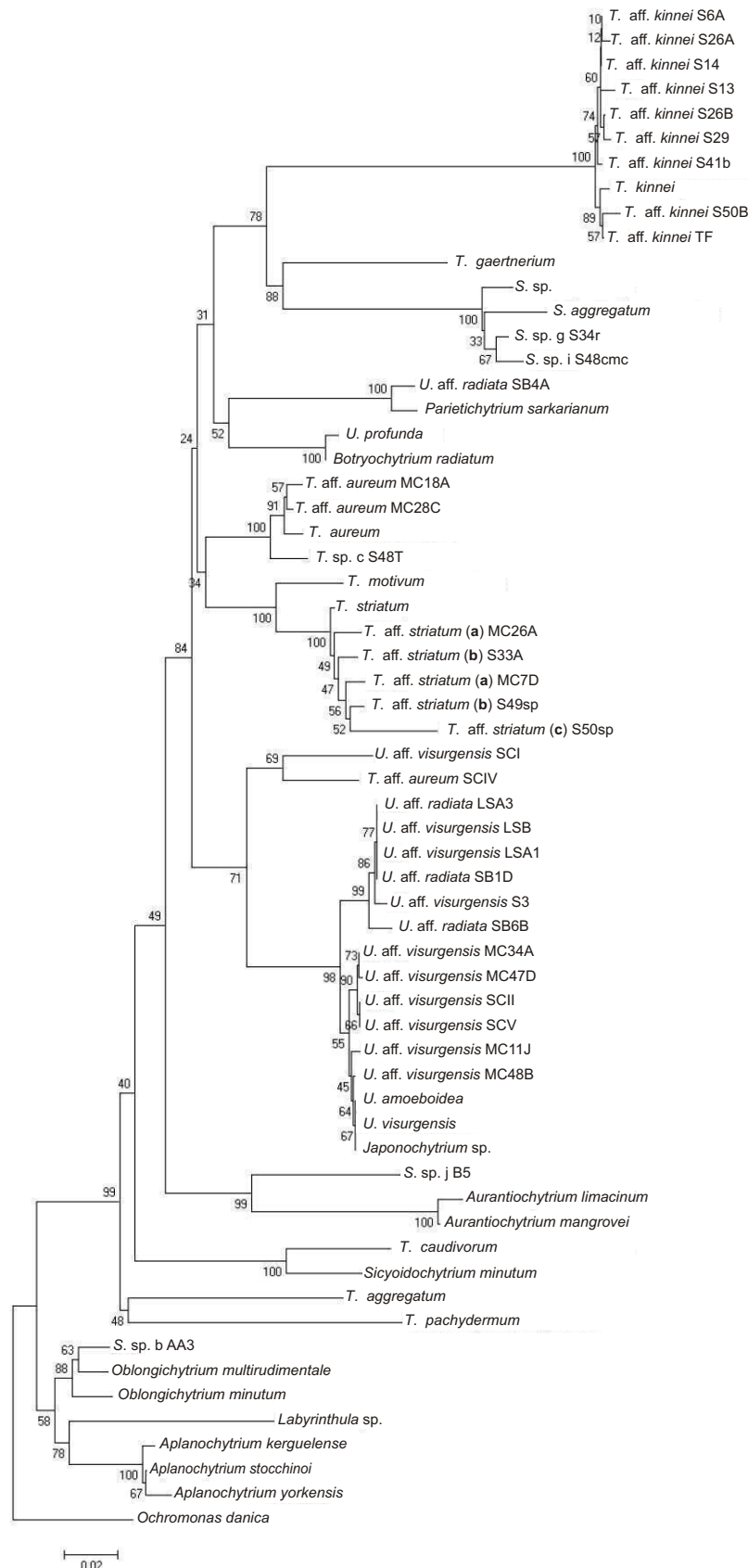


Figura A.2- Árbol filogenético basado en el gen ARNr18S de las traustochytriales locales y aquellas disponibles en bases de datos con *O. danica* como grupo externo obtenido mediante el método de Mínima Evolución. El mejor árbol fue construido a partir de las distancias estimadas por el método de máxima verosimilitud compuesta con el modelo de Tamura-Nei y obtenido por búsqueda heurística con el algoritmo de "Close-Neighbor-Interchange". Los números en cada rama interna muestran los valores de "bootstrap" para 1000 replicas. La barra indica la cantidad de sustituciones por sitio (0,02).

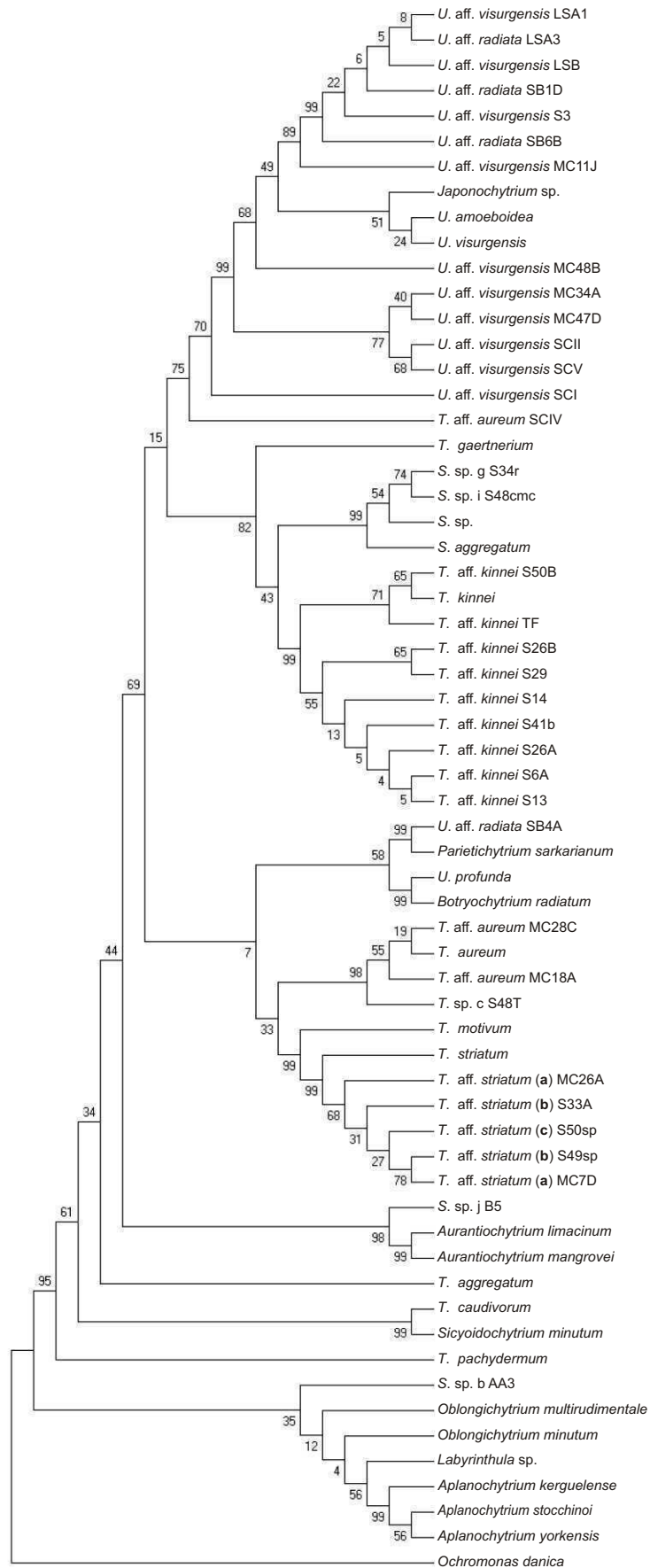


Figura A.3- Árbol filogenético basado en el gen ARNr18S de las traustochytriales locales y aquellas disponibles en bases de datos con *O. danica* como grupo externo obtenido mediante el método de Máxima Parsimonia. Se muestra el primer árbol de los 32 mas parsimoniosos, obtenidos por búsqueda heurística con el algoritmo de "Close-Neighbor-Interchange". Los números en cada rama interna muestran los valores de "bootstrap" para 1000 replicas.

BIBLIOGRAFIA

- Adair EJ, Vishniac HS, 1958. Marine fungus requiring vitamin B12. *Science* 127, 147-148.
- Aidos I, 2002. Production of High-Quality Fish oil from Herring Byproducts. Universidad de Wageningen, Wageningen.
- Alcorlo P, 2004. Las redes tróficas en las lagunas salinas temporales de Los Monegros (Zaragoza, España). *Ecosistemas* 13, 37-51.
- Alderman DJ, Harrison JL, Bremer GB, Jones EBG, 1974. Taxonomic revisions in the marine biflagellate fungi. The ultrastructural evidence. *Mar Biol* 25, 345-357.
- Alderman DJ, Jones EBG, 1971. Physiological requirements of two marine phycomycetes, *Althornia crouchii* and *Ostracoblabe implexa* *Trans Br Mycol Soc* 57, 213-225.
- Alexopoulos CJ, Mims CW, Blackwell M, 1996. *Introductory Mycology*, Nueva York.
- Amon JP, 1978. Thraustochytrids and labyrinthulids of terrestrial, aquatic and hypersaline environments of the Great Salt Lake, USA. *Mycologia* 70, 1299-1301.
- Anderson A, Wynn J, 2001. Microbial polyhydroxyalkanoates, polysaccharides and lipids, En: Ratledge C, Kristiansen B (Eds), *Basic Biotechnology*, 2nd Edition ed. Cambridge University Press.
- Angeles G, 2001. Geomorfología y dinámica de canales de marea del Estuario de Bahía Blanca Departamento de Geografía, Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca, p. 237.
- Artemtchuk NF, 1972. The fungi of the White. Sea. III. Phycomycetes, discovered in the Great. Sama Strait of the Kandalakshial Bay. *Veröff Inst Meeresforsch Bremerh* 13, 231-237.
- Azevedo AC, Corral AL, 1997. Some ultrastructural observations of a thraustochytrid (Protoctista, Labyrinthulomycota) from the clam *Ruditapes decussatus* (Mollusca, Bivalvia). *Dis Aquat Organ* 31, 73-78.
- Bahnweg G, Jäckle I, 1986. A new approach to the taxonomy of the Thraustochytriales and Labyrinthulales, En: Moss ST (Ed), *The Biology of Marine Fungi*. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 131-140.
- Bahnweg G, Sparrow FK, 1974. Four new species of *Thraustochytrium* from Antarctic regions, with notes on the distribution of zoosporic fungi in the Antarctic marine ecosystems. *Am J Bot* 61, 754-766.
- Baily RB, DiMasi D, Hansen JM, Mirrasoul PJ, Ruecker CM, Veeder GT, Kaneko T, Barclay WR, 2003. Enhanced production of lipids containing polyenoic fatty acid by very high density cultures of eukaryotic microbes in fermentors, United States Patent. 6607900, USA.
- Bajpai P, Bajpai P, Ward OP, 1991a. Optimization of production of docosahexaenoic acid (DHA) by *Thraustochytrium aureum* ATCC 34304. *J Am Oil Chem Soc* 68, 509-514.
- Bajpai P, Bajpai P, Ward OP, 1991b. Production of docosahexaenoic acid (DHA) by *Thraustochytrium aureum*. *Appl Microbiol Biotechnol* 35, 706-710.

- Bajpai P, Bajpai PK, 1993. Eicosapentanoic acid (EPA) production from microorganisms: a review. *J Biotechnol* 30, 161-183.
- Barbosa MJGV, 2003 *Microalgal photobioreactors: scale-up and optimization*. Universidad de Wageningen, Wageningen.
- Barclay WR, 1992. Process for the heterotrophic production of microbial oils with high concentrations of omega-3 highly unsaturated fatty acids, United States Patent. 5130242, USA.
- Barclay WR, 1994. Process for growing *Thraustochytrium* and *Schizochytrium* using non-chloride salts to produce a micro-floral biomass having omega-3 highly unsaturated fatty acids, United States Patent. 5340742, USA.
- Barclay WR, 1997. Method of aquaculture comprising feeding microflora having small cell aggregate size, United States Patent. 5688500, USA.
- Barclay WR, 2001. Eggs containing high concentrations of omega-3 highly unsaturated fatty acids and methods for producing the same, United States Patent. 20010000151, USA.
- Barclay WR, Zeller S, 1996. Nutritional enhancement of n-3 and n-6 fatty acids in rotifers and *Artemia nauplii* by feeding spray-dried *Schizochytrium* sp. *J World Aqua Soc* 27.
- Barnett JA, Payne RW, Yarrow D, 1990. *Yeast: characteristics and identification*. Cambridge University Press, Nueva York.
- Barr DJS, 1980. An outline for the reclassification of the Chytridiales, and for a new order, the Spizellomycetales. *Can J Bot* 58, 2380-2394.
- Benner R, Newell SY, Maccubbin AE, Hodson RE, 1984. Relative contributions of bacteria and fungi to rates of degradation of lignocellulosic detritus in salt-marsh sediments. *Appl Environ Microbiol* 48, 36-40.
- Bennett HS, Luft JH, 1959. Zeta-Collidine as a basis for buffering fixatives. *J Biophys Biochem Cytol* 6, 113-114.
- Bértola G, Morosi M, 1997. Caracterización textural de depósitos de ambientes de marea de la Bahía Samborombón *Rev Argent Sediment* 4, 1-13.
- Bockheim J, Hall K, 2002. Periglacial processes and landforms of the Antarctic continent: A review. *S Afr J Sci* 98, 82-101.
- Bongiorni L, Dini F, 2002. Distribution and abundance of thraustochytrids in different Mediterranean coastal habitats. *Aquat. Microb Ecol* 30, 49-56.
- Bongiorni L, Jain R, Raghukumar S, Aggarwal RK, 2005. *Thraustochytrium gaertnerium* sp. nov.: a new thraustochytrid stramenopilan protist from mangroves of Goa, India. *Protist* 156, 303-315.
- Booth T, 1971a. Occurrence and distribution of some zoosporic fungi from soils of of Hibben and Moresby Islands, Queen Charlotte Islands. *Can J. Bot* 49, 951-965.

- Booth T, 1971b. Distribution of certain soil inhabiting chytrid and chytridiaceous species related to some physical and chemical factors. *Can J Bot* 49, 1743-1755.
- Booth T, Miller CE, 1968. Comparative morphological and taxonomic studies in the genus *Thraustochytrium*. *Mycologia* 60, 480-496.
- Booth T, Miller CE, 1969. Morphological development of an isolate of *Schizochytrium aggregatum*. *Can J Bot* 47, 2051-2054.
- Boschi EE, 1988. El ecosistema estuarial del Río de la Plata (Argentina y Uruguay) *An Inst Cienc Mar Limnol* 15, 159-182.
- Bowles RD, Hunt AE, Bremer GB, Duchars MG, Eaton RA, 1999. Long chain n-3 polyunsaturated fatty acid production by members of the marine protistan group the thraustochytrids: screening of isolates and optimisation of docosahexaenoic acid production. *J Biotechnol* 70, 193-202.
- Box GEP, Hunter WG, Hunter JS, 1978. *Statistics for Experimenters: An Introduction to Design, Data Analysis, and Model Building* John Wiley and Sons, Inc., Nueva York.
- Bozzola JJ, Russell LD, 1999. *Electron Microscopy: Principles And Techniques For Biologists*, Londres.
- Braden LM, Carroll KK, 1986. Dietary polyunsaturated fat in relation to mammary carcinogenesis in rats. *Lipids* 21, 285-288.
- Brodie J, Lewis J, 2007 *Unravelling the algae: the past, present, and future of algal systematics* CRC Press CRC Press, Florida.
- Brussaard CP, 2004. Viral control of phytoplankton populations-a review. *J Eukaryot Microbiol* 51, 125-138.
- Bull AT, Ward AC, Goodfellow M, 2000. Search and discovery strategies for biotechnology: the paradigm shift. *Microbiol Mol Biol Rev* 64, 573-606.
- Burja AM, Radianingtyas H, Windust A, Barrow CJ, 2006. Isolation and characterization of polyunsaturated fatty acid producing *Thraustochytrium* species: screening of strains and optimization of omega-3 production. *Appl Microbiol Biotechnol* 72, 1161-1169.
- Cameotra SS, 2007. Preservation of microorganisms as deposits for patent application. *Biochem Biophys Res Commun* 353, 849-850.
- Canevari P, Blanco D, Bucher E, Castro G, I. D, 1998. Los Humedales de la Argentina. Clasificación, situación actual, conservación y legislación. *Wetlands International* (Publicación 46), Buenos Aires.
- Carbone ME, Perillo GME, Piccolo MC, 2007. Dinámica morfológica de los ambientes costeros de bahía San Antonio, provincia de Río Negro. *Geoacta* 32, 115-124.
- Cavalier-Smith T, Allsopp MTEP, Chao EE, 1994. Thraustochytrids are chromist, not Fungi: 18s rRNA signatures of Heterokonta. *Phil Trans Royal Soc* 346, 387-397.

- Cavallotto JL (Ed), 2008. Geología y geomorfología de los ambientes costeros y marinos. Proyecto ARG 02/018 “Conservación de la Diversidad Biológica y Prevención de la Contaminación Marina en Patagonia”, donación GEF N° 28385 (1994-1997). Gestión: Secretaría de Ambiente y Desarrollo Sustentable de la Nación, PNUD, Servicio de Hidrografía Naval, Fundación Funprecit.
- Caziani SM, Derlindati EJ, 1999. Humedales altoandinos del Noroeste de Argentina: su contribución a la biodiversidad regional, En: Malvárez AI (Ed), Tópicos sobre humedales subtropicales y templados de Sudamérica. Oficina Regional de Ciencia y Tecnología de la UNESCO para América Latina y el Caribe -ORCYT, Montevideo, pp. 1-13
- Certik M, Shimizu S, 1999. Biosynthesis and regulation of microbial polyunsaturated fatty acid production. *J Biosci Bioeng* 87, 1-14.
- Chakraborty DK, 1974. On the ecology of the infection of the marine diatom *Coscinodiscus granii* by *Lagenisma coscindisci* in the Weser estuary. *Veröff Inst Meeresforsch Bremerh* 5, 115-122.
- Chamberlain AHL, 1980. Cytochemical studies on the cell walls of *Thraustochytrium* spp. *Bot Mar* 23, 669-677.
- Chen SF, Chien CY, 2002. Six proliferous species of *Thraustochytrium* from Taiwan. *Taiwania* 47, 106-114.
- Chi Z, Liu Y, Frear C, Chen S, 2009. Study of a two-stage growth of DHA-producing marine algae *Schizochytrium limacinum* SR21 with shifting dissolved oxygen level. *Appl Microbiol Biotechnol* 81, 1141-1148.
- Chi Z, Pyle D, Wen Z, Frear C, Chen S, 2007. A laboratory study of producing docosahexaenoic acid from biodiesel-waste glycerol by microalgal fermentation. *Process Biochem* 42, 1537-1545.
- Cohen Z, 1999. Chemicals from microalgae. Taylor and Francis Ltd., Londres.
- Cohen Z, Norman HA, Heimer YM, 1995. Microalgae as a source of omega 3 fatty acids. *World Rev Nutr Diet* 77, 1-31.
- Coleman NK, Vestal JR, 1987. An epifluorescent microscopy study of enzymatic hydrolysis of fluorescein diacetate associated with the ectoplasmic net elements of the protist *Thraustochytrium striatum*. *Canad J Microbiol* 33, 841-843.
- Colwell RR, 1997. Microbial diversity: the importance of exploration and conservation. *J Ind Microbiol Biotechnol* 18, 302-307.
- Comín F, Julià R, Comín P, 1991. Fluctuations, the key aspect for the ecological interpretation of saline lake ecosystems. *Oecologia Aquat* 1, 127-135.
- Constanza R, Kemp M, Boynton W, 1993. Predictability, scale and biodiversity in coastal and estuarine ecosystems: implication for management. *AMBIO* 22, 88-96.

- Darley WM, Porter D, Fuller MS, 1973. Cell wall composition and synthesis via Golgi-directed scale formation in the marine eukaryote, *Schizochytrium aggregatum*, with a note on *Thraustochytrium* sp. *Arch Mikrobiol* 90, 89-106.
- Davidse LC, 1986. Benzimidazole fungicide: mechanism of action and biological impact *An Rev Phytophat* 24, 43-65.
- Dawson SC, Hagen KD, 2009. Mapping the protistan 'rare biosphere'. *J Biol* 8, 105.
- De Swaaf ME, Pronk JT, Sijtsma L, 2003. Fed-batch cultivation of the docosahexaenoic-acid-producing marine alga *Cryptocodinium cohnii* on ethanol. *Appl Microbiol Biotechnol* 61, 40-43.
- Desai KM, Survase SA, Saudagar PS, Lele SS, Singhal RS, 2008. Comparison of artificial neural network (ANN) and response surface methodology (RSM) in fermentation media optimization: Case study of fermentative production of scleroglucan. *Biochem Eng Jour* 41, 266-273.
- Dick MW, 1973. Saprolegniales, En: Ainsworth GC, Sparrow FK, Sussman AS (Eds), the *Fungi: an Advanced Treatise*. Academic Press, New York, pp. 113–144.
- Dick MW, 2001. *Straminipilous Fungi*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Dieffenbach CW, Dveksler GS, 2003. *PCR Primer, a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York.
- Diez B, Pedros-Alio C, Massana R, 2001. Study of genetic diversity of eukaryotic picoplankton in different oceanic regions by small-subunit rRNA gene cloning and sequencing. *Appl Environ Microbiol* 67, 2932-2941.
- Dupont J, Holub BJ, Knapp HR, Meydani M, 1996. Fatty acid-related functions. *Am J Clin Nutr* 63, 9918-9938.
- Dykstra MJ, Porter D, 1984. *Diplophrys marina*, a new scale-forming marine protist with labyrinthulid affinities. *Mycologia* 76, 626-632.
- Eck RV, Dayhoff MO, 1966. *Atlas of Protein Sequence and Structure*, National Biomedical Research Foundation. Silver Springs, Maryland.
- Ellis LL, Bishop SH, 1989. Isolation of cell lines with limited growth potential from marine bivalves., En: Mitsuhashi J (Ed), *Invertebrate Cell Culture Applications*. CRC Press, Florida, pp. 243–251.
- Esteves JL, Solís M, Sastre V, Santinelli N, Gil M, Commendatore M, Raies CG, 1996. Evaluación de la contaminación urbana de la Bahía de San Antonio (provincia del Río Negro), Informe técnico del Plan de Manejo Integrado de la Zona Costera Patagónica 20. Fundación Patagonia Natural, Puerto Madryn.
- Fan KW, Vrijmoed LLP, Jones EB, 2002. Physiological studies of subtropical mangrove *Thraustochytrids*. *Bot Mar* 45, 50-57.

- Fasano JL, Hernández MA, Isla FI, Schnack EJ, 1982. Aspectos evolutivos y ambientales de la laguna Mar Chiquita (provincia de Buenos Aires, Argentina), Oceanológica, Simposio Internacional sobre las lagunas costeras. SCOR/IABO/UNESCO, Bordeaux, pp. 285-292.
- Felsenstein J, 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39, 783-791.
- Fernandez M, Colleoni D, Roux A, Marcos A, Fernandez E, 2007. Caracterización físico-química del sistema bentónico en el sector sur del Golfo San Jorge, Argentina. *Rev biol mar oceanogr* 42, 177-192.
- Fisher RA, 1926. The arrangement of field experiments. *J Min Agri* 33, 503-513.
- Foresse DF, Hagan MT, 1997. Gauss-Newton approximation for Bayesian learning, *Proc Int Joint Conf Neural Networks*.
- Freije RH, Marcovecchio J, 2004. Ecosistema del estuario de Bahía Blanca, En: Piccolo MC, Hoffermayer MS (Eds), *Oceanografía Química*, pp. 69-78.
- Fuller MS, 1966. Structure of the uniflagellate zoospores of aquatic Phycomycetes, in: Madelin MF (Ed), *The fungus spore*. Butterworths, Londres, pp. 67-84.
- Fuller MS, Fowles BE, McLaughlin DJ, 1964. Isolation and pure culture study of marine phycomycetes. *Mycologia* 56, 745-756.
- Fuller MS, Jaworski A, 1987. *Zoosporic Fungi in Teaching and Research*. Southeastern Publishing, Atenas (Georgia).
- Gaertner A, 1964. Elektronenmikroskopische Untersuchungen zur. Struktur den Geisseln von *Thraustochytrium spec*. *Veröff Inst Meeresforsch Bremerh* 9, 25-30.
- Gaertner A, 1968. Die Fluktuationen mariner niederer Pilze in der Deutschen Bucht 1965 und 1966. *Veröff Inst Meeresforsch Bremerh* 3, 105-120.
- Gaertner A, 1972. Characters used in the classification of thraustochytriaceus fungi. *Veröff Inst Meeresforsch Bremerh* 13, 183-194.
- Gaertner A, 1974. Vorkommen und Verteilung mariner niederer Pilze in der Nordsee und im Nordmeerbecken. *Veröff Inst Meeresforsch Bremerh* 5, 123-147.
- Gaertner A, 1969 Marine niedere Pilze in Nordsee und Nordatlantik *Ber Dtsch Bot Ges* 82 287-306.
- Gaertner A, 1977. Revision of the Thraustochytriaceae (Lower Marine Fungi) I. *Ulkenia* nov. gen., with description of three new species. *Veröff Inst Meeresforsch Bremerh* 16, 139-157.
- Gaertner A, 1981. A new marine phycomycete, *Schizochytrium minutum*, sp. nov. (Thraustochytriaceae) from Saline Habitats. *Veröff Inst Meeresforsch Bremerh* 19, 61-69.
- Gaertner A, Raghukumar S, 1980. Ecology of thraustochytrids (lower marine fungi) in the Fladen Ground and other parts of the North Sea *Meteor Forschungsergebnisse* 22, 165-185.
- Ganuza E, Anderson AJ, Ratledge C, 2008. High-cell-density cultivation of *Schizochytrium* sp. in an ammonium/pH-auxostat fed-batch system. *Biotechnol Lett* 30, 1559-1564.

- García A, 1993. Quaternary and recent Lamprothamnium groves (Charophyta) from Argentina. *Hydrobiologia* 267, 143-154.
- Garrison T, 2008. *Essentials of Oceanography*. Editor Cengage Learning, Nueva York.
- Gladue RM, Maxey JE, 1994. Microalgal feeds for aquaculture. *J Appl Phycol* 6, 131-141.
- Gleason FH, Kagami M, Lefevre E, Sime-Ngando T, 2008. The ecology of chytrids in aquatic ecosystems: roles in food web dynamics *Fungal Biol Rev* 22, 17-25.
- Goldstein S, 1963a. Development and nutrition of a new species of *Thraustochytrium*. *Am J Bot* 50, 799-811.
- Goldstein S, 1963b. Morphological variation and nutrition of a new monocentric marine protist. *Archiv für Mikrobiologie* 45, 101-110.
- Goldstein S, 1963c. Studies of a new species of *Thraustochytrium* that displays light stimulated growth. *Mycologia* 55, 799-811.
- Goldstein S, 1973 Zoosporic marine fungi (*Thraustochytriaceae* and *Dermocystidiaceae*). *Ann Rev Microbiol* 27, 13-26.
- Goldstein S, Belsky M, 1964. Axenic culture studies of a new marine phycomycete possessing an unusual type of asexual reproduction. *Am J Bot* 51, 72-78.
- Goldstein S, Moriber L, Hershenov B, 1964. Ultrastructure of *Thraustochytrium aureum*, a Biflagellate Marine Phycomycete. *Mycologia* 56, 897-904.
- Gomez A, Serra M, Carvalho GR, Lunt DH, 2002. Speciation in ancient cryptic species complexes: evidence from the molecular phylogeny of *Brachionus plicatilis* (Rotifera). *Evolution* 56, 1431-1444.
- Gómez Gómez JI, Iglesias Baniela S, Hernández Velázquez O, 2004. The sea and its contaminants. *J Mar Res* 1, 85-93.
- Guckert JB, Ringelberg DB, White DC, Hanson RS, Bratina BJ, 1991. Membrane fatty acids as phenotypic markers in the polyphasic taxonomy of methylotrophs within the Proteobacteria. *J Gen Microbiol* 137, 2631-2641.
- Guerrero RA, Acha EM, Framiñan MB, Lasta CA, 1997. Physical oceanography of the Río de la Plata estuary, Argentina. *Cont Shelf Res* 17, 727-742.
- Guerrero RA, Piola AR, 1997. Masas de agua en la plataforma continental, En: Boschi EE (Ed), *Antecedentes históricos de las exploraciones en el mar y las características ambientales*. Instituto Nacional de Investigación y Desarrollo Pesquero (INIDEP), Mar del Plata, pp. 107-118.
- Gunasekaran M, Hughes WT, 1980. Gas-liquid chromatography: a rapid method for identification of different species of *Candida*. *Mycologia* 72, 505-511.
- Harel M, Ben-Dov E, Rasoulouniriana D, Siboni N, Kramarsky-Winter E, Loya Y, Barak Z, Wiesman Z, Kushmaro A, 2008 A new *Thraustochytrid*, strain Fng1, isolated from the

- surface mucus of the hermatypic coral *Fungia granulosa*. FEMS Microbiol Ecol. 64, 378-387.
- Harrison KE, 1990. The role of nutrition in maturation, reproduction and embryonic development of decapod crustaceans: a review. J Shellfish Res 9, 1-28.
- Hartigan JA, Wong MA, 1979. A K-means clustering algorithm. Appl Stat 28, 100-108.
- Hayashi M, Matsumoto R, Yoshimatsu T, Tanaka S, Shimizu S, 2002. Isolation of highly DHA-accumulated Labyrinthulales and their utilization for nutritional enrichment of rotifers and *Artemia*. Nippon Suisan Gakkaishi 68, 674-678.
- Henry EC, Meints RH, 1992. A persistent virus infection in *Feldmannia* (Phaeophyceae). J Phycol 28, 517-528.
- Higgins D, Thompson J, Gibson T, Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ, 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Res 22, 4673-4680.
- Holdgate MW, 1964. Terrestrial ecology in the maritime Antarctic., in: Carrick R, Holdgate M, Prévost J (Eds), Biologie Antarctique, Paris, pp. 181-194.
- Honda D, Yokochi T, Nakahara T, Erata M, Higashihara T, 1998. *Schizochytrium limacinum* sp. nov., a new thraustochytrid from a mangrove area in the west Pacific Ocean. Mycol Res 102, 439-448.
- Honda D, Yokochi T, Nakahara T, Raghukumar S, Nakagiri A, Schaumann K, Higashihara T, 1999. Molecular phylogeny of labyrinthulids and thraustochytrids based on the sequencing of 18S ribosomal RNA gene. J Eukaryot Microbiol 46, 637-647.
- Huang J, Aki T, Hachida K, Yokochi T, Kawamoto S, Shigeta S, Ono K, Suzuki O, 2001. Profile of Polyunsaturated Fatty Acids Produced by *Thraustochytrium* sp. KK17-3. J Am Oil Chem Soc 78, 605-610.
- Huang J, Aki T, Yokochi T, Nakahara T, Honda D, Kawamoto S, Shigeta S, Ono K, Suzuki O, 2003. Grouping newly isolated docosahexaenoic acid-producing thraustochytrids based on their polyunsaturated fatty acid profiles and comparative analysis of 18S rRNA genes. Mar Biotechnol (NY) 5, 450-457.
- Hunter-Cevera JC, Belt A, 1996. Maintaining cultures for biotechnology and industry. Academic Press, San Diego.
- Iida I, Nakahara T, Yokochi T, Kamisaka Y, Yagi H, Yamaoka M, Suzuki O, 1996. Improvement of docosahexaenoic acid production in a culture of *Thraustochytrium aureum* by medium optimization. J Ferment Bioeng 81, 76-78.
- Ingole BS, Parulekar H, 1993. Zooplankton biomass and abundance of Antarctic krill *Euphausia superba* DANA in Indian ocean sector of the southern ocean. J Biosci 18, 141-148

- Jakobsen AN, Aasen IM, Josefsen KD, Strom AR, 2008. Accumulation of docosaheptaenoic acid-rich lipid in thraustochytrid *Aurantiochytrium* sp. strain T66: effects of N and P starvation and O₂ limitation. *Appl Microbiol Biotechnol* 80, 297-306.
- Johnson TW, Sparrow FK, 1961. Fungi in oceans and estuaries. Cramer, Weinheim, pp. 330-333.
- Jones EBG, 1976. Physiology of marine Phycomycetes, En: E.B.G. J (Ed), *Recent Advances in Aquatic Mycology*. Elek Science, London, London, pp. 261-278.
- Jones EBG, Alderman DJ, 1971. *Althornia crouchii* gen. et sp. nov. A marine biflagellate fungus. *Nova Hedwigia* 21, 381-399.
- Kaerberlein T, Lewis K, Epstein SS, 2002. Isolating “uncultivable” microorganisms in pure culture in a simulated natural environment. *Science* 296, 1127-1129.
- Kamagata Y, Tamaki H, 2005. Cultivation of uncultured fastidious microbes. *Microb Environ* 20, 85-91.
- Kandus P, Minotti P, Malvárez AI, 2008. Distribution of wetlands in Argentina estimated from soil charts. *Acta Sci* 30, 403-409.
- Karling JS, 1968. Some zoosporic fungi of New Zealand. XIII. *Traustochytriaceae*, *Saprolegniaceae* and *Puthiaceae*. *Sydowia* 220, 226-234.
- Karling JS, 1981. Predominantly holocarpic and eucarpic simple biflagellate Phycomycetes. Cramer, Vaduz.
- Kates M, 1998. Techniques of lipidology. Isolation, analysis and identification of lipids, En: Burdon RH, van Knippenberg PH (Eds), *Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology*. Elsevier, Amsterdam, pp. 100-111.
- Kazama FY, 1972a. Ultrastructure of *Thraustochytrium* sp. zoospores. I. Kinetosome. *Arch Mikrobiol* 83, 179-188.
- Kazama FY, 1972b. Ultrastructure of *Thraustochytrium* sp. zoospores. II. Striated inclusions. *J Ultrastruct Res* 41, 60-66.
- Kazama FY, 1973. Ultrastructure of *Thraustochytrium* sp. Zoospores. III. Cytolysomes and Acid Phosphatase Distribution *Arch Mikrobiol* 89, 95-104.
- Kazama FY, 1975. Cytoplasmic cleavage during zoosporogenesis in *Thraustochytrium* sp.: ultrastructure and the effects of colchicine and D₂O. *J Cell Sci* 17, 155-170.
- Kazama FY, Schornstein KL, 1972. Herpes-type virus particles associated with a fungus. *Science* 177, 696-697.
- Kazama FY, Schornstein KL, 1973. Ultrastructure of a fungus herpes-type virus. *Virology* 52, 478-487.
- Kazama FY, Zachary AL, Schornstein KL, 1975. Observation on *Thraustochytrium* sp.: development and behavior in culture. *Can J Bot* 53, 360-374.

- Kennedy M, Krouse D, 1999. Strategies for improving fermentation medium performance: a review. *J Ind Microbiol Biotechnol* 23, 456-475.
- Kimura H, Fakuba T, Takeshi N, 1999. Biomass of thraustochytrid protist in coastal water. *MEPS* 189, 27-33.
- Kimura H, Sato M, Sugiyama C, Naganuma T, 2001. Coupling of thraustochytrids and POM, and of bacterio- and phytoplankton in a semi-enclosed coastal area: implication for different substrate preference by the planktonic decomposers *Aquat Microb Ecol* 25, 293-300.
- Kirk PM, Cannon PF, David JC, Stalpers JA, 2001. *Ainsworth and Bisby's Dictionary of the Fungi*, 9na ed. CABI Publishing, Wallingford.
- Kobayashi Y, Ookubo M, 1953. Studies on the marine Phycomycetes. *Bull Natl Sci Mus Tokyo* 33, 53-65.
- Konno K, 1969. Studies on the Japanese lower aquatic phycomycetes II, on *Thraustochytrium* collected from a seaweed. *Trans Mycol Soc Japan* 10, 9-13.
- Kremer JM, Bigauette J, Michale AV, Timchalk MA, Lininger L, Rynes RI, Huyck C, Zieminski J, Bartholomew LE, 1985. Effects of manipulation of dietary fatty acids on clinical manifestations of rheumatoid arthritis. *Lancet* 1, 184-187.
- Kyle DJ, 1994. Microbial oil mixtures and uses thereof, United States Patent. 5374657, USA.
- Lamour K, Kamoun S, 2009. *Oomycete genetics and genomics: diversity, interactions, and research tools* John Wiley and Sons, Inc., New Jersey.
- Lankford RR, 1977. Coastal lagoons of Mexico: Their origin and classification, En: Wiley M (Ed), *Estuarine Processes*, Nueva York, pp. 182-215.
- Lauritzen L, Hansen HS, Jorgensen MH, Michaelsen KF, 2001. The essentiality of long chain n-3 fatty acids in relation to development and function of the brain and retina. *Prog Lipid Res* 40, 1-94.
- Leadbetter JR, 2003. Cultivation of recalcitrant microbes: cells are alive, well and revealing their secrets in the 21st century laboratory. *Curr Opin Microbiol* 6, 274-281.
- Leander C, Porter D, 2000. Redefining the genus *Aplanochytrium* (phylum Labyrinthulomycota). *Mycotaxon* 76, 439-444.
- Leander C, Porter D, 2001. The Labyrinthulomycota is comprised of three distinct lineages. *Mycologia* 93, 459-464.
- Leander C, Porter D, Leander B, 2004. Comparative morphology and molecular phylogeny of aplanochytrids (Labyrinthulomycota). *Eu J Protistol* 40, 317-328.
- Leaño LM, Gapasin RSJ, Polohan B, Vrijmoed LLP, 2001. Growth and fatty acid production of thraustochytrids from Panay mangroves, Philippines. *Fungal Divers* 12, 111-122.
- Lee RE, 1999. *Phycology*, 3ra ed. Cambridge University Press, Cambridge.
- Lepage G, Roy CC, 1986. Direct transesterification of all classes of lipids in a one-step reaction. *J Lipid Res* 27, 114-120.

- Letcher PM, Powell MJ, Barr DJ, Churchill PF, Wakefield WS, Picard KT, 2008. Rhizophlyctidales -a new order in Chytridiomycota. *Mycol Res* 112, 1031-1048.
- Letcher PM, Powell MJ, Churchill PF, Chambers JG, 2006. Ultrastructural and molecular phylogenetic delineation of a new order, the Rhizophydiales (Chytridiomycota). *Mycol Res* 110, 898-915.
- Lewis T, Nichols P, McMeekin T, 2000. Production of Polyunsaturated fatty acids by Australian Thraustochytrids: aquaculture applications, Hatchery Feeds, Cairns, pp. 43-49.
- Lewis TE, Nichols PD, McMeekin TA, 1999. The Biotechnological Potential of Thraustochytrids. *Mar Biotechnol* (NY) 1, 580-587.
- Li ZY, Ward OP, 1994. Production of docosahexaenoic acid by *Thraustochytrium roseum*. *J Ind Microbiol* 13, 238-241.
- Lobban CS, Wynne MJ, 1981. The Biology of seaweeds. University of California Press, California.
- Logares RE, 2006. Does the global microbiota consist of a few cosmopolitan species? *Ecol Austral* 16, 85-90.
- Lowry OH, Rosbrough NJ, Farr AL, Randall RJ, 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193, 265-275.
- Luo Q, Krumholz LR, Najar FZ, Peacock AD, Roe BA, White DC, Elshahed MS, 2005. Diversity of the microeukaryotic community in sulfide-rich Zedler Spring (Oklahoma). *Appl Environ Microbiol* 71, 6175-6184.
- MacKay D, 1992. Bayesian Interpolation. *Neural Comput* 4, 415-447.
- Malvárez AI, 1999. Tópicos sobre humedales subtropicales y templados de Sudamérica. Oficina Reg. de Ciencia y Tecnología de la UNESCO para América Latina y el Caribe, Montevideo.
- Mann KH, 1988. Production and use of detritus in various freshwater, estuarine, and coastal marine ecosystems. *Limnol Oceanogr* 33, 910-930.
- Massana R, Castresana J, Balagué V, Guillou L, Romari K, Groisillier A, Valentin K, Pedrós-Alió C, 2004. Phylogenetic and ecological analysis of novel marine stramenopiles. *Appl Environment Microbiol* 70, 3528-3534.
- Massana R, Guillou L, Díez B, Pedrós-Alió C, 2002. Unveiling the Organisms behind novel eukaryotic ribosomal DNA sequences from the ocean *Appl Environment Microbiol* 68, 4554-4558.
- Mataix J, 2002. Los ácidos grasos omega-3. *Mundo científico* 235, 46-51.
- McLean N, Porter D, 1982. Lesions produced by a thraustochytrid in *Tritonia diomedea* (Mollusca: Gastropoda: Nudibranchia). *J Invert Pathol* 39, 223-225.
- Mehta J, Lopez LM, Wargovich T, 1987. Eicosapentaenoic acid: its relevance in atherosclerosis and coronary artery disease. *Am J Cardiol* 59, 155- 159.

- Melo WD, Schillizzi R, Perillo GME, Piccolo MC, 2003. Influencia del área continental pampeana sobre el origen y la morfología del estuario de Bahía Blanca. *Rev Argent Sediment* 10, 65-72.
- Metz JG, Roessler P, Facciotti D, Levering C, Dittrich F, Lassner M, Valentine R, Lardizabal K, Domergue F, Yamada A, Yazawa K, Knauf V, Browse J, 2001. Production of polyunsaturated fatty acids by polyketide synthases in both prokaryotes and eukaryotes. *Science* 293, 290-293.
- Meyer BJ, Tsisis E, Howe PRC, Tapsell L, Calvert GD, 1999. Polyunsaturated fatty acid content of foods: differentiating between long and short chain omega-3 fatty acids *Food Australia* 51, 82-95.
- Mianzan H, Sabatini M, 1985. Estudio preliminar sobre distribución y abundancia de *Muemiopsis macradyi* en el estuario de Bahía Blanca (Argentina) (Ctenophora) *Spheniscus* 1, 53-68.
- Miller MR, Nichols PD, Carter CG, 2007. Replacement of fish oil with thraustochytrid *Schizochytrium* sp. L oil in Atlantic salmon parr (*Salmo salar* L) diets. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 148, 382-392.
- Millero FJ, 1996. Chemical oceanography. Editor CRC Press, Washington.
- Montgomery DC, 1991. Design and analysis of experiments, Third edition ed. John Wiley, New York.
- Moro I, Negrisolo E, Callegaro A, Andreoli C, 2003. *Aplanochytrium stocchinoi*: a new Labyrinthulomycota from the southern ocean (Ross Sea, Antarctica). *Protist* 154, 331-340.
- Moss ST, 1986. Biology and phylogeny of the Labyrinthulales and Thraustochytriales, En: Moss ST (Ed), *The biology of marine fungi*. Cambridge University Press, Cambridge pp. 105-129.
- Mutihac L, Mutihac R, 2008. Mining in chemometrics. *Anal Chim* 612, 1-18.
- Naganuma T, Kimura H, Karimoto R, Pimenov NV, 2006. Abundance of planktonic thraustochytrids and bacteria and the concentration of particulate ATP in the Greenland and Norwegian Seas. *Polar Biosci* 20, 37-45.
- Nakahara T, Yokochi T, Higasshihara T, Tanaka S, Yaguchi T, Honda D, 1996. Production of docosahexaenoic and docosapentaenoic acids by *Schizochytrium* sp. isolated from Yap islands. *JAACS* 73, 1421-1426.
- Nei M, Kumar S, 2000. *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press, New York.
- Nelson DL, Cox MM, 2000. *Lehninger Principles of Biochemistry*. Worth Publishers, New York.

- Newell SY, 1992. Estimating fungal biomass and productivity in decomposing litter, En: Carroll GC, Wicklow DT (Eds), *The fungal community: its organization and role in the ecosystem*. Marcel Dekker, Nueva York, pp. 521-561.
- Nichols DS, Nichols PD, McMeekin TA, 1993. Polyunsaturated fatty acids in antarctic bacteria. *Antarct Sci* 5, 149-160.
- Nichols PD, Petrie J, Singh S, 2010. Long-Chain Omega-3 Oils—An Update on Sustainable Sources. *Nutrients* 2, 572-585.
- Norday A, Hansen JB, 1994. N-3 fatty acids and cardiovascular risk factors. *World Rev Nutr Diet*. 76, 51-54.
- Olive LS, 1975. *The Mycetozoan*. Academic Press, New York
- Olivier SR, Escofet A, Penchaszadeh P, Orensanz JM, 1972. Estudios ecológicos de la región estuarial de Mar Chiquita (Buenos Aires, Argentina). II. Relaciones tróficas interespecíficas. *An Soc Cient Arg* 192, 89-104.
- Pavelka M, Roth J, 2010. *Functional Ultrastructure: An Atlas of Tissue Biology and Pathology*. Springer-Verlag, New York.
- Pereira SL, Huang YS, Bobik EG, Kinney AJ, Stecca KL, Packer JC, Mukerji P, 2004. A novel omega3-fatty acid desaturase involved in the biosynthesis of eicosapentaenoic acid. *Biochem J* 378, 665-671.
- Perillo GME, Pierini JO, Pérez DE, Gómez EA, 2001. Suspended sediment circulation in semienclosed docks, Puerto Galván, Argentina. *Terra et Aqua* 83, 13-20.
- Perkins FO, 1972. The ultrastructure of holdfasts, “rhizoids”, and slime tracks” in thraustochytriaceous fungi and *Labyrinthula* spp. *Arch Microbiol* 84, 95–118.
- Perkins FO, 1973. A new species of marine labyrinthulid *Labyrinthuloides yorkensis* gen. nov. spec. nov.: cytology and fine structure. *Arch Microbiol* 90, 1-17.
- Perkins FO, 1974. Phylogenetic Considerations of the Problematic Thraustochytriaceous-Labyrinthulid-Dermocystidium Complex Based on Observations of Fine Structure. *Veröff Inst Meeresforsch Bremerh* 5, 45-63.
- Perkins FO, 1976. Fine structure of lower marine and estuarine fungi, En: Jones EBG (Ed), *Recent Advances in Aquatic Mycology*. Elek Science, Londres, pp. 279-312.
- Perkins FO, Amon JP, 1969. Zoosporulation in *Labyrinthula* sp.: an electron microscopic study. *J Protozool* 16, 235–257.
- Perveen Z, Ando H, Ueno A, Ito Y, Yamamoto Y, Yamada Y, Takagi T, Kaneko T, Kogame K, Okuyama H, 2006. Isolation and characterization of a novel thraustochytrid-like microorganism that efficiently produces docosahexaenoic acid. *Biotechnol Lett* 28, 197-202.
- Piola AR, Rivas A, 1997. Corrientes en la plataforma continental, En: Boschi EE (Ed), *Antecedentes históricos de las exploraciones en el mar y las características ambientales*.

- Instituto Nacional de Investigación y Desarrollo Pesquero (INIDEP), Mar del Plata, pp. 119-132.
- Polglase JL, 1980. A preliminary report on the thraustochytrid(s) and labyrinthulid(s) associated with a pathological condition in the lesser octopus *Eledone cirrhosa*. *Bot Mar* 23, 699-706.
- Pomponi SA, 1999. The bioprocess–technological potential of the sea. *J Biotechnol* 70, 5-13.
- Porter D, 1974. Phylogenetic considerations of the Thraustochytriaceae and Labyrinthulaceae. *Veröff Inst Meeresforsch Bremerh* 5, 19-44.
- Porter D, 1990. Phylum Labyrinthulomycota, En: Margulis L, Corlins JO, Melkonian M, Chapman J (Eds), *Handbook of Protoctista*. Jones and Barlett Publishers, Boston, pp. 338-398.
- Premuzic ET, Bencovitz C, Gaffney J, Walsh J, 1982. The nature and distribution of organic matter on the surface sediments of the world oceans and seas. *Org Geochem* 4, 63-77.
- Pritchard DW, 1967. Observation of circulation in coastal plain estuaries, En: Lauf GH (Ed), *Estuaries*. American Association for the Advancement of Science, Washington pp. 37-44.
- Qiu X, Hong H, MacKenzie SL, 2001. Identification of a Delta 4 fatty acid desaturase from *Thraustochytrium* sp. involved in the biosynthesis of docosahexanoic acid by heterologous expression in *Saccharomyces cerevisiae* and *Brassica juncea*. *J Biol Chem* 276, 31561-31566.
- Raghukumar C, Raghukumar S, 1998. Barotolerance of fungi isolated from deep-sea sediments of the Indian Ocean. *Aquat Microbiol Ecol* 15, 153-163.
- Raghukumar S, 1977. A new species of the genus *Ulkenia* Gaertner (lower marine fungi) from the North Sea. *Veröff Inst Meeresforsch Bremerh* 16, 159-165.
- Raghukumar S, 1980. *Thraustochytrium benthicola* sp. nov.: a new marine fungus from the North Sea. *Trans Br Mycol Soc* 74, 607-614.
- Raghukumar S, 1982. Fine structure of the thraustochytrid *Ulkenia amoeboides*. I. Vegetative thallus and formation of the amoeboid stage. *Can J Bot* 60, 1092-1102.
- Raghukumar S, 1985. Enumeration of the thraustochytrids (heterotrophic microorganisms) from the Arabian Sea. *Bull Natl Inst Oceanogr* 18, 457-465.
- Raghukumar S, 1988a. *Schizochytrium octosporum* sp. nov. and other thraustochytrids from the North Sea (Rosfjord, Norway). *Trans Br Mycol Soc* 90, 273-278.
- Raghukumar S, 1988b. *Schizochytrium mangrovei* sp. nov., a thraustochytrid from mangroves in India. *Trans Br Mycol Soc* 90, 627-631.
- Raghukumar S, 1992. Bacterivory: a novel dual role for thraustochytrids in the sea. *Mar Biol* 113, 165-169.
- Raghukumar S, 2002. Ecology of the marine protists, the Labyrinthulomycetes (Thraustochytrids and Labyrinthulids). *Eur J Protistol* 38, 127-145.

- Raghukumar S, 2004. The Role of Fungi in Marine Detrital Processes, En: Ramaiah N (Ed), Marine Microbiology: Facets & Opportunities. National Institute of Oceanography, Goa, pp. 91-101.
- Raghukumar S, 2008. Thraustochytrid Marine Protists: production of PUFAs and Other Emerging Technologies. *Mar Biotechnol* (NY) 10, 631-640.
- Raghukumar S, Anil AC, Khandeparker L, Patil JS, 2000. Thraustochytrid protists as a component of marine microbial films. *Mar Biol* 10, 631-640.
- Raghukumar S, Gaertner A, 1980. Ecology of the thraustochytrids (lower marine fungi) in the Falden Ground and other parts of the North Sea II. *Veröff Inst Meeresforsch Bremerh* 18, 289-308.
- Raghukumar S, Raghukumar C, 1999. Thraustochytrid fungoid protists in faecal pellets of the tunicate *Pegea confederata*, their tolerance to deep-sea conditions and implication in degradation processes. *Mar Ecol Progr* 190, 133-140.
- Raghukumar S, Raghukumar C, Rajendran A, 1990. Abundance of thraustochytrid fungi in the Arabian Sea. *Est Coastal and Shelf Sci* 31, 351-358.
- Raghukumar S, Ramaiah N, Raghukumar C, 2001 Dynamics of thraustochytrid protists in the water column of the Arabian Sea. *Aquat Microb Ecol* 24, 175-186.
- Raikaar MT, Raghukumar S, Vani V, David JJ, Chandramohan D, 2001 Thraustochytrid protists degrade hydrocarbons *Indian J Mar Sci* 30, 139-145.
- Rappe MS, Giovanoni SJ, 2003. The uncultured microbial majority. *Ann Rev Microbiol* 57, 369-394.
- Ratledge C, 2004. Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for Single Cell Oil production. *Biochimie* 86, 807-815.
- Ratledge C, Wynn JP, 2001. The biochemistry and molecular biology of lipid accumulation in oleaginous microorganisms. *Adv Appl Microbiol* 51, 1-51.
- Rausch H, Larsen N, Schmitt R, 1989. Phylogenetic relationships of the green alga *Volvox carteri* deduced from small-subunit ribosomal RNA comparisons. *J Mol Evol* 29, 255-265.
- R-Development, Team C, 2007. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna.
- Reynolds ES, 1963. The use of lead citrate at high pH as an electronopaque stain in electron microscopy. *J Cell Biol* 17, 208-212.
- Riemann F, Schaumann K, 1993. Thraustochytrid protists in Antarctic fast ice? *Antarct Sci* 5, 279-280.
- Riemann F, Schrage M, 1983. On the mass occurrence of a thraustochytrid protist (fungi or rhizopodan protozoa) in an Antarctic anaerobic sediment. *Veröff Inst Meeresforsch Bremerh* 19, 191-202.

- Riffenburgh B, 2007. Antarctic Surface Water, Encyclopedia of the Antarctic. Routledge, Nueva York, pp. 79.
- Ringuelet RA, 1962. Ecología acuática continental. Eudeba, Buenos Aires.
- Rivera Prisco A, García de la Rosa SB, Díaz de Astarloa JM, 2001. Feeding ecology of flatfish juveniles (Pleuronectiformes) in Mar Chiquita coastal lagoon (Buenos Aires, Argentina). *Estuaries* 24, 917-925.
- Rosa S, Galvagno MA, Vélez CG, 2006. Primeros aislamientos de Thraustochytriales (Labyrinthulomycetes, Heterokonta) de ambientes estuariales y salinos de la Argentina. *Darwiniana* 44, 81-88.
- Rosa SM, Soria MA, C.G. V, Galvagno MA, 2010 Improvement of a two-stage fermentation process for docosahexaenoic acid production by *Aurantiochytrium limacinum* SR21 applying statistical experimental designs and data analysis. *Bioresource Technol* 101, 2367-2374.
- Rzhetsky A, Nei M, 1992 A simple method for estimating and testing minimum evolution trees. *Mol Biol Evol* 9 945-967.
- Sahade R, Tatián M, Esnal GB, 2004. Reproductive ecology of the ascidian *Cnemidocarpa verrucosa* at Potter Cove, South Shetland Islands, Antarctica. *Mar Ecol Progr Series* 272, 131-140.
- Saitou N, Nei M, 1987 The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molec Biol Evol* 4, 406-425.
- Sakuradani E, Takeno S, Abe T, Shimizu S, 2005. Arachidonic acid-producing *Mortierella alpina* creation of mutants and molecular breeding, En: Cohen Z, Ratledge C (Eds), *Single Cell Oil*. AOCS PRESS, Champaign.
- Sathe-Pathak V, Raghukumar S, Raghukumar C, Sharma S, 1993. Thraustochytrid and fungal component of marine detritus. I. Field studies on decomposition of the brown alga *Sargassum cinereum* Ag. *Indian J Mar Scie* 22, 159-167.
- Schärer L, Knoflach D, Vizoso DB, Rieger G, Peintner U, 2007. Thraustochytrids as novel parasitic protists of marine free-living flatworms: *Thraustochytrium caudivorum* sp. nov. parasitizes *Macrostomum lignano*. *Mar Biol* 152, 1095-1104.
- Scheckenbach F, Hausmann K, Wylezich C, Weitere M, Arndt H, 2010. Large-scale patterns in biodiversity of microbial eukaryotes from the abyssal sea floor. *Proc Natl Acad Sci USA* 107, 115-120.
- Scheiner D, 1975. Determination of ammonia and kjeldhal nitrogen by indophenol method. *Water Res* 10, 31-36.
- Schneider J, 1967. Ein neuer mariner Phycomycet aus der Kieler Bucht. (*Thraustochytrium striatum* spec. nov.). *Kieler Meeresforsch* 23, 16-20.
- Schneider J, 1969a. Über niedere Pilze der westlichen Ostsee. *Ber Dtsch Bot Ges* 81, 375-379.

- Schneider J, 1969b. Zur Taxonomie, Verbreitung und Oekologie einiger marine Phycomyceten. Kieler Meeresforsch 25, 316-327.
- Scholz E, 1958. Über morphologische Modifikationen bei niederen Erdphycomyceten and Beschreibung zweier neuer Arten von Rhizophydium und Thraustochytrium. Arch Mikrobiol 29, 354-362.
- Siegenthaler PA, Belsky MM, Goldstein S, Menna M, 1967. Phosphate uptake in an obligately marine fungus. II. Role of culture conditions, energy sources, and inhibitors. J Bacteriol 93, 1281-1288.
- Sijtsma L, de Swaaf ME, 2004. Biotechnological production and applications of the omega-3 polyunsaturated fatty acid docosahexaenoic acid. Appl Microbiol Biotechnol 64, 146-153.
- Silveira RG, Kakizono T, Takemoto S, Nishio N, Naga S, 1991. Medium optimization by an orthogonal array design for the growth of *Methanosarcina barkeri*. J Ferm Bioeng 72, 20-25.
- Simopoulos A, Leaf A, Salem N, 1999. Essentiality of and recommended dietary intakes for omega-6 and omega-3 fatty acids. Ann Nutr Metab 43, 127-130.
- Singh A, Ward OP, 1997a. Production of high yields of docosahexaenoic acid by *Thraustochytrium roseum* ATCC 28210. J Ind Microbiol 16, 370-373.
- Singh A, Ward OP, 1997b. Production of high yields of arachidonic acid in a fed-batch system by *Mortierella alpina*. ATCC 32222. Appl Microbiol Biotechnol 48, 1-5.
- Singh A, Wilson S, Ward OP, 1996. Docosahexaenoic acid (DHA) production by *Thraustochytrium* sp. ATCC20892. J Microbiol Biotechnol 12, 76-83.
- Song X, Zhang X, Guo N, Zhu L, Kuang C, 2007. Assessment of marine thraustochytrid *Schizochytrium limacinum* OUC88 for mariculture by enriched feeds. Fish Sci 73, 565-573.
- Soria AM, Gonzalez Funes JL, Garcia AF, 2004. A simulation study comparing the impact of experimental error on the performance of experimental designs and artificial neural networks used for process screening. J Ind Microbiol Biotechnol 31, 469-474.
- Sparrow FK, 1936. Biological observations on the marine fungi of Woods Hole waters. Biol Bull 70, 236-263.
- Sparrow FK, 1960. Aquatic Phycomycetes, Ann Arbor, 2da ed. Univ. Michigan Press, Michigan.
- Sparrow FK, 1968. On the occurrence of the Thraustochytriaceae. Veröff Inst Meeresforsch Bremerh 11, 89-92.
- Spivak E, 1997. Cangrejos estuariales del Atlántico sudoccidental (25 - 41° S) (Crustacea : Decapoda : Brachyura) Investig Mar 25, 105-120.
- Stahl PD, Klug MJ, 1996. Characterization and differentiation of filamentous fungi based on Fatty Acid composition. Appl Environ Microbiol 62, 4136-4146.

- Standbury PF, Whitaker A, Hall SJ, 1986. Media for industrial fermentations, En: Standbury PF, Whitaker A, Hall SJ (Eds), Principles of Fermentation technology. Pergamon, Oxford, pp. 93-122.
- Steele HL, Streit WR, 2005. Metagenomics: advances in ecology and biotechnology. FEMS Microbiol Lett 247, 105-111.
- Stoeck T, Taylor GT, Epstein SS, 2003. Novel eukaryotes from the permanently anoxic Cariaco basin (Caribbean Sea). Appl Environ Microbiol 66, 5656-5663.
- Strobel R, Sullivan G, 1999. Experimental designs for improvement of fermentations, En: Demain A, Davies J (Eds), Manual of industrial microbiology and biotechnology. ASM Press, Washington, D.C., pp. 80-93.
- Sylvan CA, 2001. Geology of the Golfo San Jorge Basin, Argentina. J Iber Geol 27, 123-157.
- Tacon AGJ, 1995. Feed ingredients for carnivorous fish species: Alternatives to fishmeal and other fishery resources, En: Reinertsen H, Harlaand H (Eds), Sustainable fish farming; Proceedings of the first international symposium on sustainable fish farming, Rotterdam, pp. 89-116.
- Takao Y, Nagasaki K, Mise K, Okuno T, Honda D, 2005. Isolation and characterization of a novel single-stranded RNA Virus infectious to a marine fungoid protist, *Schizochytrium* sp. (Thraustochytriaceae, Labyrinthulea). Appl Environ Microbiol 71, 4516-4522.
- Takao Y, Tomaru Y, Nagasaki K, Sasakura Y, Yokoyama R, Honda D, 2007. Fluorescence in situ hybridization using 18S rRNA targeted probe for specific detection of thraustochytrids (Labyrinthulomycetes). Plankton & Benthos Res 2, 91-97.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S, 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. Mol Biol Evol 24, 1596-1599.
- Tamura K, Nei M, 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. Mol Biol Evol 10, 512-526.
- Tamura K, Nei M, Kumar S, 2004. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. Proc Natl Acad Sci USA 101, 11030-11035.
- Tanaka S, Yaguchi T, Shimizu S, Sogo T, Fujikawa S, 2003. Process for preparing docosahexaenoic acid and docosapentaenoic acid with *Ulkenia*, United States Patent. 6509178, USA.
- Taoka Y, Nagano N, Okita Y, Izumida H, Sugimoto S, Hayashi M, 2008. Effect of addition of Tween 80 and potassium dihydrogenphosphate to basal medium on the isolation of marine eukaryotes, thraustochytrids. J Biosci Bioeng 105.
- The MathWorks I, 2004. Genetic Algorithm and Direct Search Toolbox User's Guide.
- Torsvik V, Goksoyr J, Daae FL, 1990. High diversity in DNA of soil bacteria. Appl Environ Microbiol 56, 782-787.

- Tsui CK, Marshall W, Yokoyama R, Honda D, Lippmeier JC, Craven KD, Peterson PD, Berbee ML, 2009. Labyrinthulomycetes phylogeny and its implications for the evolutionary loss of chloroplasts and gain of ectoplasmic gliding. *Mol Phylogenet Evol* 50, 129-140.
- Tuominen TR, Esmark M, 2003. Food for thought: The use of marine resources in fish feed. WWF Reporte 02/3, Oslo.
- Tyson GW, Banfield JF, 2005. Cultivating the uncultivated: a community genomics perspective. *Trends Microbiol* 13, 411-415.
- Ulken AM, 1965. Zwein neue Thraustochytrien aus der Außenweser. *Veröff Inst Meeresforsch Bremerh* 9, 289-295.
- Ulken AM, 1966. Untersuchungen über marine Pilze im äquatorialen Atlantik vor der Küste Brasiliens. *Veröff Inst Meeresforsch Bremerh* 10, 107-116.
- Ulken AM, 1979. Phycomycetenfunde in der Sargassosee. *Veröff Inst Meeresforsch Bremerh* 18, 21-27.
- Ulken AM, 1983. Distribution of Phycomycetes in mangrove swamps with brackish waters and waters of high salinity, En: Teas HJ (Ed), *Biology and Ecology of Mangroves*. *Veröff Inst Meeresforsch Bremerh*.
- Ulken AM, 1984. The fungi of the mangrove ecosystem, En: Pro FD, Dor I (Eds), *Hydrobiology of the Mangrove*. W Junk, The Hague, pp. 27-33.
- Ulken AM, 1986. Estimation of thraustochytrid propagules in two mangrove swamps. *Bot Mar* 29, 85-89.
- Ulken AM, 1990. Marine thraustochytrids and chytridiomycetes in the North Sea area and in selected other regions. J. Cramer, Berlin.
- Ulken AM, Jaeckle I, Bahnweg G, 1985. Morphology, nutrition and taxonomy of an *Aplanochytrium* sp. from the Sargasso Sea. *Mar Biol* 85, 89-95.
- Ulken AM, Viquez R, Valiente C, Campos M, 1990. Marine Fungi (Chytridiomycetes and Thraustochytriales) from a mangrove area at Punta Morales, Golfo de Nicoya, Costa Rica, América Central. *Rev Biol Trop* 38, 243-250.
- Unagul P, Assantachai C, Phadungruengluij S, Supphantharika M, Tanticharoen M, Verduyn C, 2007. Coconut water as a medium additive for the production of docosahexaenoic acid (C22:6 n3) by *Schizochytrium mangrovei* Sk-02. *Bioresource Technol* 98, 281-287.
- Varela G, Perez M, Ruiz RB, 1990. Changes in the quantitative and qualitative composition in fat from fish, due to seasonal and industrial and culinary processing, En: Somogy JC, Hotzael D (Eds), *Marine Foods. Biol. Nutr. Dieta*. Basel, Karger, pp. 104-109.
- Vervoost F, 1967. Las comunidades vegetales de la depresión del Salado., En: INTA (Ed), *La vegetación de la República Argentina VII.*, pp. 1-262.
- Vishniac HS, 1955. The nutritional requirements of isolates of *Labyrinthula* spp. *J Gen Microbiol* 12, 455-463.

- Vishniac HS, 1956. On the ecology of the lower marine fungi. *Biol Bull* 111, 410-414.
- Vishniac HS, 1960. Salt requirements of marine phycomycetes. *Limnol Oceanogr* 5, 362-365.
- Vishniac HS, Watson SW, 1953. The steroid requirements of *Labyrinthula vitellina* var. *pacifica*. *J Gen Microbiol* 8, 248-255.
- Volpedo AV, Yunes T, Fernández, Cirelli A, 2005. El humedal mixohalino de Bahía Samborombón: conservación y perspectivas, *Humedales Fluviales de América del Sur. Hacia un manejo sustentable* Ediciones Proteger-UICN, pp. 89-110.
- Ward OP, Singh A, 2005. Omega-3/6 fatty acids: Alternative sources of production. *Process Biochem* 40, 3627-3652.
- Watrud S, Martin K, Donegan KR, Stone JK, Coleman CG, 2006. Comparison of taxonomic, colony and PCR-RFLP methods to characterize microfungal diversity. *Mycologia* 98, 384-392.
- Watson SW, Ordal EJ, 1957. Techniques for the isolation of *Labyrinthula* and *Thraustochytrium* in pure culture. *J Bacteriol* 73, 589-590.
- Wen Z, Chen F, 2005. Prospects for eicosapentanoic acid production using microorganisms, En: Cohen Z, Ratledge C (Eds), *Single Cell Oil*. AOCS PRESS, Champaign, pp. 1138-1160.
- Wolff RL, Lavalie O, Pedrono F, Pasquier E, Deluc LG, Marpeau AM, Aitzetmuller K, 2001. Fatty acid composition of Pinaceae as taxonomic markers. *Lipids* 36, 439-451.
- Wong MK, Tsui CK, Au DW, Vrijmoed LL, 2008 Docosaheaxanoic acid production and ultrastructure of the thraustochytrid *Aurantiochytrium mangrovei* MP2 under high glucose concentrations *Mycoscience* 49, 266-270.
- Wu S-T, Lin L-P, 2003. Application of response surface methodology to optimize docosaheaxanoic acid production by *Schizochytrium* sp. S31. *J Food Biochem* 27, 127-139.
- Wynn J, Behrens P, Sundararajan A, Hansen J, Apt K, 2005. Production of Single Cell Oils by Dinoflagellates, En: Cohen Z, Ratledge C (Eds), *Single Cell Oil*. AOCS PRESS, Champaign, pp. 86-98.
- Yaguchi T, Tanaka S, Yocochi T, Nakahara T, Higashihara T, 1997. Production of high yields of docosaheaxanoic acid by *Schizochytrium* sp. strain SR21. *JAOCs* 74, 1431-1434.
- Yamasaki T, Aki T, Shinozaki M, Taguchi M, Kawamoto S, Ono K, 2006. Utilization of Shochu distillery wastewater for production of polyunsaturated fatty acids and xanthophylls using thraustochytrid. *J Biosci Bioeng* 102, 323-327.
- Yang HL, Lu CK, Chen SF, Chen YM, Chen YM, 2009. Isolation and Characterization of Taiwanese Heterotrophic Microalgae: Screening of Strains for Docosaheaxanoic Acid (DHA) Production. *Mar Biotechnol (NY)* 12, 173-185.
- Yañez-Arancibia A, Day JW, 1982. Coastal lagoons and estuarines: ecosystem approach. *Cienc Interam* 22, 11-26.

- Yokochi T, Honda D, Higasshihara T, Nakahara T, 1998. Optimization of docosahexaenoic acid production by *Schizochytrium limacinum* SR21. *Appl Microbiol Biotechnol* 4, 72-76.
- Yokoyama R, Honda D, 2007. Taxonomic rearrangement of the genus *Schizochytrium* sensu lato based on morphology, chemotaxonomic characteristics, and 18S rRNA gene phylogeny (Thraustochytriaceae, Labyrinthulomycetes): emendation for *Schizochytrium* and erection of *Aurantiochytrium* and *Oblongichytrium* gen. nov. *Mycoscience* 48, 199-211.
- Yokoyama R, Salleh B, Honda D, 2007. Taxonomic rearrangement of the genus *Ulkenia* sensu lato based on morphology, chemotaxonomical characteristics, and 18S rRNA gene phylogeny (Thraustochytriaceae, Labyrinthulomycetes): emendation for *Ulkenia* and erection of *Botryochytrium*, *Parietichytrium*, and *Sicyoidochytrium* gen. nov. *Mycoscience* 48, 329-341.
- Yorio P, Tagliorette A, Harris G, Giaccardi M, 1988. Áreas Protegidas Costeras de la Patagonia: Síntesis de información, diagnosis sobre su estado actual de protección y recomendaciones preliminares, Informe Técnico del Plan de Manejo Integrado de la Zona Costera Patagónica 39. Fundación Patagonia Natural, Puerto Madryn.
- Zhu L, Zhang X, Song X, Kuanga C, 2007. Changes of lipid content and fatty acid composition of *Schizochytrium limacinum* in response to different temperatures and salinities. *Process Biochem* 42, 210-214